# プログラム

ロッテ基金特別講演（SL）

メインシンポジウム（MS-1～MS-4）

日本学術会議シンポジウム（CS-1～CS-6）

歯科基礎医学会学術シンポジウム（KS-1～KS-4）

日韓合同シンポジウム（JKS-1～JKS-4）

歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演（Y-1～Y-4）

ランチョンセミナー（LS-1～LS-2）

サテライトシンポジウム（SS1～SS16）

一般演題（口演）

一般演題（ポスター）

## ■ ロッテ基金特別講演
## Special lecture accorded by the LOTTE Foundation

**第一部　講演　13：00〜14：00**

**「緑色蛍光たんぱく質 GFP の発見」**

下村　　脩（ウッヅホール海洋生物学研究所特別上席研究員・ノーベル賞受賞者）
座長：影山　幾男（第 57 回歯科基礎医学会学術大会　大会長）

**第二部　対談　14：00〜15：00**

**テーマ：日本の若手研究者をいかに育てるか**

対談者：大浦　　清（一般社団法人　歯科基礎医学会　理事長）
住友　雅人（日本歯科医学会会長）
村上　龍男（鶴岡市立加茂水族館前館長　シニアアドバイザー）
下村　　脩（ウッヅホール海洋生物学研究所特別上席研究員）
日時：9 月 13 日（日）13：00〜15：00
会場：A 会場　マリンホール

## ■ メインシンポジウム　Main symposium

**「Outlook of dentistry」**

Chairperson : Ikuo Kageyama（Congress President）
Akira Hamura（Dean The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo）
日時：9 月 12 日（土）14：00〜16：00
会場：A 会場　マリンホール

MS-1　The outlook for dentistry in Australia：the post, the present and the future
Prof Grand Townsend（Sch Dent Univ Adelaide Australia）

MS-2　Transfer of scientific knowledge into the dental curriculum
Prof Charles Shuler（Dean Fac Dent the Univ British Columbia Canada）

MS-3　Dentistry the UK
Prof Paul Coulthard（Dean Sch of Dent The Univ of Manchester the UK）

MS-4　The future dentistry in Japan
Prof Akira Hamura（Dean The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, Japan）

## ■ 日本学術会議シンポジウム
## Symposium of Science Council of Japan

### 「歯科基礎医学の多様性と新たなパラダイムシフトの展開」

座長：東　みゆき（日本学術会議会員，医科歯科大　院医歯）
　　髙田　　隆（一般社団法人歯科基礎医学会　副理事長）
日時：9 月 13 日（日）9：00～11：00
会場：A 会場　マリンホール

CS-1　歯科基礎医学の多様性を基盤とした新たな歯科医学の展開―日本学術会議の立場から
山口　　朗（日本学術会議会員，東歯大　口腔科学研究センター）

CS-2　歯科基礎医学分野からパラダイムシフトをおこすような人材を育成するために
平田　雅人（九大　院歯　口腔細胞工学）

CS-3　基礎生命科学の一研究者として
一條　秀憲（東京大　院薬　細胞情報）

CS-4　新しいリンパ球 ILC2 の発見
茂呂　和世[1,2,3]（[1]理研　統合生命医科学研究センター　免疫細胞システム研究，[2]横浜市大　生命医科学　免疫生物，[3]日本学術振興機構　さきがけ）

CS-5　骨リモデリングの制御機構の解明
中島　友紀（医科歯科大　院医歯　分子情報伝達）

CS-6　発生の神秘に魅せられて
大峡　　淳（新潟大　院医歯　口腔解剖）

## ■ 歯科基礎医学会学術シンポジウム
## Symposium of JAOB

### 「生体機能の多次元バイオイメージング」

座長：進藤　正信（北大　院歯　口腔病理病態）
　　大場　雄介（北大　院医　細胞生理）
日時：9 月 12 日（土）9：00〜11：00
会場：A 会場　マリンホール

KS-1　ライブイメージングと数理計測で見る脊椎動物の発生ボディプランの調節機構
　飯村　忠浩[1,2,3]（[1]愛媛大 PROS バイオイメージング，[2]愛媛大 ADRES 病態機能解析，[3]愛媛大病院・創生医療センター・人工関節センター）

KS-2　蛍光生体イメージングで解く細胞動態ネットワークの世界
　石井　　優[1,2]（[1]大阪大　院医／生命機能　免疫細胞生物，[2]JST，CREST）

KS-3　シグナル伝達のバイオイメージングと臨床応用
　大場　雄介（北大　院医　細胞生理）

KS-4　初期発生における蛍光イメージングによる心臓・血管形成機構の解明
　望月　直樹（国循センター　研究所　細胞生物）

## ■ 日韓合同シンポジウム
## KBDSSA and JAOB joint symposium at the Meeting

### 「New horizon in bone cell biology」

Chairperson :
Nobuyuki Udagawa（Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ）
Norio Amizuka（Dept Develop Biol of Hard Tissue, Grad Sch Dent Med, Hokkaido Univ）
日時：9 月 13 日（日）9：00〜11：00
会場：B 会場　スノーホール B

JKS-1　Role of Runx2/Cbf$\beta$ complex in skeletal tissues
　Prof Je-Yong Choi (Dept Biochem & Cell Biol, Kyungpook Natl Univ Sch Med)

JKS-2　Contribution of the $Scx^{+}/Sox9^{+}$ cell population to the establishment of the junction between tendons/ligaments and cartilage
Prof Chisa Shukunami（Dept Oral Biochem, Hiroshima Univ）

JKS-3　Calcium signaling for osteoclast differentiation
Prof Hong-Hee Kim（Dept Cell Deve Biol, Seoul Natl Univ Sch Med）

JKS-4　Regulation of osteoclast differntiation and function by Wnt signals
Prof Yasuhiro Kobayashi（Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ）

## ■ 歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演 JAOB/Rising members award winner

日時：9 月 12 日（土）13：00〜14：00
会場：A 会場　マリンホール

【生理学部門】座長：二ノ宮裕三（九大　院歯　口腔機能解析）

Y-1　前澤　仁志（北大　院歯　口腔生理）
「ヒトの等尺性舌突出時における皮質-筋コヒーレンス解析：脳磁図による研究」
受賞対象論文：Contralateral dominance of corticomuscular coherence for both sides of the tongue during human tongue protrusion: An MEG study. NeuroImage 101 巻　245 頁〜255 頁（2014 年発行）
第 56 回歯科基礎医学会学術大会発表

【生化学部門】座長：平田　雅人（九大　院歯　口腔細胞工学）

Y-2　平田-土屋　志津（九歯大　健康増進，九歯大　口腔機能）
「NF-κB p65 は Smad4 と結合することで BMP2 誘導性の骨形成を抑制する」
受賞対象論文：Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF-κB via an interaction with Smad4. Molecular Endocrinology 28 巻　1460 頁〜1470 頁（2014 年発行）
第 54 回歯科基礎医学会学術大会発表

【解剖学部門】座長：佐藤　　巌（日本歯大　生命歯　解剖 1）

Y-3　斎藤浩太郎（新潟大　院医歯　硬組織形態）
「歯の他家移植はマウス歯髄幹細胞/前駆細胞の維持を阻害する」
受賞対象論文：Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. Cell and Tissue Research 356 巻 357 頁〜367 頁（2014 年発行）
第 54 回歯科基礎医学会学術大会発表

【解剖学部門】座長：大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態）

Y-4　林田千代美（明海大　歯　口腔解剖）

「骨細胞は破骨細胞形成抑制因子としてインターフェロンβを産生する」

受賞対象論文：Osteocytes produce interferon-β as a negative regulator of osteoclastogenesis. The Journal of Biological Chemistry 289 巻 11545 頁～11555 頁（2014 年発行）

第 55 回歯科基礎医学会学術大会発表

## ■ ランチョンセミナー　Luncheon seminar

### ランチョンセミナー 1

**「若手研究者のための Author Workshop：学術論文作成に必要な画像処理とプレゼン技法について」**

日時：9 月 12 日（土）12：00～13：00

会場：C 会場　中会議室 201

LS-1　大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態）

主催：エルゼビア・ジャパン株式会社

### ランチョンセミナー 2

**「医の博物館への招待」**

日時：9 月 13 日（日）12：10～12：50

会場：C 会場　中会議室 201

LS-2　西巻　明彦（日歯新潟　生命歯　医の博物館）

座長：葛城　啓彰（日歯新潟　生命歯　微生物）

共催：ジェイメディカル株式会社

## ■ サテライトシンポジウム　Satellite symposia

### サテライトシンポジウム 1

**「象牙質の進化を探る」**

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：中会議室 201A
オーガナイザー 1：笹川　一郎（日歯新潟　先端研）
オーガナイザー 2：田畑　　純（医科歯科大　院医歯　硬組織構造生物）

SS1-1　象牙質の進化と歯の進化
田畑　　純（医科歯科大　院医歯　硬組織構造生物）

SS1-2　下等脊椎動物における象牙質の多様性と進化
笹川　一郎（日歯新潟　先端研）

SS1-3　高石灰化組織となる象牙質，肺魚の Petrodentine
岡　　俊哉[1]，石山巳喜夫[2]，笹川　一郎[3]
（[1]日歯新潟　生物，[2]日歯新潟　短大　歯科衛生，[3]日歯新潟　先端研）

SS1-4　爬虫類（ワニ）の象牙質形成，成長線形成機構を中心に
三島　弘幸（高知学園短大　医療衛生）

SS1-5　脊椎動物の進化における骨格形成の変遷
山口　　朗（東歯大　口腔科学研究センター）

### サテライトシンポジウム 2

**「エナメル蛋白遺伝子群の系統発生学的解析―魚類から哺乳類まで―**

日時：9 月 11 日（金）15：00〜17：30
会場：中会議室 201A
オーガナイザー 1　川崎　和彦（ペンシルバニア州大　人類）
オーガナイザー 2　石山巳喜夫（日歯新潟　短大　歯科衛生）

SS2-1　エナメル質の起原
川崎　和彦（ペンシルバニア州大　人類）

SS2-2　四肢動物のエナメル質の分子進化
　　新谷　誠康（東歯大　小児歯）

SS2-3　肉鰭類アメロジェニン遺伝子の分子生物学的解析
　　三上　正人（日歯新潟　微生物）

SS2-4　条鰭魚類 ガーパイクの歯と鱗の上皮性蛋白の発見
　　石山巳喜夫（日歯新潟　短大　歯科衛生）

SS2-5　魚類の歯胚におけるエナメル蛋白遺伝子および *Dmp1* 遺伝子の発現解析
　　中富　満城（九歯大　解剖）

SS2-6　ガーパイクの歯と鱗における SCPP5 蛋白の免疫組織化学
　　笹川　一郎（日歯新潟　先端研）

## サテライトシンポジウム 3

## 「内膜系オルガネラの形成・輸送機構」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：中会議室 201B
オーガナイザー 1　吉垣　純子（日大松戸歯　生理）
オーガナイザー 2　横山　三紀（医科歯科大　院医歯　硬組織病態生化）

SS3-1　ゴルジ体の構造維持における VAMP4 の役割
　　設楽　彰子[1]，渋井　　徹[2]，岡山　三紀[3]，荒川　俊哉[4]，溝口　　到[3]，坂倉　康則[2]，田隈　泰信[4]（[1]米国立衛生研，[2]北医療大　歯　解剖，[3]北医療大　歯　矯正，[4]北医療大　歯　生化）

SS3-2　耳下腺腺房細胞における分泌顆粒へのタンパク質選別輸送機構
　　吉垣　純子，横山　　愛，加藤　　治（日大松戸歯　生理）

SS3-3　ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 による EGFR 細胞内輸送制御
　　花房　　洋[1]，慶田城　迅[2]，松本　邦弘[1]
　　（[1]名大　院理　生命理，[2]神戸大　院医　病態シグナル）

SS3-4　Lysosome-associated membrane protein 1/2 によるミトコンドリア細胞内輸送の制御
　　横山　三紀（医科歯科大　院医歯　硬組織病態生化）

SS3-5　骨系細胞におけるリソソームの新しい機能
　　筑波　隆幸（長崎大　院医歯薬　歯科薬理）

## サテライトシンポジウム 4

## 「第 29 回唾液腺談話会　唾液腺研究最前線～未来へと続く軌跡～」

日時：9 月 11 日（金）15：00～17：30
会場：中会議室 201B
オーガナイザー 1　石川　康子（徳島大　院医歯薬）
オーガナイザー 2　今井あかね（日歯新潟　短大　歯科衛生）

SS4-1　乳製品副産物による人工唾液の開発
石川　康子[1]，Pieczonka Tomasz[1]，Bragiel Aneta[1]，薮内さつき[2]，竹内　祐子[2]，柳沢志津子[3]，福田　佳奈[4]，金　　智蓮[4]，金　　敦祚[4]，吉岡　昌美[3]（徳島大　院医歯薬　[1]分子薬理，[2]地域医療福祉，[3]口腔保健福祉，[4]アプロサイエンス社）

SS4-2　唾液腺 BDNF 強制発現トランスジェニックマウスにおける神経生理学的変化とヒトの精神神経疾患の病態評価における唾液検査の応用
東　　雅啓[1]，猿田　樹理[1]，杉本　昌弘[1,2]，近藤　裕介[1,3]，斎藤　一郎[4]，槻木　恵一[1]（[1]神奈川歯科大　院口腔科学，[2]慶應大　先端生命科学研，[3]東海大　医　病理診断，[4]鶴見大　歯　病理）

SS4-3　ヒト唾液ペプチドの研究：ペプチドミクスから機能解析へ
斎藤　英一[1]，金子　陽徳[2]，幡本　晃太[2]，瀬賀　拓哉[1]，加藤　哲男[3]，谷口　正之[2]（[1]新潟工大　院工，[2]新潟大　院自然，[3]東歯大　化学）

SS4-4　マウス顎下腺灌流法による上皮膜輸送機能解析　膜タンパクと水分泌との関係について
中本　哲自[1]，近藤　祐介[2]，向坊　太郎[2]，城所　愛美[2]，今村　　敦[2]，宗政　　翔[2]，正木　千尋[2]，細川　隆司[2]
（[1]松本歯大　歯科補綴，[2]九歯大　口腔再建リハビリ）

SS4-5　ラット 3 大唾液腺における副交感神経性血流増加反応の相違
佐藤　寿哉，石井　久淑（北医療大　歯　生理）

SS4-6　内因性 peroxidase 活性による諸種哺乳動物の唾液腺腺房細胞の性状
盛口　敬一[1]，内海　倫也[1]，城ケ原貴通[2]，小田　銑一[2]，本田　雅規[1]
（[1]愛院大　歯　口腔解剖，[2]岡山理大　理　動物）

SS4-7　アミラーゼ分泌と $Ca^{2+}$：第 1 回談話会から引きずる未解決の課題
東城　庸介（北医療大　歯　教育支援）

## サテライトシンポジウム 5

## 「歯科医学領域における FIB-SEM による三次元超微形態観察の可能性」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：中会議室 302A
オーガナイザー 1：上岡　　寛（岡山大　院医歯薬　歯科矯正）
オーガナイザー 2：薗村　貴弘（金沢医大　医　解剖 2）

SS5-1　中枢神経系における共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM を用いた 3D-CLEM
　　薗村　貴弘（金沢医大　医　解剖二）

SS5-2　力学的負荷に対する歯根膜組織変化の 3 次元超微形態解析
　　平嶋　伸悟[1,2]，太田　啓介[1]，金澤知之進[1]，都合亜記暢[1,3]，楠川　仁悟[2]，中村桂一郎[1]
　　([1]久留米大　医　顕微解剖，[2]久留米大　医　歯口セ，[3]久留米大　医　電顕)

SS5-3　直交配置型 FIB-SEM を用いた骨組織の三次元的解析
　　橋本　真奈[1]，長岡　紀幸[2]，原　　徹[3]，上岡　　寛[1]
　　([1]岡山大　院医歯薬　歯科矯正，[2]岡山大　院医歯薬　共同利用施設，[3]物質・材料研究機構)

SS5-4　骨細胞ネットワーク：FIB-SEM による微細構造解析
　　長谷川智香（北大　院歯　硬組織発生）

SS5-5　直交配置型 FIB-SEM による象牙質疾患の未脱灰 3 次元超微形態観察
　　三浦　治郎[1]，清水　真人[1]，榎本早希子[2]，荒井　重勇[2]
　　([1]大阪大　院歯　総診，[2]名大　エコトピア)

SS5-6　チタン／生体界面の三次元観察
　　長岡　紀幸[1]，吉原久美子[2]
　　([1]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター，[2]岡山大病院　新医療研開センター)

## サテライトシンポジウム 6

## 「骨の細胞イメージング　– a new horizon –　骨のメカニズムをどこまで観ることができるか」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：30
会場：中会議室 302A
オーガナイザー 1　網塚　憲生（北大　院歯　硬組織発生）
オーガナイザー 2　笹野　泰之（東北大　院歯　顎口腔形態創建）

SS6-1　オーバービュー：骨を観る　―組織化学・微細構造学からバイオイメージングへの展開―
網塚　憲生，長谷川智香，坪井香奈子，本郷　裕美，原口　真衣，山本知真也（北大　院歯　硬組織発生）

SS6-2　SIM・FIB-SEM・原子間力顕微鏡・同位体顕微鏡を用いた骨組織解析への応用
長谷川智香，坪井香奈子，本郷　裕美，山本知真也，網塚　憲生（北大　院歯　硬組織発生）

SS6-3　蛍光細胞メージングと骨形態計測で見る骨代謝におけるケモカインシグナルの役割
李　　智媛[1]，飯村　忠浩[1,2,3]（[1]愛媛大　学術支援センター，[2]愛媛大　プロテオサイエンスセンター，[3]愛媛大病院　先端医療創生センター・人工関節センター）

SS6-4　生体骨イメージングで解く骨吸収抑制剤の新たな作用機序
石井　　優（大阪大　院医／生命機能　免疫細胞生物，JST・CREST）

SS6-5　赤外分光法・ラマン分光法による骨質の可視化
木村-須田　廣美[1,2]，伊藤　哲平[2]，兼平　裕也[2]，日高　公介[2]，金沢　恭祐[2]，植野　秀俊[2]
（[1]千歳科技大　理工　応用化学生物，[2]千歳科技大　院　光科学）

## サテライトシンポジウム 7

### 「歯髄間葉系幹細胞の最先端研究」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：中会議室 302B
オーガナイザー 1　山座　孝義（九大　院歯　分子口腔解剖）
オーガナイザー 2　本田　雅規（愛院大　歯　口腔解剖）

SS7-1　歯髄幹細胞の機能解析と組織再生治療への有効性の検討
　　秦　　正樹（愛院大　歯　有床義歯）

SS7-2　歯髄間葉細胞の由来と造血支持能を含む性状
　　山崎　英俊（三重大　院医　幹細胞発生）

SS7-3　歯髄・歯肉由来の間葉系幹細胞の特性と硬組織再生
　　川島　伸之，興地　隆史（医科歯科大　院医歯　歯髄生物）

SS7-4　歯髄幹細胞と橋渡し研究
　　山座　孝義（九大　院歯　分子口腔解剖）

## サテライトシンポジウム 8

### 「神経損傷後の口腔感覚機能回復を目指した研究最前線」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：30
会場：中会議室 302B
オーガナイザー 1　篠田　雅路（日本大　歯　生理）
オーガナイザー 2　北川　純一（松本歯大　口腔生理）

SS8-1　下歯槽神経切除モデルにおける細胞移植の効果
　　本田　雅規[1,2]，鳥海　　拓[2]，岡　　篤志[2]，篠田　雅路[3]，岩田　幸一[3]，
　　磯川桂太郎[2]
　　([1]愛院大　歯　口腔解剖，[2]日本大　歯　解剖Ⅱ，[3]日本大　歯　生理)

SS8-2　眼窩下神経損傷における三叉神経節での alpha-2/delta-1 subunit の分布と機能
　　佐藤　　匡，市川　博之（東北大　院歯　口腔器官構造）

SS8-3　ラット下歯槽神経切断による島皮質の局所回路の可塑的変化
　　小林　真之（日本大　歯　薬理）

SS8-4　三叉神経運動核アストログリアは眼窩下神経損傷による開口反射の変調に関与する
北川　純一（松本歯大　口腔生理）

SS8-5　抗炎症性組織再生型 M2 マクロファージ誘導因子による神経再生療法の開発
山本　朗仁（名大　院医　頭頸部感覚器外科）

## サテライトシンポジウム 9

## 「口腔生理学分野の研究最前線 Frontier in the field of Oral Physiology」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：中会議室 301A
オーガナイザー 1　舩橋　　誠（北大　院歯　口腔生理）
オーガナイザー 2　山村　健介（新潟大　院医歯　口腔生理）

SS9-1　乾燥に“潤い”をもたらすメカニズムの解明
黒瀬　雅之[1]，八田あずさ[1,2]，岡本圭一郎[1]，Ian D Meng[3]，山村　健介[1]
（[1]新潟大　院医歯　口腔生理，[2]新潟大　病院　総合診療，[3]ニューイングランド大　医　生理）

SS9-2　小鳥の脳から学んだこと〜異分野における生理学，歯学の活用事例
奥村　　哲（静岡理工大　総合情報　神経行動）

SS9-3　舌癌における初期癌性疼痛抑制機構
古川　明彦[1]，篠田　雅路[2]，久保亜抄子[2]，本田　訓也[1,2]，岩田　幸一[2]
（[1]日本大　歯　口腔外科，[2]日本大　歯　生理）

SS9-4　エンドカンナビノイドによる自己増幅的甘味増強と T1R3-非依存的甘味受容経路の存在
岩田　周介[1]，吉田　竜介[1]，重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]
（[1]九大　院歯　口腔機能解析，[2]九大　味覚・嗅覚センサ研究開発センター）

SS9-5　嚥下時における口腔感覚の変調
酒井　翔悟，辻　　光順，真柄　　仁，辻村　恭憲，井上　　誠
（新潟大　院医歯　摂食嚥下リハビリ）

## サテライトシンポジウム 10

## 「歯の形態とその変異を考察する」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：00
会場：中会議室 301A
オーガナイザー 1　近藤信太郎（日大松戸歯　解剖Ⅰ）
オーガナイザー 2　真鍋　義孝（長崎大　院医歯薬　顎顔面解剖）

SS10　歯の形態とその変異を考察する
近藤信太郎[1]，真鍋　義孝[2]
（[1]日大松戸歯　解剖Ⅰ，[2]長崎大　院医歯薬　顎顔面解剖）

SS10-1　南太平洋集団における第三大臼歯のサイズと変異
松野　昌展，近藤信太郎
（日大松戸歯　解剖Ⅰ）

SS10-2　永久歯が小さい集団は乳歯も小さいのか？―永久歯と乳歯の大きさによる集団比較
北川　賀一，真鍋　義孝，小山田常一（長崎大　院医歯薬　顎顔面解剖）

SS10-3　エナメル象牙境とエナメル質外表面の形態的相関度
森田　　航（北大　院歯　口腔機能解剖）

SS10-4　非侵襲的方法による歯の内部構造の把握と教育への応用
加藤　彰子[1]，Alexander Ziegler[2]（[1]愛院大　歯　口腔解剖，[2]ボン大　動物）

## サテライトシンポジウム 11

### 「口腔機能を担う“筋”が持つ潜在能力を探る－筋の分化と可塑性に関する最近の筋研究の動向－」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜14：30
会場：中会議室 301B
オーガナイザー 1　阿部　伸一（東歯大　解剖）
オーガナイザー 2　佐藤　　巌（日本歯大　生命歯　解剖一）

SS11-1　咬筋の発達における血管関連因子からみた筋細胞と間葉系細胞のダイナミクス
　春原　正隆，佐藤　　巌（日本歯大　生命歯　解剖 1）

SS11-2　筋-骨付着部形態形成を筋特有タンパクが誘導する？〜胎児標本を用いた発生・形態学的研究成果からの示唆〜
　山本　将仁（東歯大　解剖）

SS11-3　癌が舌筋の形態や特性に与える影響
　崎山　浩司[1]，瀧澤　将太[2]，坂東　康彦[1]，坂下　　英[1,2]，天野　　修[1]
　（[1]明海大　歯　解剖，[2]明海大　歯　口外Ⅱ）

SS11-4　口腔粘膜上皮シートをハイブリッドさせる事で得られる重層化筋芽細胞シート
　比嘉　一成[1]，山根　茂樹[2]，梅澤　貴志[2]，芹川　雅光[2]，島﨑　　潤[1]，
　阿部　伸一[2]（[1]東歯大　市川病院　眼科／角膜セ，[2]東歯大　解剖）

## サテライトシンポジウム 12

### 「Dentin Sialophosphoprotein（DSPP）を形態と機能から考える」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：30
会場：中会議室 301B
オーガナイザー 1　山越　康雄（鶴見大　歯　分子生化）
オーガナイザー 2　大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態）

SS12-1　オーバービュー：DSPP を形態と機能から考える
　山越　康雄（鶴見大　歯　分子生化）

SS12-2　歯髄および象牙質中の DSPP 由来タンパク質～ 遺伝子発現と機能について ～
山本　竜司（鶴見大　歯　分子生化）

SS12-3　象牙芽細胞分化過程における Dspp の機能的意義
斎藤浩太郎[1]，中富　満城[2]，依田　浩子[1]，大島　勇人[1]
（[1]新潟大　院医歯　硬組織形態，[2]九歯大　解剖）

SS12-4　幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法とそのメカニズム
尾関　伸明[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]
（[1]愛院大　歯　歯内治療，[2]愛院大　薬　生体機能化学）

SS12-5　改変型組み換え DPP タンパク質を利用した硬組織再生における有用性
鈴木　茂樹[1]，小武家誠司[1]，春山　直人[2]，柴　　秀樹[1]
（[1]広島大　院医歯薬保　歯髄生物，[2]九大　歯　矯正歯科）

## Satellite Symposium 13

## Oral Biofilm and Microbiome Research —At the Cutting Edge by Young Investigators—

Organizers：
1. Yoshihisa Yamashita（Kyushu University）
2. Takuichi Sato（Tohoku University）
3. Akiihiro Yoshida（Matsumoto Dental University）
4. Tomoko Ohshima（Tsurumi University）
5. Nobushiro Hamada（Kanagawa Dental University）

SS13-1　Culturlng ‘uncultivable’ oral bacteria
○Sonia R. Vartoukian
（Barts and The London Sch Med Dent, Queen Mary Univ London, UK）

SS13-2　A molecular epidemiology study exploring oral microbiome structure associated with human health
○Toru Takeshita，Yoshihisa Yamashita
（Sec Preventive and Public Health Dent, Div Oral Health, Growth and Deve Kyushu Univ Fac Dent Sci）

SS13-3　Molecular biological control method for oral biofilm at early stage
○Izumi Mashima[1,2]，Hiroshi Miyakawa[2]，Futoshi Nakazawa[2]
（[1]Postdoctoral Fellow of JSPS，[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido）

## サテライトシンポジウム 14

### 「歯の形態形成のメカニズムを再考する」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：00
会場：小会議室 303.304
オーガナイザー 1　原田　英光（岩医大　歯　発生生物・再生医学）
オーガナイザー 2　Han-Sung Jung（Dept Oral Biol, Yonsei Univ）

SS14-1　多生歯性の歯列を読み解く：“Zahnreihe”（A.G.Edmund 1960）理論の考え方．魚類の歯を題材として
　脇田　　稔（歯科基礎医学会名誉会員）

SS14-2　歯の形態形成を再考する；Cope-Osborn の三結節説の再検討から
　小澤　幸重（触れて観て考える「歯と骨」の訪問教室）

SS14-3　イメージングから考える歯の形態形成機構の新規視点
　原田　英光，熊上　深香，大津　圭史，藤原　尚樹
　（岩医大　歯　発生生物・再生医学）

SS14-4　Current opinion in odontology
　Han-Sung Jung（Dept Oral Biol, Yonsei Univ）

## サテライトシンポジウム 15

### 「歯周組織の臨床と基礎　―脈管系を中心に―」

日時：9 月 11 日（金）13：00〜15：00
会場：小会議室 203.204
オーガナイザー　藤村　　朗(岩医大　歯　機能形態)

SS15-1　Hertwig 上皮鞘形成と断裂における新規仮説
　藤原　尚樹，熊上　深香，大津　圭史，原田　英光
　（岩医大　歯　発生生物・再生医学）

SS15-2　インプラント周囲組織の微細血管
　松尾　雅斗（神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態）

SS15-3　インプラント治療に関係する脈管の肉眼解剖
　三輪　容子，佐藤　　巌（日本歯大　生命歯　解剖 1）

SS15-4　歯周組織のリンパ管
安藤　禎紀，藤村　　朗（岩医大　歯　機能形態）

SS15-5　異なる間葉系幹細胞の協調的作用を利用した歯周組織再生
帖佐　直幸，石崎　　明（岩医大　歯　細胞情報科学）

## サテライトシンポジウム 16

## 「口腔癌の新たな治療戦略のための分子病理」

日時：9 月 11 日（金）15：30〜17：30
会場：小会議室 203.204
オーガナイザー 1　田沼　順一（朝日大　歯　口腔病理）
オーガナイザー 2　岡田　康男（日歯新潟　生命歯　病理）

SS16-1　リガンド依存性受容体 DCC 蛋白による口腔扁平上皮癌へのアポトーシス誘導
清島　　保，和田　裕子（九大　院歯　口腔病理）

SS16-2　口腔扁平上皮癌細胞による死細胞貪食の分子機構とその意義
山﨑　　学（新潟大　院医歯　口腔病理）

SS16-3　口腔扁平上皮癌の組織学的悪性度から上皮間葉移行の *in vitro* 研究まで
岡田　康男[1,2]，東理　頼亮[1]，大野　淳也[2]，石黒　仁江[1]，森出美智子[1]，長谷川　仁[1]
（[1]日歯新潟　病理，[2]日歯新潟　院生命歯　病態組織機構）

SS16-4　口腔がんの治療戦略に対する基礎研究の必要性
田沼　順一，金子　裕康，中尾　寿奈，江原　道子，永山　元彦
（朝日大　歯　口腔病理）

## ■ 一般演題（口演）

9月12日（土）11：00～11：30　B会場（スノーホールB）

**薬理／薬理作用・腫瘍**・・・・・・・・・・・・座長：**菅原　俊二（東北大　院歯　口腔分子制御）**

| | |
|---|---|
| **O1-B1** | 歯周病とアルツハイマー（AD）(1)：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS によるマクロファジー活性化と脳髄膜を介した末梢炎症シグナルの脳内伝達とミクログリア活性化<br>○劉　訳聡，武　洲，中西　博（九大　院歯　口腔機能分子） |
| **O1-B2** | 歯周病とアルツハイマー病（AD）(2)：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS の慢性的末梢投与によって誘発される AD 様フェノタイプにおけるカテプシン B の役割<br>○倪　軍軍，武　洲，中西　博（九大　院歯　口腔機能分子） |
| **O1-B3** | ケモカイン CXCL14 の発現がセツキシマブ（抗上皮増殖因子受容体抗体）の腫瘍抑制活性を決定する<br>○生駒　丈晴[1,2]，小澤　重幸[1,2]，鈴木　健司[1]，岩渕　博史[1]，陽　暁艶[2,3]，宮本　千央[2,3]，前畑洋次郎[2,3]，畑　隆一郎[2,3]<br>（[1]神奈川歯科大　顎顔面外科，[2]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター，[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学） |

9月12日（土）11：30～12：00　B会場（スノーホールB）

**薬理／薬理作用・骨代謝**・・・・・・・・・・・・座長：**佐伯万騎男（新潟大　院医歯　歯科薬理）**

| | |
|---|---|
| **O1-B4** | オピオイド受容体による無顆粒島皮質におけるシナプス伝達修飾作用の解明<br>○横田　英子[1]，越川　憲明[2]，小林　真之[2]（[1]日本大　歯　麻酔，[2]日本大　歯　薬理） |
| **O1-B5** | $\alpha$7 ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が骨代謝に及ぼす影響<br>○盛林　昭仁[1]，萱島　浩輝[1]，佐伯万騎男[3]，矢谷　博文[1]，江草　宏[1,2]（[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ，[2]東北大　院歯　分子・再生補綴，[3]新潟大　院医歯　歯科薬理） |
| **O1-B6** | 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットへの新規ビスホスホネート投与による骨量改善と作用機序について<br>○滝澤　愛子[1,2]，千葉　美麗[2,4]，太田　岳[2]，安田　真弓[1,2]，鈴木　恵子[3]，篠田　壽[4]，五十嵐　薫[1]（[1]東北大　院歯　口腔障害科学，[2]東北大　院歯　口腔生理，[3]奥羽大　歯　歯科薬理，[4]東北大　院歯　環境歯） |

9月12日（土）16：00～16：20　B会場（スノーホールB）

**免疫・自然免疫**・・・・・・・・・・・・　座長：**浜田　信城（神奈川歯科大　院歯　微生物感染）**

| | |
|---|---|
| **O1-B7** | ミエロペルオキシダーゼ系によるコリンエステラーゼの傷害<br>○尾西みほ子[1]，小田島武志[2]（[1]北医療大　歯　生化，[2]札幌基礎医学教育学研究所） |
| **O1-B8** | マーモセットの NK 関連分子のクローニング<br>○小笠原康悦（東北大　院歯　難治　口腔免疫） |

9月12日（土）16：30～17：00　B会場（スノーホールB）

**免疫・獲得免疫**・・・・・・・・・・・・・　座長：**小松澤　均（鹿児島大　院医歯　口腔微生物）**

| | |
|---|---|
| **O1-B9** | 反復抗原塗布後における舌下粘膜樹状細胞の特徴<br>○大野　建州，Kang Siwen，東　みゆき（医科歯科大　院医歯　分子免疫　医療研） |
| **O1-B10** | 制御性 T 細胞を誘導する口腔樹状細胞の同定<br>○田中　志典[1,2]，福本　敏[1]，菅原　俊二[2]（[1]東北大　院歯　小児歯，[2]東北大　院歯　口腔分子制御） |
| **O1-B11** | FcεRI 活性化は肥満細胞株 RBL2H3 におけるトリプトファン水酸化酵素の発現を促進する<br>○大橋　晶子，内藤　昌子，高橋　富久（日本大　歯　解剖Ⅰ） |

9月12日（土）11：00〜11：20　C会場（中会議室201）

## 解剖／神経・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：阿部　伸一（東歯大　解剖）

| | |
|---|---|
| O1-C1 | ラット咬筋神経損傷後の三叉神経運動核におけるミクログリアとアストロサイトの動態<br>○小倉　　秀[1,2]，本間　志保[1,3]，脇坂　　聡[1]，古郷　幹彦[2]（[1]大阪大　院歯　口腔解剖1，[2]大阪大　院歯　口腔外科1，[3]梅花女大　看護保健　口腔保健） |
| O1-C2 | ラット口腔顔面領域におけるTRPM8陽性神経線維の分布<br>○矢島　健大[1]，佐藤　　匡[2]，市川　博之[2]（[1]東北大　院歯　歯科保存，[2]東北大　院歯　口腔器官構造） |

9月12日（土）11：30〜11：50　C会場（中会議室201）

## 解剖／その他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：藤村　　朗（岩医大　歯　機能形態）

| | |
|---|---|
| O1-C3 | 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤<br>○吉本　怜子[1]，合島怜央奈[2]，吉住　潤子[3]，木附　智子[3]，檀上　　敦[4]，山下　佳雄[4]，城戸　瑞穂[5]（[1]九大　院歯　歯周病，[2]佐賀大　医　組織　神経解剖，[3]九大　院歯　顔面口腔外科，[4]佐賀大　医　歯科口腔外科，[5]九大　院歯　分子口腔解剖） |
| O1-C4 | 機械的荷重によるインプラント周囲骨のオステオネットワークと生体アパタイトの優先配向の変化<br>○佐々木宗輝[1]，黒嶋伸一郎[1]，中野　貴由[2]，澤瀬　　隆[1]（[1]長崎大　院医歯薬　口腔インプラント，[2]阪大　院工　生体材料） |

9月12日（土）16：00〜16：30　C会場（中会議室201）

## 微生物・細菌1・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：前田　伸子（鶴見大　歯　口腔微生物）

| | |
|---|---|
| O1-C5 | 口腔 *Rothia* 属細菌における硝酸還元活性の株間差異についての検討<br>○真下　千穂，南部　隆之（大阪歯大　細菌） |
| O1-C6 | 形質転換可能なRothia属菌株の分離とゲノム解読<br>○南部　隆之，真下　千穂（大阪歯大　細菌） |
| O1-C7 | Fructanaseによる *Streptococcus mutans* のQuorum sensing阻害メカニズムの解析<br>○鈴木　雄祐[1,2]，荒井　俊明[2,3]，小倉　直美[1]，近藤　壽郎[1]，泉福　英信[2]（[1]日大松戸歯　顎顔面外科，[2]国立感染症研　細菌一，[3]鶴見大　歯　口腔顎顔面外科） |

9月12日（土）16：30〜17：00　C会場（中会議室201）

## 微生物・細菌2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：吉村　文信（愛院大　歯　微生物）

| | |
|---|---|
| O1-C8 | アシルオリゴペプチジルペプチダーゼ活性を有する歯周病原性細菌の新規ペプチダーゼ<br>○根本　孝幸，根本　優子（長崎大　院医歯薬　口腔生化） |
| O1-C9 | クルクミンが *Porphyromonas gingivalis* ベシクルのヒト歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響<br>○泉井　秀介，永田　英樹，天野　敦雄（大阪大　院歯　予防歯科） |
| O1-C10 | ETB産生黄色ブドウ球菌が産生するバクテリオシンに対する自己耐性機構の解明<br>○松尾　美樹[1]，菅井　基行[2]，小松澤　均[1]（[1]鹿児島大　院医歯　口腔微生物，[2]広島大　院医歯薬保　細菌） |

9月12日（土）11：00〜11：30　D会場（中会議室302A）

## 組織／骨代謝　1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：吉江　紀夫（日歯新潟　解剖2）

| | |
|---|---|
| O1-D1 | Galectin-9による破骨細胞形成抑制機構：MafB制御系関与の可能性<br>○久本由香里[1]，上原　範久[1]，久木田明子[2]，久木田敏夫[1]（[1]九大　院歯　分子口腔解剖，[2]佐賀大　医　微生物） |

| | |
|---|---|
| O1-D2 | 転写因子 Foxc1 は Ihh-Gli2 シグナルを促進し内軟骨性骨形成を制御する<br>○波多　賢二[1]，吉田　倫子[1,2]，中村恵理子[1]，高畑　佳史[1]，村上　智彦[1]，井関　祥子[3]，山本　照子[2]，西村　理行[1]（[1]大阪大　院歯　生化，[2]東北大　院歯　顎口腔矯正，[3]医科歯科大　院医歯　顎顔面機構制御） |
| O1-D3 | ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素 G9a は正常な歯牙形成に必要である<br>○上運天太一[1]，出野　尚[2]，中村　芳樹[1]，中島　和久[2]，島田　明美[2]，二藤　彰[2]（[1]鶴見大　歯　歯科矯正，[2]鶴見大　歯　薬理） |

9 月 12 日（土）11：30～12：00　D 会場（中会議室 302A）

## 組織／骨代謝　2・・・・・・・・・・・・・　座長：青木　和広（医科歯科大　院医歯　硬組織薬理）

| | |
|---|---|
| O1-D4 | 副甲状腺ホルモン投与ならびに授乳期にカルシウム欠乏食投与によって誘導される骨細胞周囲の骨基質変化について<br>○本郷　裕美[1]，佐々木宗輝[2]，斎藤　雅美[3]，宇田川信之[4]，網塚　憲生[1]（[1]北大　院歯　硬組織発生，[2]長崎大　院医歯薬　インプラント，[3]ブルカー AXS（株），[4]松本歯大　口腔生化） |
| O1-D5 | 軟骨内骨化における血管内皮細胞の微細構造学的検索<br>○土屋恵李佳[1,2]，本郷　裕美[1]，山本知真也[1]，長谷川智香[1]，網塚　憲生[1]（[1]北大　院歯　硬組織発生，[2]北大　院歯　口腔診断内科） |
| O1-D6 | 糖尿病が骨細胞に与える組織化学的影響について　－SDT fatty ラットを用いた解析－<br>○坪井香奈子，本郷　裕美，長谷川智香，網塚　憲生（北大　院歯　硬組織発生） |

9 月 12 日（土）16：00～16：30　D 会場（中会議室 302A）

## 解剖・その他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：笹川　一郎（日歯新潟　先端研）

| | |
|---|---|
| O1-D7 | 胎生期マウス蝶形骨翼状突起の骨化における免疫組織化学的研究<br>○北村　啓，山本　将仁，梅澤　貴志，芹川　雅光，阿部　伸一（東歯大　院歯　解剖） |
| O1-D8 | Isolation and characterization of dental epithelial cells derived from amelogenesis imperfecta rat as an *in vitro* disease model<br>○Arya Adiningrat[1]，谷村　綾子[2]，三好　圭子[2]，堀口　大吾[2]，野間　隆文[2]（[1]徳島大　院医歯薬　口腔科学教育，[2]徳島大　院医歯薬　医化学） |
| O1-D9 | 象牙質コラーゲンの糖化と加齢変化<br>○清水　真人，三浦　治郎（大阪大　院歯　総診） |

9 月 12 日（土）16：30～17：00　D 会場（中会議室 302A）

## 解剖・歯牙・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：下田　信治（鶴見大　歯　解剖Ⅰ）

| | |
|---|---|
| O1-D10 | 頭部エックス線照射マウスの臼歯根尖部の形態的異常<br>○井出　吉昭[1]，中原　貴[1]，那須　優則[2]，石川　博[3]（[1]日本歯大　生命歯　発生　再生，[2]日本歯大　生命歯　共同研，[3]日本歯大　生命歯） |
| O1-D11 | 歯根形態の研究に仮説がない<br>○小澤　幸重（比較解剖学と「歯と骨の訪問教室」） |
| O1-D12 | エナメル芽細胞分化過程におけるナトリウム依存性グルコース輸送体の局在と機能<br>○依田　浩子，大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態） |

9 月 12 日（土）11：00～11：30　E 会場（中会議室 302B）

## 生化／上皮組織・骨・・・・・・・・・・・・・・　座長：織田　公光（新潟大　院医歯　口腔生化）

| | |
|---|---|
| O1-E1 | 口腔扁平上皮癌細胞における圧受容による増殖制御機構<br>○吉本　尚平[1]，森田　浩光[3]，中村　誠司[2]，平田　雅人[1]（[1]九大　院歯　口腔細胞工学，[2]九大　院歯　顎顔面腫瘍制御，[3]福歯大　総合歯） |
| O1-E2 | TPD52 ファミリータンパクの遺伝子発現制御の検索<br>○本橋　宏美，椋代　義樹（昭和大　歯　口腔外科） |

| | |
|---|---|
| **O1-E3** | iPS 細胞由来骨補填材料の開発<br>○山本　治毅[1]，萱島　浩輝[1]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]（[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ，[2]東北大　院歯　分子・再生補綴） |

9 月 12 日（土）11：30～12：00　E 会場（中会議室 302B）

**生理・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：田﨑　雅和（東歯大　生理）**

| | |
|---|---|
| **O1-E4** | Vc 侵害受容ニューロンにおける AMPA 受容体のリン酸化は舌乾燥に起因する舌痛に関与する<br>○中谷　有香[1]，坪井　美行[2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　口腔診断，[2]日本大　歯　生理） |
| **O1-E5** | *in vitro* 振動刺激負荷装置の開発と振動刺激が培養骨芽細胞分化に及ぼす影響<br>○太田　　岳，千葉　美麗，林　　治秀（東北大　院歯　口腔生理） |
| **O1-E6** | 歯の石灰化における TRPM7 の役割<br>○緒方佳代子[1,2]，岡　　暁子[2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，永嶌　勝之[1]，尾崎　正雄[2]，岡部　幸司[1]（[1]福歯大　細胞生理，[2]福歯大　成育小児歯） |

9 月 12 日（土）16：00～16：30　E 会場（中会議室 302B）

**発生・再生／歯周組織・・・・・・・・・・・・座長：依田　浩子（新潟大　院医歯　硬組織形態）**

| | |
|---|---|
| **O1-E7** | 歯根膜における転写因子 Mkx の機能解析<br>○幸田　直己[1,2]，森山　啓司[2]（[1]医科歯科大　院医歯　システム発生・再生，[2]医科歯科大　院医歯　顎顔面矯正） |
| **O1-E8** | ラット歯周組織における弾性系線維の発達と分布様式<br>○井上　孝二[1]，原　矢委子[2]，佐藤　哲二[2]（[1]鶴見大　歯　電顕センター，[2]鶴見大　歯　解剖・組織細胞） |
| **O1-E9** | Sox21 によるエナメル芽細胞分化メカニズムの解析<br>○齋藤　　幹，福本　　敏（東北大　院歯　小児歯） |

9 月 12 日（土）16：30～17：00　E 会場（中会議室 302B）

**発生・再生／歯牙・歯髄・・・・・・・・・・・・・　座長：福本　　敏（東北大　院歯　小児歯）**

| | |
|---|---|
| **O1-E10** | Rho-YAP シグナルによるエナメル上皮幹細胞維持機構<br>○大津　圭史，藤原　尚樹，原田　英光（岩医大　歯　発生生物） |
| **O1-E11** | マウス切歯 apical bud および切歯・臼歯歯髄における静的幹細胞維持機構について<br>○石川　裕子[1]，中富　満城[2]，大島　勇人[3]（[1]新潟大　院医歯　口腔保健，[2]九歯大　解剖，[3]新潟大　院医歯　硬組織形態） |
| **O1-E12** | 外エナメル上皮・星状網除去による歯胚発生への影響<br>○田畑　　純，杉浦　真琴（医科歯科大　院医歯　硬組織構造） |

9 月 12 日（土）11：00～11：30　F 会場（中会議室 301A）

**病理／腫瘍　1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・座長：草間　　薫（明海大　歯　病理）**

| | |
|---|---|
| **O1-F1** | マウス舌移植モデルにおけるヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移形質と癌微小環境<br>○白子　要一[1]，佐藤かおり[1]，田谷　雄二[1]，青葉　孝昭[1]，島津　徳人[2]，添野　雄一[1]（[1]日本歯大　生命歯　病理，[2]麻布大　生命環　食品生理） |
| **O1-F2** | 口腔扁平上皮癌における DKK3 の発現と機能解析<br>○片瀬　直樹（川崎医大　医　分子生物 1） |
| **O1-F3** | がんの肺転移抑制におけるケモカイン CXCL14/BRAK と NKT 細胞との相乗作用<br>○陽　　暁艶[1]，宮本　千央[1,2]，居作　和人[1,2]，加藤　靖正[3]，畑　隆一郎[1,2]（[1]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター，[2]神奈川歯科大　口腔科学，[3]奥羽大　歯） |

9月12日（土）11：30～12：00　F会場（中会議室301A）

## 病理／腫瘍　2・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：長塚　　仁（岡山大　院医歯薬　口腔病理）

**O1-F4**
抗体修飾バブルリポソームを活用した抗癌活性の作用機序の解明
○平林　文香[1,2]，岩永賢二郎[2]，沖永　敏則[1]，有吉　　渉[1]，西原　達次[1]（[1]九歯大　感染分子生物，[2]九歯大　生体機能 顎顔面外科）

**O1-F5**
分子シャペロン R2TP complex は，口腔扁平上皮癌の進展にどのように関わるか？―酵母からがん研究へ―
○柿原　嘉人[1]，山崎　　学[2]，佐伯万騎男[1]（[1]新潟大　院医歯　歯科薬理，[2]新潟大　院医歯　口腔病理）

**O1-F6**
酸性細胞外 pH は，EMT を促進誘導する微小細胞外環境因子として機能するか？
○鈴木　厚子，前田　豊信，湯澤　　仁，加藤　靖正（奥羽大　歯　口腔生化）

9月12日（土）16：00～16：30　F会場（中会議室301A）

## 骨・軟骨・骨代謝1・・・・・・・・・・・・・・・・・座長：網塚　憲生（北大　院歯　硬組織発生）

**O1-F7**
Curdlan 誘導オートファジーによる syk の分解を介した破骨細胞分化制御機構
○有吉　　渉，沖永　敏則，西原　達次（九歯大　感染分子生物）

**O1-F8**
PTH の投与頻度の違いによるリモデリング・ミニモデリングを基盤とした骨形成
○山本知真也[1]，長谷川智香[1]，本郷　裕美[1]，原口　真衣[1]，織田　公光[2]，網塚　憲生[1]（[1]北大　院歯　硬組織発生，[2]新潟大　院医歯　口腔生化）

**O1-F9**
副甲状腺ホルモン（PTH）間歇投与による骨代謝マーカーと形態組織学的変化について
○廣瀬　勝俊，佐藤　　淳，大家　香織，野田　百合，社領　美紀，豊澤　　悟（大阪大　院歯　口腔病理）

9月12日（土）16：30～17：00　F会場（中会議室301A）

## 骨・軟骨・骨代謝2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・座長：天野　　修（明海大　歯　解剖）

**O1-F10**
軟骨内骨化および骨成長における NF-$\kappa$B の時間・空間的制御機構の解明
○中富　千尋，浦田真梨子，松原　琢磨，古株彰一郎，自見英治郎（九歯大　分子情報生化）

**O1-F11**
マウスメッケル軟骨におけるセプトクラストの局在と三次元的形態
○坂下　　英[1,2]，坂東　康彦[1]，平良芙蓉子[1,2]，崎山　浩司[1]，天野　　修[1]（[1]明海大　歯　解剖，[2]明海大　歯　口腔顎顔面外科）

**O1-F12**
レチノイン酸欠乏・過剰による septoclast の増殖抑制と形態変化の誘導
○坂東　康彦，坂下　　英，崎山　浩司，天野　　修（明海大　歯　解剖）

9月12日（土）11：00～11：30　G会場（中会議室301B）

## 微生物／自然免疫・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：中田　匡宣（大阪大　院歯　口腔細菌）

**O1-G1**
*Streptococcus sanguinis* による IL-1$\alpha$ 産生誘導活性
○佐伯　　歩[1]，長谷部　晃[1]，中澤　　太[2]，柴田健一郎[1]（[1]北大　院歯　口腔分子微生，[2]北医療大　歯　微生物）

**O1-G2**
咀嚼粘膜に発現する B7-H1 は過度な免疫応答による損傷を保護している
○Kang Siwen，大野　建州，永井　重徳，東　みゆき（医科歯科大　院医歯　分子免疫）

**O1-G3**
*Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading に関与する因子について
○今村　圭吾[1]，近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，成田　由香[3]，藤原　　卓[1]，中山　浩次[2]（[1]長崎大　院医歯薬　小児歯，[2]長崎大　院医歯薬　微生物，[3]福歯大　感染生物）

9月12日（土）11：30～12：00　G会場（中会議室301B）

## 微生物・感染・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：古西　清司（日本歯大　生命歯　微生）

| | |
|---|---|
| O1-G4 | *Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素に着目した分子進化解析<br>○山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，広瀬雄二郎[1,2]，後藤　花奈[1]，住友　倫子[1]，川端　重忠[1]（[1]大阪大　院歯　口腔細菌，[2]名大院医　泌尿器） |
| O1-G5 | 口腔バイオフィルム初期形成期における cyclic dipeptide の影響<br>○眞島いづみ[1,2]，宮川　博史[2]，中澤　太[2]（[1]学振　特別研究員　PD，[2]北医療大　歯　微生物） |
| O1-G6 | *Salmonella* Typhimurium の細胞内増殖は PLC-related catalytically inactive protein によるオートファジー調節により抑制される<br>○原田　佳枝，兼松　隆（広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理） |

9月12日（土）16：00～16：30　G会場（中会議室301B）

## 神経　1・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：山村　健介（新潟大　院医歯　口腔生理）

| | |
|---|---|
| O1-G7 | 除脳ラット灌流標本を用いた上気道筋群の支配神経活動への $CO_2$負荷の影響<br>○立川　哲史[1]，中山希世美[1]，望月　文子[1]，中村　史朗[1]，清本　聖文[1]，飯島　毅彦[2]，井上　富雄[1]（[1]昭和大　歯　口腔生理，[2]昭和大　歯　歯科麻酔） |
| O1-G8 | マウス咬筋の筋活動に対するシタロプラムの影響<br>○野川　泰葉[1,2]，望月　文子[1]，加藤　隆史[3]，片山　慶祐[4]，安部　友佳[4]，中村　史朗[1]，中山希世美[1]，若林　則幸[2]，馬場　一美[4]，井上　富雄[1]（[1]昭和大　歯　口腔生理，[2]医科歯科大　院医歯　部分床義歯補綴，[3]大阪大　院歯　口腔解剖2，[4]昭和大　歯　補綴） |
| O1-G9 | 外側手綱核から三叉神経中脳路核ニューロンへの直接投射<br>○大原　春香[1,2]，佐藤　文彦[1]，加藤　隆史[1]，山城　隆[2]，吉田　篤[1]（[1]大阪大　院歯　口腔解剖2，[2]大阪大　院歯　矯正） |

9月12日（土）16：30～16：50　G会場（中会議室301B）

## 神経　2・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：吉田　篤（大阪大　院歯　高次脳口腔機能）

| | |
|---|---|
| O1-G10 | 摂食行動と内臓感覚とを結びつける新たな神経回路<br>○岩井　治樹，倉本恵梨子，山中　淳之，後藤　哲哉（鹿児島大　院医歯　機能形態） |
| O1-G11 | 下行性痛覚抑制系における視床-皮質投射の機能を形態学的に解析する<br>○倉本恵梨子，岩井　治樹，山中　淳之，後藤　哲哉（鹿児島大　院医歯　機能形態） |

9月13日（日）11：00～11：30　C会場（中会議室201）

## 薬理作用・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：山﨑　純（福歯大　細胞分子生物）

| | |
|---|---|
| O2-C1 | $\beta_2$アドレナリン受容体刺激による骨格筋肥大に対する cAMP 活性化因子 Epac の役割<br>○大貫　芳樹[1]，梅木　大輔[2]，伊藤　愛子[2]，奥村　敏[1]（[1]鶴見大　歯　口腔生理，[2]鶴見大　歯　歯科矯正） |
| O2-C2 | 腫瘍及び非腫瘍細胞由来アルカリ性ホスファターゼ活性の阻害物質に対する反応性の比較<br>○川村　良[1,3]，出山　義昭[2,4]，吉村　善隆[2]，鈴木　邦明[2]，山崎　裕[1]（[1]北大　院歯　高齢者，[2]北大　院歯　細胞分子薬理，[3]松崎歯科医院，[4]ポプラアベニュー歯科クリニック） |
| O2-C3 | 3-Deazaneplanocin A は口腔がん細胞の遺伝子発現パターンを変化させる<br>○八田　光世[1]，永沼　香織[2]，有田　晴一[1,3]，石井　太郎[1,4]，大久保つや子[1]，山崎　純[1]（[1]福歯大　細胞分子生物，[2]福歯大　口腔顎顔面外，[3]福歯大　口腔治療，[4]福歯大　成長発達歯） |

## 9月13日（日）11：30～12：00　C会場（中会議室201）

### 骨・軟骨・骨代謝・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：二藤　　彰（鶴見大　歯　薬理）

| | |
|---|---|
| O2-C4 | ハイドロキシアパタイトはマウス顎骨へのチタンインプラント即時埋入後の接触性骨形成に影響を及ぼす<br>○渡辺　泰典，斎藤浩太郎，大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態） |
| O2-C5 | アネキシンA5欠損マウスは歯の咬耗と腱付着部における顎骨の肥大を呈する<br>○島田　明美[1]，小松浩一郎[1]，新井　嘉則[2]，大貫　芳樹[3]，中島　和久[1]，山下　照仁[4]，奥村　　敏[3]，二藤　　彰[1]（[1]鶴見大　歯　薬理，[2]日本大　歯，[3]鶴見大　歯　口腔生理，[4]松本歯大　硬組織機能解析） |
| O2-C6 | Semaphorin 3A は cdk6 タンパク質発現の低下と STAT3 の tyrosine 705 リン酸化阻害を伴い骨細胞の細胞突起を伸長させる<br>○新村　昌弘[1,2]，佐藤　　毅[1]，林　　直樹[1]，大久保正彦[1]，榎木祐一郎[1]，古株彰一郎[3]，依田　哲也[1]（[1]埼玉医大　医　口腔外科，[2]新村歯科医院，[3]九歯大　分子情報生化） |

## 9月13日（日）11：00～11：30　D会場（中会議室302A）

### 骨・軟骨・骨代謝／その他・・・・・・・・・・・・・　座長：江尻　貞一（朝日大　歯　口腔解剖）

| | |
|---|---|
| O2-D1 | 骨／インプラント界面の静的圧縮応力に対する骨の反応 ―静的圧縮の限界応力に関する研究― <br>○井汲　憲治，須澤　徹夫，吉村健太郎，上條竜太郎（昭和大　歯　口腔生化） |
| O2-D2 | ビーグル犬インプラント周囲顎骨における生体アパタイト結晶配向性<br>○小高　研人，松永　　智，廣内　英智，笠原　正彰，阿部　伸一（東歯大　院歯　解剖） |
| O2-D3 | 電解酸性機能水の生物学的機能<br>○浅野　正岳（日本大　歯　病理） |

## 9月13日（日）11：30～12：00　D会場（中会議室302A）

### 炎症・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：寺尾　　豊（新潟大　院医歯　微生物）

| | |
|---|---|
| O2-D4 | 慢性炎症に関連する NLRP3 インフラマソームの活性化機構の解析<br>○村上　智彦，高畑　佳史，波多　賢二，西村　理行（大阪大　院歯　生化） |
| O2-D5 | オメガ3脂肪酸は歯周病細菌が誘導するインフラマソーム活性を抑制する<br>○沖永　敏則，有吉　　渉，西原　達次（九歯大　感染分子） |
| O2-D6 | Smad3 活性化を介した窒素含有 bisphosphonate による caspase-1 放出の増加<br>○玉井利代子，小林美智代，清浦　有祐（奥羽大　歯　口腔病態解析制御） |

## 9月13日（日）11：00～11：30　E会場（中会議室302B）

### 骨・軟骨・骨代謝／骨代謝・・・・・・・・・・・・・・・・　座長：自見英治郎（九歯大　生化）

| | |
|---|---|
| O2-E1 | 破骨細胞アクチンリングに局在する新規分子 PPP1r18<br>○松原　琢磨[1]，金原　正敬[2]，前田　敏博[2]，吉澤　光弘[2]，中富　千尋[1]，古株彰一郎[1]，自見英治郎[1]，山本　照子[2]（[1]九歯大　分子情報生化，[2]東北大　院歯　顎口腔矯正） |
| O2-E2 | 骨吸収の促進は骨細胞における sclerostin の発現を低下させ，Wnt/$\beta$-catenin シグナルを促進する<br>○小出　雅則[1]，小林　泰浩[1]，山下　照仁[1]，上原　俊介[2]，飯村　忠浩[3]，中村美どり[2]，高橋　直之[1]，宇田川信之[1,2]（[1]松本歯大　分子硬組織，[2]松本歯大　口腔生化，[3]愛媛大　プロテオサイエンスセ） |
| O2-E3 | BMP2 は転写因子 Osterix と Msx2 を介して変形性関節症の創薬ターゲット，Wnt アンタゴニスト FRZB の発現を制御する<br>○八木　寛子，高畑　佳史，村上　智彦，波多　賢二，西村　理行（大阪大　院歯　生化） |

9 月 13 日（日）11：30～12：00　E 会場（中会議室 302B）

**骨代謝**・・・・・・・・・・・・・・・・座長：**滝川　正春（岡山大　院医歯薬　歯先端研センター）**

| | |
|---|---|
| **O2-E4** | 破骨細胞分化における新規アクチン骨格制御因子としての DCL-1/CD302 の役割と CCN2 との関連<br>○青山絵理子[1]，星島　光博[1]，服部　高子[2]，久保田　聡[1,2]，滝川　正春[1]（[1]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター，[2]岡山大　院医歯薬　口腔生化） |
| **O2-E5** | CCN2 は骨細胞を介して破骨細胞形成を制御する<br>○西田　　崇[1]，久保田　聡[1,2]，服部　高子[1]，滝川　正春[2]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔生化，[2]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター） |
| **O2-E6** | CCN2 と Rab14 の相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割　～軟骨分化促進因子 CCN2 の新たな細胞内機能～<br>○星島　光博[1]，服部　高子[3]，青山絵理子[2]，西田　　崇[3]，久保田　聡[3]，上岡　　寛[1]，滝川　正春[2]（[1]岡山大　院医歯薬　矯正，[2]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター，[3]岡山大　院医歯薬　口腔生化） |

9 月 13 日（日）11：00～11：30　F 会場（中会議室 301A）

**骨代謝／シグナル伝達**・・・・・・・・・・・・・　座長：**羽地　達次（徳島大　院医歯薬　口組）**

| | |
|---|---|
| **O2-F1** | Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha のリン酸化を介した骨芽細胞分化促進および破骨細胞分化抑制の分子機構<br>○浜村　和紀，戸苅　彰史（愛院大　歯　薬理） |
| **O2-F2** | プロテインホスファターゼ PP2A C$\alpha$ は骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する<br>○岡村　裕彦，寺町　順平，羽地　達次（徳島大　院医歯薬　口組） |
| **O2-F3** | 骨縫合部組織における機械的伸展刺激による骨芽細胞形成促進機構への YAP/TAZ の関与<br>○池亀　美華[1,2]，山本　敏男[1]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態，[2]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター） |

9 月 13 日（日）11：30～12：00　F 会場（中会議室 301A）

**シグナル伝達**・・・・・・・・・・・・・・・・・座長：**平田　雅人（九州大　院歯　口腔細胞工学）**

| | |
|---|---|
| **O2-F4** | 長期的なオステオカルシンの経口投与による代謝の改善とその性差<br>○溝上　顕子，川久保-安河内友世，平田　雅人（九大　院歯　口腔細胞工学） |
| **O2-F5** | PRIP によるエネルギー代謝調節機構<br>○兼松　　隆（広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理） |
| **O2-F6** | TGF-beta 誘導性 EMT における Stat3 の役割<br>○齋藤　正夫（山梨大　院医　生物化学） |

9 月 13 日（日）11：00～11：30　G 会場（中会議室 301B）

**発生・再生／発生・分化**・・・・・・・・・・・座長：**大島　勇人（新潟大　院医歯　硬組織形態）**

| | |
|---|---|
| **O2-G1** | マウス顎顔面発生における静脈からのリンパ管内皮細胞の分化<br>○田谷　雄二，添野　雄一，白子　要一，青葉　孝昭，佐藤かおり（日本歯大　生命歯　病理） |
| **O2-G2** | 口蓋発生における *Ofd1* の役割について<br>○渡部　桃子[1,2]，川崎真依子[1]，高木　律男[2]，前田　健康[1]，大峡　　淳[1]（[1]新潟大　院医歯　口腔解剖，[2]新潟大　院医歯　顎顔面口外） |
| **O2-G3** | 胎生期マウスにおける咽頭筋形成期の MRFs の発現<br>○岸　　飛鳥，斉藤　　博，宇佐美晶信（奥羽大　歯　口腔解剖） |

9月13日（日）11：30～12：00　G会場（中会議室301B）

## 発生・再生／神経細胞・・・・・・・・・・・・・・・　座長：原田　英光（岩医大　歯　発生生物）

| | |
|---|---|
| O2-G4 | 歯髄細胞由来スフェロイドは三次元培養下で機能的な神経細胞に分化した<br>○肖　　黎[1]，佐伯　周子[2]，井出　良治[2]（[1]日本歯大　生命歯　薬理，[2]日本歯大　生命歯　生理） |
| O2-G5 | 温度制御式反復温熱刺激はPC12細胞の神経細胞分化を誘導する<br>○工藤　忠明[1]，金高　弘恭[2]（[1]東北大　院歯　口腔生理，[2]東北大　院歯 歯学イノベーション） |
| O2-G6 | 神経細胞分化におけるリゾリン脂質アシル転移酵素の働き<br>○田部　士郎[1,2]，引地　尚子[3]，有吉　　渉[1]，沖永　敏則[1]，西原　達次[1]（[1]九歯大　感染分子，[2]九歯大　顎顔面外科，[3]九歯大　口腔機能支援） |

## ■ 一般演題（ポスター）

9月12日（土）17：00～18：00　ポスター会場1

### モリタ賞　解剖学

**P1-1**
鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）の分子形態学的解析
○武藤　麻未[1]，木村　俊介[2]，吉沢　早織[1]，岩永　敏彦[2]，飯田順一郎[1]（[1]北大　院歯　矯正，[2]北大　院歯　解剖　組織）

**P1-2**
口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤
○吉本　怜子[1]，合島怜央奈[2]，吉住　潤子[3]，木附　智子[3]，檀上　敦[4]，山下　佳雄[4]，城戸　瑞穂[5]（[1]九大　院歯　歯周病，[2]佐賀大　医　組織　神経解剖，[3]九大　院歯　顔面口腔外科，[4]佐賀大　医　歯科口腔外科，[5]九大　院歯　分子口腔解剖）

**P1-3**
歯髄処置経験を有するヒト乳歯歯根吸収面にみられる破歯細胞の核数について
○八木原　澄[1]，土門　卓文[2]，八若　保孝[1]（[1]北大　院歯　小児障害者，[2]北大　院歯　口腔機能解剖）

**P1-4**
機械的荷重によるインプラント周囲骨のオステオネットワークと生体アパタイトの優先配向の変化
○佐々木宗輝[1]，黒嶋伸一郎[1]，中野　貴由[2]，澤瀬　隆[1]（[1]長崎大　院医歯薬　インプラント，[2]大阪大　院工　生体材料）

**P1-5**
シンバスタチンを用いた iPS 細胞凝集体による骨誘導能
○大川　博子[1,2]，河阪　幸宏[1]，新部　邦透[1]，矢谷　博文[2]，江草　宏[1,2]（[1]東北大　院歯　分子　再生補綴，[2]大阪大　院歯　クラウンブリッジ）

**P1-6**
骨粗鬆症モデルマウスを用いた下顎骨と脛骨の形態計測
○森田　純晴，小高　研人，笠原　正彰，松永　智，阿部　伸一（東歯大　解剖）

**P1-7**
レクチン様酸化 LDL 受容体-1（LOX-1）欠損は定常状態の破骨細胞形成を促進するが，LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す
○伊東　順太，林田千代美，大山　洋子，佐藤　卓也，羽毛田慈之（明海大　歯　口腔解剖）

**P1-8**
ラット咬筋神経損傷後の三叉神経運動核におけるミクログリアとアストロサイトの動態
○小倉　秀[1,2]，本間　志保[1,3]，脇坂　聡[1]，古郷　幹彦[2]（[1]大阪大　院歯　口腔解剖1，[2]大阪大　院歯　口腔外科1，[3]梅花女大　看護保健　口腔保健）

**P1-9**
ラット口腔顔面領域における TRPM8 陽性神経線維の分布
○矢島　健大[1]，佐藤　匡[2]，市川　博之[2]（[1]東北大　院歯　歯科保存，[2]東北大　院歯　口腔器官構造）

### モリタ賞　生化学

**P1-10**
p46JNK2 の構成的活性は脂肪分化前期における C/EBPδ の発現に必須である
○楠山　譲二[1,2]，坂東健二郎[3]，大西　智和[2]，仙波伊知郎[1]，松口　徹也[2]（[1]鹿児島大　院医歯　口腔病理，[2]鹿児島大　院医歯　口腔生化，[3]明海大　歯　口腔生物再生医工）

**P1-11**
進行性骨化性線維異形成症（FOP）の ALK2 変異体の活性化機構における FKBP12 と BMPII 型受容体の役割
○町谷亜位子[1,2]，藤本　舞[1,2]，須田　直人[2]，片桐　岳信[1]（[1]埼玉医大　ゲノム　病態生理，[2]明海大　歯　矯正）

**P1-12**
Zolerdronic acid は TGF-β 刺激による歯肉線維芽細胞の受容体発現に伴う Smad- 経路を介した線維化機構を阻害する
○小松ゆう子[1,2]，衣斐　美歩[3]，帖佐　直幸[2]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，杉山　芳樹[1]，石崎　明[2]（[1]岩医大　歯　口外，[2]岩医大　歯　生化，[3]岩医大　薬　分子細胞薬理）

**P1-13**
BHD 複合体分子 FNIP2 タンパクの量的制御機構は mTORC シグナル活性を制御する
○永嶌　勝之[1,2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，緒方佳代子[1]，長岡　良礼[1,2]，岡部　幸司[1]（[1]福歯大　院歯　生理，[2]福歯大　院歯　口腔外科）

**P1-14**
ブタ乳歯歯根周囲組織に存在する TGF-β の作用
○島崎　絵美[1]，唐木田丈夫[2]，大井田新一郎[2]，朝田　芳信[1]，山越　康雄[2]（[1]鶴見大　歯　小児歯科，[2]鶴見大　歯　生化）

**P1-15**
ブタ歯髄および象牙質中の TGF-β1 の存在様式について
○丹羽　堯彦[1]，山本　竜司[2]，山川駿二郎[3]，長野　孝俊[1]，大井田新一郎[2]，五味　一博[1]，山越　康雄[2]（[1]鶴見大　歯　保存Ⅱ，[2]鶴見大　歯　生化，[3]鶴見大　歯　保存Ⅱ）

**P1-16**
ブリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略ー唾液浸漬モデルによる検討ー
○飯塚　純子[1]，谷口　紀江[2]，高垣　裕子[3]，向井　義晴[1]（[1]神奈川歯科大　う蝕制御修復，[2]神奈川歯科大　放射線応用，[3]神奈川歯科大　院歯）

**P1-17**
IL-1β 誘導オートファジー関連遺伝子 Atg5 は Wnt5 シグナルを介してマウス ES 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する
○檜山　太希[1]，尾関　伸明[1]，山口　秀幸[1]，川合　里絵[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]（[1]愛院大　歯　歯内治療，[2]愛院大　薬　生体機能）

**P1-18**
患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立
○小野寺晶子[1]，齋藤　暁子[1]，篠-落合　宏美[1]，大高真奈美[4]，大木　章生[2]，長谷川大悟[3]，柴原　孝彦[3]，末石　研二[2]，中西　真人[4]，東　俊文[1]（[1]東歯大　生化，[2]東歯大　矯正，[3]東歯大　口腔顎顔面外科，[4]産業技術総合研）

| | |
|---|---|
| P1-19 | 神経堤由来細胞に発現する Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Cdc42 は口蓋形成に必須である<br>○大島　睦子[1,2]，山田　篤[1]，鈴木　大[1]，槙　宏太郎[2]，上條竜太郎[1]（[1]昭和大　歯　口腔生化，[2]昭和大　歯　矯正） |
| P1-20 | 培養幹細胞を併用した象牙質顆粒の骨補填材としての動態評価<br>○奥野公巳郎[1,2]，川木　晴美[2]，田中　雅士[1]，小栗　健策[1]，河野　哲[1]，神谷　真子[2,3]，高山　英次[2]，吉田　隆一[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　歯内療法，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学） |
| P1-21 | CCN4/WISP-1 は TGF-b3 誘導性軟骨細胞分化を正に制御する<br>○吉岡　裕也，大野　充昭，窪木　拓男（岡山大　院医歯薬　インプラント） |
| P1-22 | 親水化チタン基盤上でのヒト骨髄由来幹細胞の動態解析<br>○新谷　耕平[1,2]，川木　晴美[2]，神谷　真子[2,3]，高山　英次[2]，土井　豊[4]，堀田　正人[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　歯冠修復，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学，[4]朝日大　歯　理工） |
| P1-23 | 変動磁場刺激に対するマウス骨芽細胞様細胞の遺伝子解析<br>○福澤　蘭，尾澤　昌悟，小島　規永，武部　純（愛院大　歯　有床義歯） |
| P1-24 | iPS 細胞由来骨補填材料の開発<br>○山本　治毅[1]，萱島　浩輝[1]，矢谷　博文[1]，江草　宏[1,2]（[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ，[2]東北大　院歯　分子　再生補綴） |
| P1-25 | 炭酸含有アパタイト骨補填材を用いた骨再生評価<br>○高橋　潤[1,2]，川木　晴美[2]，近藤　雄三[1]，神谷　真子[2,3]，高山　英次[2]，土井　豊[4]，田辺俊一郎[1]，永原　國央[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　インプラント，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学，[4]朝日大　歯　理工） |
| P1-26 | ヒアルロン酸は生物学的活性により C28/I2 細胞の MMP13 発現を抑制する<br>○古田　絢也[1,2]，沖永　敏則[1]，有吉　渉[1]，西原　達次[1]（[1]九歯大　院歯　感染分子生物，[2]九歯大　院歯　顎顔面外科） |
| P1-27 | 口腔扁平上皮癌細胞における圧受容による増殖制御機構<br>○吉本　尚平[1]，森田　浩光[3]，中村　誠司[2]，平田　雅人[1]（[1]九大　院歯　口腔細胞工，[2]九大　院歯　顎顔面腫瘍制御，[3]福歯大　総合歯科） |
| P1-28 | TPD52 ファミリータンパクの遺伝子発現制御の検索<br>○本橋　宏美，椋代　義樹（昭和大　歯　口腔外科） |
| P1-29 | マウス口腔扁平上皮癌の悪性形質獲得に伴う脾細胞の抗腫瘍免疫応答の変化<br>○鷲見　成紀[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，伊藤　宏衣[1,2]，足立　充隆[1,2]，稲垣　俊弘[1,2]，村松　泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　口腔外科，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学） |
| P1-30 | マウス口腔扁平上皮癌細胞株（Sq1979）の液性因子による間葉系細胞（10T1/2）を介した c-c motif chemokine 2（Ccl2）発現の誘導<br>○伊藤　宏衣[1,2]，足立　充隆[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，稲垣　俊弘[1,2]，鷲見　成紀[1,2]，村松　泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　口腔外科，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学） |
| P1-31 | マウス口腔扁平上皮癌の悪性化にともなう脾細胞のサイトカイン産生能の改変機構<br>○稲垣　俊弘[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，伊藤　宏衣[1,2]，鷲見　成紀[1,2]，足立　充隆[1,2]，住友伸一郎[1]，村松　泰徳[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　口腔外科，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学） |

## モリタ賞　生理学

| | |
|---|---|
| P1-32 | 歯の石灰化における TRPM7 の役割<br>○緒方佳代子[1,2]，岡　暁子[2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，永嶌　勝之[1]，尾崎　正雄[2]，岡部　幸司[1]（[1]福歯大　細胞生理，[2]福歯大　成育小児歯） |
| P1-33 | 象牙芽細胞における store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）（$Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$（CARC）channels）の発現<br>○木村　麻記，佐藤　正樹，小島　佑貴，東川明日香，鴇田みゆき，小倉　一宏，望月　浩幸，田崎　雅和，澁川　義幸（東歯大　生理） |
| P1-34 | マウス歯周炎モデルにおける歯周組織の機械痛覚に対する CXCR4 の関与<br>○長嶋　秀和[1]，篠田　雅路[2]，菅野　直之[1]，佐藤　秀一[1]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　歯周病，[2]日本大　歯　生理） |
| P1-35 | KK-Ay 糖尿病モデルマウスにおける唾液腺機能低下<br>○宗政　翔[1]，向坊　太郎[1]，近藤　祐介[1]，楠田優一郎[1]，宮城　勇大[1]，正木　千尋[1]，細川　隆司[1]，中本　哲自[1,2]（[1]九歯大　口腔再建リハ，[2]松本歯大　歯科補綴） |
| P1-36 | *in vitro* 振動刺激負荷装置の開発と振動刺激が培養骨芽細胞分化に及ぼす影響<br>○太田　岳，千葉　美麗，林　治秀（東北大　院歯　口腔生理） |
| P1-37 | TNBS 誘発舌熱痛覚過敏に対する三叉神経節内 p38 のリン酸化の役割<br>○丸野　充[1,2]，伊藤　玲央[1,2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　補綴，[2]日本大　歯　生理） |
| P1-38 | 代謝型グルタミン酸受容体を介したシグナルの癌性疼痛および癌の増殖・分化への関与<br>○本田　訓也，篠田　雅路，岩田　幸一（日本大　歯　生理） |
| P1-39 | 顎関節炎に随伴した咬筋痛に対する活性型 satellite cell の役割<br>○伊藤　玲央[1,2]，丸野　充[1,2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　補綴，[2]日本大　歯　生理） |

| | |
|---|---|
| P1-40 | 青斑核ニューロンと三叉神経中脳路核ニューロン間のシナプス結合様式の解析<br>○尹　東旭，齋藤　充，佐藤　元，河野　奨，豊田　博紀，姜　英男（大阪大　院歯　顎治） |
| P1-41 | PRIP-1/2 ダブルノックアウトマウスのバレル皮質第 3 層錐体細胞における SOCE の増大<br>○河野　奨[1]，豊田　博紀[1]，齋藤　充[1]，佐藤　元[1]，尹　東旭[1]，兼松　隆[2]，平田　雅人[3]，姜　英男[1]（[1]大阪大　院歯　口腔生理，[2]広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理，[3]九大　院歯　口腔生化） |
| P1-42 | 咬筋運動ニューロン樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニンの効果<br>○壇辻　昌典[1,2]，中村　史朗[2]，中山希世美[2]，望月　文子[2]，清本　聖文[2]，尾関　雅彦[1]，井上　富雄[2]（[1]昭和大　歯　歯科インプラント，[2]昭和大　歯　口腔生理） |
| P1-43 | ヒスタミンはシナプス前 H1 受容体を介して三叉神経中脳路核から咬筋運動ニューロンへの入力を抑制する<br>○玄番千夏子[1,2]，中山希世美[2]，望月　文子[2]，中村　史朗[2]，井上美津子[1]，井上　富雄[2]（[1]昭和大　歯　小児成育歯科，[2]昭和大　歯　口腔生理） |
| P1-44 | ラットの術後性回復と安静睡眠時の末梢刺激応答性変化<br>○尾台　令奈[1]，安達　一典[2]，渡部　茂[1]，坂上　宏[2]（[1]明海大　歯　小児歯，[2]明海大　歯　薬理） |
| P1-45 | Vc 侵害受容ニューロンにおける AMPA 受容体のリン酸化は舌乾燥に起因する舌痛に関与する<br>○中谷　有香[1]，坪井　美行[2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　口腔診断，[2]日本大　歯　生理） |
| P1-46 | 三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄に分布する視床投射ニューロンにおける Extracellular Signal-regulated Kinase のリン酸化<br>○斎藤　弘人[1,2]，片桐　綾乃[2]，岩田　幸一[2]（[1]日本大　歯　補綴，[2]日本大　歯　生理） |
| P1-47 | 気圧センサを用いた鼻咽腔閉鎖機能評価の検討<br>○長谷川真奈[1,2]，山田　好秋[3]，黒瀬　雅之[2]，藤井　規孝[1]，山村　健介[2]（[1]新潟大　医歯病　歯総診，[2]新潟大　院医歯　口腔生理，[3]東歯大　口腔科学研究セ） |
| P1-48 | ビジュアルフィードバックを用いた随意的口唇閉鎖力調節能力に対する加齢の影響<br>○土屋　恵子[1]，山田　一尋[1]，増田　裕次[2]（[1]松本歯大　分子硬組織，[2]松本歯大　顎口腔機能） |
| P1-49 | 5ーフルオロウラシル投与ラットおける口内炎誘発疼痛のメカニズム<br>○山口喜一郎[1,2]，小野堅太郎[1]，人見　涼露[1]，原野　望[2]，左合　徹平[2]，渡邊　誠之[2]，稲永　清敏[1]（[1]九歯大　生理，[2]九歯大　歯科侵襲制御） |
| P1-50 | 矯正ワイヤーによる新規口内炎モデルラットの開発<br>○伊藤　美紗[1]，小野堅太郎[2]，人見　涼露[2]，山口喜一郎[2]，川元　龍夫[1]，稲永　清敏[2]（[1]九歯大　顎口腔機能，[2]九歯大　生理） |
| P1-51 | 味細胞におけるエンドカンナビノイドを介した甘味応答の自己増幅<br>○岩田　周介，吉田　竜介，重村　憲徳，二ノ宮裕三（九大　院歯　口腔機能解析） |

## モリタ賞　組織・発生学

| | |
|---|---|
| P1-52 | ヘルトヴィッヒ上皮鞘は，EMT を起こし歯根膜形成に関与する<br>○板家　智[1]，岡　暁子[1]，立岡　迪子[1]，藤原　尚樹[2]，原田　英光[2]，尾崎　正雄[1]（[1]福歯大　成育小児，[2]岩医大　解剖発生・再生） |
| P1-53 | TRPV4 遺伝子欠失が歯肉付着上皮における物質透過性に与える影響<br>○木附　智子[1]，合島怜央奈[1,3]，畠山　純子[1,4]，大崎　康吉[1]，張　旌旗[1]，城戸　瑞穂[1]（[1]九大　院歯　分子口腔解剖，[2]九大　院歯　口腔顎顔面外科，[3]佐賀大　医　歯科口腔外科，[4]福歯大　保存） |
| P1-54 | ジルコニアおよびチタンディスク上における骨芽細胞分化の比較<br>○斉藤　まり[1]，唐木田丈夫[1]，山本　竜司[1]，長野　孝俊[2]，山越　康雄[1]，五味　一博[2]，大井田新一郎[1]（[1]鶴見大　歯　生化，[2]鶴見大　歯　保存Ⅱ） |
| P1-55 | ヒト頬脂肪体由来幹細胞を細胞源とした神経再生療法に関する検討<br>○高橋　悠[1,2]，石川　博[2]，田中　彰[1,3]（[1]日歯新潟　口外，[2]日本歯大　生命歯，[3]日歯新潟　先端研） |
| P1-56 | 新規 Wnt シグナル調節因子 PKP1 の歯の発生における役割<br>○宮崎佳奈子，吉崎　恵悟，新井智映子，韓　雪，鮒田　啓太，高橋　一郎（九大　院歯　矯正） |
| P1-57 | 基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に関与する<br>○新井智映子，吉崎　恵悟，宮崎佳奈子，韓　雪，鮒田　啓太，高橋　一郎（九大　院歯　矯正） |
| P1-58 | マウス口蓋創傷モデルの治癒過程における上皮間葉転換関連分子の発現解析<br>○合島怜央奈[1,2]，木附　智子[3]，吉本　怜子[3]，大崎　康吉[3]，張　旌旗[3]，檀上　敦[2]，山下　佳雄[2]，城戸　瑞穂[3]（[1]佐賀大　医　組織　神経解剖，[2]佐賀大　医　口腔外科，[3]九大　院歯　分子口腔解剖） |
| P1-59 | ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素 G9a は正常な歯牙形成に必要である<br>○上運天太一[1]，出野　尚[2]，中村　芳樹[1]，中島　和久[2]，島田　明美[2]，二藤　彰[2]（[1]鶴見大　歯　歯科矯正，[2]鶴見大　歯　薬理） |
| P1-60 | CD146 陽性ヒト歯髄幹細胞の細胞特性解析<br>○松井美紀子，小林　朋子，筒井　健夫（日本歯大　生命歯　薬理） |

| | |
|---|---|
| **P1-61** | 非可逆性炎歯髄由来幹細胞は歯髄再生治療に応用可能か？<br>○園田聡一朗[1,2]，山座　孝義[2]，久木田敏夫[2]（[1]九大　院歯　歯周病，[2]九大　院歯　分子口腔解剖） |
| **P1-62** | 歯槽骨に及ぼすパラソルモンの間欠投与の影響<br>○建部　廣明，入江　一元（北医療大　歯　口腔構造　機能発育） |
| **P1-63** | 副甲状腺ホルモン投与ならびに授乳期にカルシウム欠乏食投与によって誘導される骨細胞周囲の骨基質変化について<br>○本郷　裕美[1]，佐々木宗輝[2]，斎藤　雅美[3]，宇田川信之[4]，網塚　憲生[1]（[1]北大　院歯　硬組織発生，[2]長崎大　院医歯薬　インプラント，[3]ブルカー AXS（株），[4]松本歯大　口腔生化） |
| **P1-64** | 糖尿病が骨細胞に与える組織化学的影響について　ーSDT fatty ラットを用いた解析ー<br>○坪井香奈子，本郷　裕美，長谷川智香，網塚　憲生（北大　院歯　硬組織発生） |
| **P1-65** | Galectin-9 による破骨細胞形成抑制機構：MafB 制御系関与の可能性<br>○久本由香里[1]，上原　範久[1]，久木田明子[2]，久木田敏夫[1]（[1]九大　院歯　分子口腔解剖，[2]佐賀大　医　微生物） |
| **P1-66** | メカニカルストレスによる破骨細胞形成および骨吸収に対する IL-18 の影響の解析<br>○越智由美子，北浦　英樹，木村　桂介，石田　匡彦，岸川　明子，山本　照子（東北大　院歯　顎口腔矯正） |
| **P1-67** | 軟骨内骨化における血管内皮細胞の微細構造学的検索<br>○土屋恵李佳[1,2]，本郷　裕美[1]，山本知真也[1]，長谷川智香[1]，網塚　憲生[1]（[1]北大　院歯　硬組織発生，[2]北大　院歯　口腔診断内科） |
| **P1-68** | 移植した自家骨組織の経時的観察<br>○中原　　賢[1]，五十嵐健輔[2]，辻村麻衣子[3]（[1]日歯新潟　先端研，[2]日本歯大　生命歯，[3]日歯新潟　解剖 2） |
| **P1-69** | 口腔粘膜上皮におけるタイトジャンクション構成タンパクの局在<br>○塩津　範子[1,2]，池亀　美華[2]，鳥井　康弘[1]，山本　敏男[2]（[1]岡大病院　総合，[2]岡山大　院医歯薬　口腔形態） |

## モリタ賞　微生物学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

| | |
|---|---|
| **P1-70** | 口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明<br>○田崎　園子[1,2]，長　　　環[1]，永尾　潤一[1]，成田　由香[1]，橋本麻利江[1]，小島　　寛[2]，田中　芳彦[1]（[1]福歯大　感染生物，[2]福歯大　障害者歯） |
| **P1-71** | 咀嚼粘膜に発現する B7-H1 は過度な免疫応答による損傷を保護している<br>○KANG Siwen，大野　建州，永井　重徳，東　みゆき（医科歯科大　院医歯　分子免疫） |
| **P1-72** | 新規免疫系シグナル分子によるアレルギー制御機構の解明<br>○橋本麻利江[1]，永尾　潤一[1]，田崎　園子[1]，成田　由香[1]，長　　　環[1]，湯浅　賢治[2]，田中　芳彦[1]（[1]福歯大　感染生物，[2]福歯大　画像診断） |
| **P1-73** | 口腔バイオフィルム初期形成期における cyclic dipeptide の影響<br>○眞島いづみ[1,2]，宮川　博史[2]，中澤　　太[2]（[1]学振　特別研究員　PD，[2]北医療大　歯　微生物） |
| **P1-74** | *Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素に着目した分子進化解析<br>○山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，広瀬雄二郎[1,2]，後藤　花奈[1]，住友　倫子[1]，川端　重忠[1]（[1]大阪大　院歯　口腔細菌，[2]名大　院医　泌尿器） |
| **P1-75** | 甘草由来グリチルレチン酸誘導物質の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性の検討<br>○大山健太郎[1,2]，松尾　美樹[2]，小松澤　均[2]（[1]鹿児島大　院医歯　顎顔面外科，[2]鹿児島大　院医歯　口腔微生物） |
| **P1-76** | *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株の 60-kDa 線毛について<br>○古谷田泰徳，佐々木　悠，渡辺　清子，浜田　信城（神奈川歯科大　微生物感染） |
| **P1-77** | *Streptococcus pyogenes* に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与<br>○毛利　泰士[1,2]，住友　倫子[1]，山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，寺尾　　豊[3]，川端　重忠[1]（[1]大阪大　院歯　口腔細菌，[2]大阪大　歯病　障害者歯，[3]新潟大　院医歯　微生物） |
| **P1-78** | ジンジパインがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響<br>○神尾　宜昌[1]，今井　健一[1]，中山　浩次[2]，落合　邦康[1]（[1]日本大　歯　細菌，[2]長崎大　院医歯薬　微生物） |
| **P1-79** | 臨床症状に伴う *P. gingivalis* の発育・生理活性に及ぼす影響と遷移誘導性の可能性について<br>○大屋　　学[1,2]，田村　宗明[2,3]，Cueno Marni[2]，落合　邦康[2,3]（[1]日本大　歯，[2]日本大　歯　細菌，[3]日本大　歯　生体防御） |
| **P1-80** | *Tannerella forsythia* の有する OmpA 様蛋白質の宿主細胞付着への関与<br>○堀江　　俊[1,2]，猪俣　　恵[1]，出水川雅司[1]，長谷川義明[3]，稲葉　裕明[1]，引頭　　毅[1]，北井　則行[2]，村上　幸孝[1]（[1]朝日大　歯　微生物，[2]朝日大　歯　歯科矯正，[3]愛院大　歯　口腔微生物） |
| **P1-81** | *Tannerella forsythia* のジペプチジルペプチダーセ 4 の性状解析<br>○中里茉那美[1]，下山　　佑[2]，根本　優子[3]，根本　孝幸[3]，高橋　晋平[1]，石河　太知[2]，佐々木　実[2]，八重柏　隆[1]，木村　重信[2]（[1]岩医大　歯　歯周，[2]岩医大　歯　分子微生，[3]長崎大　院医歯薬　口腔生化） |
| **P1-82** | *Streptococcus sanguinis* による IL-1$\alpha$ 産生誘導活性<br>○佐伯　　歩[1]，長谷部　晃[1]，中澤　　太[2]，柴田健一郎[1]（[1]北大　院歯　口腔分子微生，[2]北医療大　歯　微生物） |

| | |
|---|---|
| **P1-83** | ミティスレンサ球菌が産生する過酸化水素水によるマクロファージ活性化制御<br>○松島　瞳[1,2]，片岡　嗣雄[2]，岡橋　暢夫[3]，井上美津子[1]，桑田　啓貴[2]（[1]昭和大　歯　小児成育歯科，[2]昭和大　歯　口腔微生物，[3]大阪大　院歯　フロンティア） |
| **P1-84** | *Streptococcus pyogenes* CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する空胞形成メカニズムの検討<br>○黒澤　美絵[1,2]，小田　真隆[1]，土門　久哲[1]，齊藤　一誠[2]，早崎　治明[2]，寺尾　豊[1]（[1]新潟大　院医歯　微生物，[2]新潟大　院医歯　小児歯） |
| **P1-85** | *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading に関与する因子について<br>○今村　圭吾[1]，近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，成田　由香[3]，藤原　卓[1]，中山　浩次[2]（[1]長崎大　院医歯薬　小児歯，[2]長崎大　院医歯薬　微生物，[3]福歯大　感染生物） |
| **P1-86** | BCG thyX 欠損株の作製とその性状解析<br>○有村　友紀[1]，中山　真彰[2]，妹尾　昌紀[1]，田川　淳平[3]，中山　浩次[4]，飯田　征二[1]，大原　直也[2,5]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科，[2]岡山大　院医歯薬　口腔微生物，[3]岡大病院　矯正，[4]長崎大　院医歯薬　微生物，[5]岡山大　歯先端研センター） |
| **P1-87** | BCG における cyclic-di-GMP 菌体内合成の影響<br>○妹尾　昌紀[1]，中山　真彰[2]，有村　友紀[1]，飯田　征二[1,3]，大原　直也[2,3]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科，[2]岡山大　院医歯薬　口腔微生物，[3]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター） |

## モリタ賞　病理学

| | |
|---|---|
| **P1-88** | ハニカム $\beta$-TCP を用いた象牙芽細胞様細胞の誘導<br>○吉田　沙織[1]，辻極　秀次[2]，高畠　清文[1]，河合　穂高[1]，中野　敬介[1]，玉村　亮[3]，川上　敏行[4]，長塚　仁[1]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔病理，[2]岡山理大　理　組織病態，[3]日本大　歯　解剖Ⅱ，[4]松本歯大　硬組織疾患解析） |
| **P1-89** | LPS 長期刺激による細胞外マトリックス関連遺伝子の DNA メチル化解析<br>○高井　理衣[1]，植原　治[2]，原田　文也[1]，宇津宮雅史[1]，中條　貴俊[1]，吉田　光希[1]，佐藤　惇[1]，西村　学子[1]，千葉　逸朗[2]，安彦　善裕[1]（[1]北医療大　歯　臨床口腔病理，[2]北医療大　歯　保健衛生） |
| **P1-90** | 腺様嚢胞癌におけるキメラ遺伝子発現と腫瘍増殖の関連についての研究<br>○大野　淳也[1]，岡田　康男[1,2]（[1]日歯新潟　病態組織機構，[2]日歯新潟　病理） |
| **P1-91** | 軟骨石灰化不全ラットの形態学的ならびに分子生物学的解析―頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨―<br>○葛島　康平[1]，竹内　綾[1]，永山　元彦[2]，田中　政巳[3]，渡辺　実[4]，天野　均[5]，田沼　順一[2]，北井　則行[1]（[1]朝日大　歯　矯正，[2]朝日大　歯　口腔病理，[3]会津大　短　食物栄養，[4]聖マリアンナ医大　院　実験動物飼育管理，[5]大阪歯大　歯　薬理） |
| **P1-92** | 口腔扁平苔癬（OLP）におけるヒトパピローマウイルス 16 型（HPV-16）感染と HPV-16 感染 OLP の上皮の細胞増殖能について<br>○加藤　世太[1,2]，磯村まどか[1]，佐藤　伸明[1]，河合　遼子[1]，本田　由馬[1]，神野　正人[1]，吉田　和加[1,2]，杉田　好彦[1,2]，久保　勝俊[1,2]，前田　初彦[1,2]（[1]愛院大　歯　口腔病理，[2]愛院大　歯　未来口腔医療研究センター） |
| **P1-93** | マウス舌移植モデルにおけるヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移形質と癌微小環境<br>○白子　要一[1]，佐藤かおり[1]，田谷　雄二[1]，青葉　孝昭[1]，島津　徳人[2]，添野　雄一[1]（[1]日本歯大　生命歯　病理，[2]麻布大　生命環　食品生理） |
| **P1-94** | 口腔扁平上皮癌における DKK3 の発現と機能解析<br>○片瀬　直樹（川崎医大　医　分子生物） |
| **P1-95** | 歯肉扁平上皮癌における Galectin-1 の発現と腫瘍免疫の関連について<br>○野田　百合，佐藤　淳，廣瀬　勝俊，豊澤　悟（大阪大　院歯　口腔病理） |
| **P1-96** | 多形腺腫の細胞分化における Notch の役割<br>○高峰　圭介[1]，中野　敬介[2]，落合　隆永[1]，杉田　好彦[3]，久保　勝俊[3]，前田　初彦[3]，長谷川博雅[1]，川上　敏行[1]（[1]松本歯大　院　病態解析，[2]岡山大　院医歯薬　口腔病理，[3]愛院大　歯　口腔病理） |
| **P1-97** | *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染はマクロファージを介して肝星細胞を活性化し非アルコール性脂肪性肝炎の病態を進行させる<br>○長﨑　敦洋，古庄　寿子，宮内　睦美，髙田　隆（広島大　院医歯薬保　口腔顎顔面病理病態） |
| **P1-98** | がんの肺転移抑制におけるケモカイン CXCL14/BRAK と NKT 細胞との相乗作用<br>○陽　暁艶[1]，宮本　千央[1,2]，居作　和人[1,2]，加藤　靖正[3]，畑　隆一郎[1,2]（[1]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター，[2]神奈川歯科大　口腔科学，[3]奥羽大　歯） |

## モリタ賞　薬理学

| | |
|---|---|
| **P1-99** | 哺乳類細胞を使ったリコンビナント・ヒトアメロジェニンの発現と精製法の確立<br>○高橋亜友美[1]，森田　貴雄[2]，倉重　圭史[1]，村田　佳織[1]，齊藤　正人[1]，谷村　明彦[2]（[1]北医療大　歯　小児歯，[2]北医療大　歯　薬理） |
| **P1-100** | Shh は EGF/ErbB カスケードを介して分枝形態形成を調節している<br>○水越　堅詞，小山　典子，林　徹，柏俣　正典（朝日大　歯　薬理） |

| | |
|---|---|
| **P1-101** | 胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成におけるインテグリン a5 サブユニットの役割<br>○赤井　崇浩[1]，水越　堅詞[2]，小山　典子[2]，林　　徹[2]，住友伸一郎[1]，柏俣　正典[2]（[1]朝日大　歯　口腔外科，[2]朝日大　歯　歯科薬理） |
| **P1-102** | ラット唾液腺における PAC1-R，StAR，CYP11A1 の発現に及ぼすジアゼパムの効果<br>○塚越　絵里[1]，川口　　充[2]，吉川　正信[1,3]，四宮　敬史[1]，大久保みぎわ[1]，笠原　正貴[1]（[1]東歯大　薬理，[2]東歯大，[3]東海大　臨床薬理） |
| **P1-103** | $\alpha$7 ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が骨代謝に及ぼす影響<br>○盛林　昭仁[1]，萱島　浩輝[1]，佐伯万騎男[3]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]（[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ，[2]東北大　院歯　分子　再生補綴，[3]新潟大　院医歯　歯科薬理） |
| **P1-104** | 交感神経系による骨形成制御には $\alpha_{1B}$-アドレナリン受容体が関与する<br>○田中健二郎，平居　貴生，戸苅　彰史（愛院大　歯　薬理） |
| **P1-105** | 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットへの新規ビスホスホネート投与による骨量改善と作用機序について<br>○滝澤　愛子[1,2]，千葉　美麗[2,4]，太田　　岳[2]，安田　真弓[1,2]，鈴木　恵子[3]，篠田　　壽[4]，五十嵐　薫[1]（[1]東北大　院歯　口腔障害科学，[2]東北大　院歯　口腔生理，[3]奥羽大　歯　歯科薬理，[4]東北大　院歯　環境歯） |
| **P1-106** | ATP ならびに *Porphyromonas gingivalis*（Pg）局所注入により惹起されるミクログリア突起の集積とその日内変化に関する生体イメージング解析<br>○高山扶美子[1,2]，林　　良憲[1]，武　　　洲[1]，中西　　博[1]（[1]九大　院歯　口腔機能分子，[2]日本学術振興会特別研究員（DC2）） |
| **P1-107** | 慢性ストレスは，雌マウスの海馬 GABA 脱抑制を伴った行動異常を起こす<br>○塚原　飛央，増原　正明，佐藤　友昭（鹿児島大　院医歯　応用薬理） |
| **P1-108** | ケモカイン CXCL14 の発現がセツキシマブ（抗上皮増殖因子受容体抗体）の腫瘍抑制活性を決定する<br>○生駒　丈晴[1,2]，小澤　重幸[1,2]，鈴木　健司[1]，岩渕　博史[1]，陽　　暁艶[2,3]，宮本　千央[2,3]，前畑洋次郎[2,3]，畑　隆一郎[2,3]（[1]神奈川歯科大　顎顔面外科，[2]神奈川歯科大　院歯　口腔難治疾患研究センター，[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学） |
| **P1-109** | ビタミン D による分化誘導時の歯原性上皮細胞における $Ca^{2+}$ 応答の発生機序<br>○村田　佳織[1]，倉重　圭史[1]，森田　貴雄[2]，高橋亜友美[1]，齊藤　正人[1]，谷村　明彦[2]（[1]北医療大　歯　小児歯科，[2]北医療大　歯　薬理） |
| **P1-110** | アムホテリシン B 含有バブルリポソーム製剤と超音波併用によるカンジダ発育阻止効果について<br>○山本　雅史[1]，沖永　敏則[1]，岩永賢二郎[2]，有吉　　渉[1]，西原　達次[1]（[1]九歯大　院　感染分子，[2]九歯大　顎顔面外科） |
| **P1-111** | オピオイド受容体による無顆粒島皮質におけるシナプス伝達修飾作用の解明<br>○横田　英子[1]，越川　憲明[2]，小林　真之[2]（[1]日本大　歯　麻酔，[2]日本大　歯　薬理） |
| **P1-112** | 歯周病とアルツハイマー（AD）（1）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS によるマクロファジー活性化と脳髄膜を介した末梢炎症シグナルの脳内伝達とミクログリア活性化<br>○劉　　訳聡，武　　　洲，中西　　博（九大　院歯　口腔機能） |
| **P1-113** | 歯周病とアルツハイマー病（AD）（2）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS の慢性的末梢投与によって誘発される AD 様フェノタイプにおけるカテプシン B の役割<br>○倪　　軍軍，武　　　洲，中西　　博（九大　院歯　口腔機能） |
| **P1-114** | 酪酸ナトリウムの抗うつ効果に関連するミクログリアの遺伝子発現解析<br>○山脇　洋輔，兼松　　隆（広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理） |

## 9 月 13 日（日）15：00～16：00　ポスター会場 1

### 解剖・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

| | |
|---|---|
| **P2-1** | 細胞誕生の時期と孤束核および傍腕核における分布部位との関係<br>○諏訪部　武，安尾　敏明，硲　　哲崇（朝日大　歯　生理） |
| **P2-2** | ライオン糸状乳頭の微細血管構築について<br>○竹村　明道，戸田　伊紀，上村　　守，川島　　渉（大阪歯大　解剖） |
| **P2-3** | 口唇の老化における組織化学的研究<br>○奈良　倫之，北村　　啓，山内　真人，山本　将仁，阿部　伸一（東歯大　院　解剖） |
| **P2-4** | ハイイロジネズミオポッサムにおける耳下腺および顎下腺の超微細構造学的検討<br>○河野　哲朗[1]，鈴木久仁博[2]，玉村　　亮[1]，菅野　岳志[1]，寒河江登志朗[1]，岡田　裕之[1]（[1]日大松戸歯　組織，[2]日大松戸歯　生物） |
| **P2-5** | マウス軟骨組織における MEPE の発現について<br>○藤川　芳織，守田　　剛，田巻　玉器，柴田　俊一（医科歯科大　院医歯　顎顔面解剖） |

## 歯牙・歯髄

| | |
|---|---|
| P2-6 | ヒアルロン酸は歯髄幹細胞を CD44 を介して象牙芽細胞様に分化させる<br>○梅村　直己，坂上　　宏（明海大　歯　薬理） |
| P2-7 | タウ蛋白質は象牙芽細胞の最終分化マーカーである<br>○宮崎　敏博[1]，馬場　友巳[2]，小守　壽文[1]（[1]長崎大　院医歯薬　細胞生物，[2]長崎大　院医歯薬　口腔生化） |
| P2-8 | ミドリフグの歯に関する発生学的観察<br>○山本　　仁，藤関　元也，山崎　貴希（東歯大　組織発生） |
| P2-9 | ラット臼歯歯髄断髄後の Prostaglansin Transporter に対する免疫組織学的局在解析<br>○大倉　直人[1]，枝並　直樹[1]，吉羽　永子[1]，吉羽　邦彦[1]，依田　浩子[2]，大島　勇人[2]，興地　隆史[3]（[1]新潟大　院医歯　う蝕，[2]新潟大　院医歯　硬組織形態，[3]医科歯科大　院医歯　歯髄生物） |
| P2-10 | レーザー照射による齲蝕予防に関する研究ーμCT 法による表層下脱灰と再石灰化の観察<br>○東理　頼亮，岡田　康男（日歯新潟　病理） |
| P2-11 | ラット歯髄由来線維芽細胞におけるポリリン酸誘導 MMP-3 は Wnt5-Lrp5 シグナルを介して細胞増殖を制御する<br>○尾関　伸明[1]，山口　秀幸[1]，檜山　太希[1]，川合　里絵[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]（[1]愛院大　歯　歯内治療，[2]愛院大　薬　生体機能） |

## 歯周組織

| | |
|---|---|
| P2-12 | 歯周健常マーカーとなる検査キットの開発<br>○内堀　聡史[1]，小林　　平[1]，續橋　　治[2]，會田　雅啓[1]（[1]日大松戸歯　クラウンブリッジ，[2]日大松戸歯　微生物免疫） |
| P2-13 | 歯牙神経線維における蛍光色素 AM1-43 の蛍光顕微鏡的および電子顕微鏡的局在<br>○西川　純雄（鶴見大　歯　生物） |
| P2-14 | ヒト歯根膜幹細胞に対する新規合成ペプチド効果の遺伝子的解析<br>○富永　和也[1]，嘉藤　弘仁[2]，岡村　友玄[1]，和唐　雅博[1]，西川　哲成[1]，田中　昭男[1]（[1]大阪歯大　口腔病理，[2]大阪歯大　歯周病） |
| P2-15 | 光機能化処理によるインプラント周囲骨形成と微小循環について<br>○松尾　雅斗，奥寺　俊允，前田　信吾（神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態） |
| P2-16 | Advanced Platelet-rich fibrin（A-PRF）を用いた歯槽骨再生の試み<br>○奥寺　俊允[1]，三好代志子[2]，前田　信吾[1]，松尾　雅斗[1]（[1]神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態，[2]神奈川歯科大　口腔科学） |
| P2-17 | （演題取消） |
| P2-18 | 全身麻酔下のラットの歯肉への *Porphyromonas gingivalis* の LPS の局所投与が血液中の TNF-α 量に及ぼす影響<br>○青野　悠里，三枝　　禎（日大松戸歯　薬理） |
| P2-19 | ストレス反応性タンパク質による歯根膜線維芽細胞の増殖調節機構<br>○定岡　　直[1]，八上　公利[1,2]，川原　一郎[1,2]（[1]松本歯大　衛生，[2]松本歯大　院歯独　健康増進口腔科学，[3]松本歯大　口腔インプラント） |
| P2-20 | PKR やインフラマソームが *P. gingivalis* を感染させた骨芽細胞において骨吸収に関連する因子の発現に与える影響<br>○吉田　賀弥[1]，岡村　裕彦[2]，尾崎　和美[3]（[1]徳島大　院医歯薬　口腔保健教育，[2]徳島大　院医歯薬　口組，[3]徳島大　院医歯薬　口腔保健支援） |
| P2-21 | 高齢者の口蓋における動脈と神経の分布について<br>○佐藤　　巌，三輪　容子，春原　正隆（日本歯大　生命歯　解剖 1） |
| P2-22 | ラット歯肉局所循環調節機構に対する抗酸化生体因子（$BH_4$）の役割<br>○遠山　歳三[1]，塗々木和男[2]，高橋　俊介[3]，高橋　聡子[3]，吉野　文彦[3]，吉田　彩佳[3]，渡辺　清子[1]，浜田　信城[1]（[1]神奈川歯科大　微生物感染，[2]神奈川歯科大　看護，[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学） |

## 唾液・唾液腺

| | |
|---|---|
| P2-23 | クエン酸刺激による耳下腺唾液分泌と浅側頭動脈血行動態変化との相関<br>○黒木　愛由[1,2]，小野堅太郎[1]，人見　涼露[1]，山科　　亮[3]，小幡亜希子[4]，吉野　賢一[2]，稲永　清敏[1]（[1]九歯大　生理，[2]九歯大　歯　口腔保健管理，[3]日立ハイテク，[4]日立） |
| P2-24 | SNAP23 ノックアウト HAP1 細胞の機能解析<br>○荒川　俊哉[1]，岡山　三紀[2]，溝口　　到[2]，田隈　泰信[1]（[1]北医療大　歯　生化，[2]北医療大　歯　歯科矯正） |

| | |
|---|---|
| P2-25 | 幼若マウス耳下腺腺胞細胞における抗菌タンパク質 Bpifb1 の一過性発現上昇<br>○梨田　智子[1]，吉江　紀夫[2]，吉村　　建[3]，下村-黒木　淳子[4]，辻村麻衣子[2]，佐藤　律子[5]（[1]日歯新潟　生化，[2]日歯新潟　解剖 2，[3]日歯新潟　解剖 1，[4]日歯新潟　小児歯，[5]日歯新潟　短大） |
| P2-26 | 胎仔マウス顎下腺における 5-メチル化シトシンと 5-ヒドロキシメチル化シトシンのダイナミクス<br>○林　　徹，小山　典子，水越　堅詞，柏俣　正典（朝日大　歯　薬理） |
| P2-27 | 唾液腺傷害時と回復時における前駆細胞マーカーの発現<br>○横山　　愛，加藤　　治，吉垣　純子（日大松戸歯　生理） |
| P2-28 | 加齢に伴う唾液アミノ酸変動のメタボローム解析<br>○田中　庄二[1]，秋田紗世子[1]，谷口　　潔[1]，片山　　直[1]，坂上　　宏[2]（[1]明海大　歯　口腔診断，[2]明海大　歯　薬理） |
| P2-29 | 唾液ヒスタチンによるペプチドグリカンの Toll 様受容体 2 シグナル抑制<br>○今村　泰弘[1]，王　　宝禮[2]，十川　紀夫[1]（[1]松本歯大　歯科薬理，[2]大阪歯大　教育開発） |
| P2-30 | プロタミン分解ペプチド (HAP-100) は薬物性唾液腺機能低下を改善する<br>○大久保みぎわ[1]，川口　　充[2]，四宮　敬史[1]，塚越　絵里[1]（[1]東歯大　薬理，[2]東歯大） |
| P2-31 | 膜融合分泌顆粒におけるアクチン被覆形成の分子機構 ―生体内顕微鏡によるリアルタイムイメージング解析―<br>○設楽　彰子（米国立衛生研　歯科　頭蓋顔面研） |
| P2-32 | 耳下腺腺房細胞における MARCKS リン酸化と局在変化のイソプロテレノール誘発性アミラーゼ分泌への関与<br>○佐藤慶太郎[1]，成田　貴則[2]，加藤　　治[3]，杉谷　博士[2]（[1]獨協医大　医　生理，[2]日本大　生物資源　獣医生化，[3]日大松戸歯　生理） |
| P2-33 | ラット耳下腺分泌顆粒のタンパク質濃縮機構における膜ドメインの関与<br>○加藤　　治，横山　　愛，吉垣　純子（日大松戸歯　生理） |
| P2-34 | アセチルコリン刺激によって惹起される顎下腺全体で同期する $Ca^{2+}$ オシレーションの発生機構<br>○根津　顕弘，森田　貴雄，谷村　明彦（北医療大　歯　薬理） |
| P2-35 | 液状飼料飼育がラット顎下腺・舌下腺の成長に与える影響について<br>○高橋　　茂[1]，上北　広樹[2]，井上貴一朗[1]，土門　卓文[1]（[1]北大　院歯　口腔機能解剖，[2]北大　院歯　冠橋義歯補綴） |
| P2-36 | 難消化性糖類の経時的摂取がラット唾液中 IgA 濃度に与える影響<br>○山本　裕子[1]，東　　雅啓[2]，清水　智子[2]，猿田　樹理[2]，槻木　恵一[2]（[1]神奈川歯科短大　院歯，[2]神奈川歯科大　口腔病理診断） |
| P2-37 | エキソソームによる Ro/SS-A および La/SS-B の細胞外分泌<br>○相田　美和，織田　公光（新潟大　院医歯　口腔生化） |
| P2-38 | 耳下腺におけるムスカリン受容体作用薬による水チャネル・AQP5 の細胞核への移動とその役割<br>○Bragiel Aneta，Pieczonka Tomasz，石川　康子（徳島大　院医歯薬　分子薬理） |

## 発生・再生

| | |
|---|---|
| P2-39 | 新規無血清培養液 MSC-T4 を用いたヒト歯根膜幹細胞の増殖能および多分化能解析<br>○村林　　大，中原　　貴（日本歯大　生命歯　発生　再生） |
| P2-40 | 硬組織形成期歯胚における Glucose related protein-78 タンパクの発現局在について<br>○永田　健吾，和田　裕子，藤原　弘明，三上友理恵，神野　彰子，安部みさき，清島　　保（九大　院歯　病理） |
| P2-41 | ラット歯原上皮におけるケラチン・ビメンチンの発現様式<br>○伊東　博司，櫻井　裕子，遊佐　淳子（奥羽大　歯　口腔病理） |
| P2-42 | 口蓋裂を伴う A/J マウス胎仔における骨形成因子の発現<br>○前川眞見子[1]，森　　明弘[1,2]，駒田　致和[1]，池田やよい[1]（[1]愛院大　歯　解剖，[2]愛院大　歯　口腔先天異常） |
| P2-43 | in vivo electroporation を用いた BMP 遺伝子導入による筋内異所性骨誘導における未分化間葉系細胞の動態について<br>○河井まりこ[1]，片岡　陽平[1]，池亀　美華[1]，大浦　　清[2]，山本　敏男[1]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態，[2]大阪歯大） |
| P2-44 | VEGF-C は骨髄由来間葉系幹細胞の増殖や遊走を促進する<br>○五十嵐靖之[1]，帖佐　直幸[2]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，近藤　尚知[1]，石崎　　明[2]（[1]岩医大　歯　補綴　インプラント，[2]岩医大　歯　生化） |
| P2-45 | 骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導<br>○中塚美智子[1]，松田　哲史[1]，細矢　明宏[2]，隈部　俊二[1]（[1]大阪歯大　口腔解剖，[2]松本歯大　口腔解剖Ⅱ） |
| P2-46 | 摂食中枢と連動する生殖調節神経のネットワーク形成機構に対する実験発生学的解析: 哺乳類における GnRH ニューロンの移動経路の形成に対する前方中軸中内胚葉の役割<br>○今井　　元，馬場　麻人（奥羽大　歯　生物） |

| | |
|---|---|
| **P2-47** | 3 種類の多孔性材料を足場として三次元培養したヒト毛細血管の長期観察<br>○岡村　友玄[1,2]，西川　哲成[1]，和唐　雅博[1]，富永　和也[1]，今井　弘一[1]（[1]大阪歯大　口腔病理，[2]大阪歯大　歯科理工） |
| **P2-48** | ゲフィチニブ投与による TGF$\beta$3 ノックアウトマウスの p-Erk1/2 発現量および口蓋裂表現型の変化に関する研究<br>○杉山　明子[1]，引頭　　毅[2]，滝川　俊也[1]（[1]朝日大　歯　解剖，[2]朝日大　歯　口腔微生物） |
| **P2-49** | 口蓋裂に関与する疾患遺伝子群のオントロジー解析<br>○船戸　紀子（医科歯科大　院医歯　医歯共同センター　疾患遺伝子） |

## 骨・軟骨・骨代謝・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

| | |
|---|---|
| **P2-50** | NF-$\kappa$B 阻害剤 MPAIDs による骨芽細胞への影響<br>○平田-土屋　志津[1]，岡本　一起[2]，自見英治郎[3]，諸冨　孝彦[1]，北村　知昭[1]（[1]九歯大　保存，[2]聖マリアンナ医大 分子病態治療，[3]九歯大　生化） |
| **P2-51** | アセトアミノフェンのマウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 の挙動に及ぼす影響<br>○中津　由博[1]，東　　　泉[2]，大住　伴子[2]，渡邉　誠之[1]，竹内　　弘[2]（[1]九歯大　歯科侵襲制御，[2]九歯大　口腔応用薬理） |
| **P2-52** | ペプチド固相合成法（F-moc 法）により作製された LRAP の軟骨および骨形成に与える影響<br>○松田　裕子[1]，畠山　雄次[2]，中島　一記[1]，鴨頭奈央子[1]，畠山　純子[3]，沢　　禎彦[2]，石川　博之[1]（[1]福歯大　矯正，[2]福歯大　機能構造，[3]福歯大　保存） |
| **P2-53** | 感覚神経-骨芽細胞共培養系における相互シグナル伝達機構の解明<br>○兒玉　大介，戸苅　彰史（愛院大　歯　薬理） |
| **P2-54** | RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する IL-17A と IL-27 の協調効果<br>○井上　　博，内橋　賢二，西川　泰央（大阪歯大　生理） |
| **P2-55** | OCZF（Zbtb7a）タンパク質の破骨細胞分化における発現誘導とその機能の解析<br>○久木田明子[1]，徐　　祥赫[1,2]，久木田敏夫[2]（[1]佐賀大　医　微生物，[2]九大　院歯　口腔分子細胞生物） |
| **P2-56** | 骨芽細胞における時計遺伝子 NFIL3/E4BP4 の役割<br>○平居　貴生，田中健二郎，戸苅　彰史（愛院大　歯　薬理） |
| **P2-57** | Keap1/Nrf2 の破骨細胞分化における役割<br>○坂井　詠子，福間　　裕，西下　一久，岡元　邦彰，筑波　隆幸（長崎大　院医歯薬　歯科薬理） |
| **P2-58** | 2 種類のビスフォスフォネートの骨芽細胞におけるアルカリフォスフォアターゼ活性および基質形成に対する異なる効果<br>○馬場　友巳[1]，宮崎　敏博[2]，根本　優子[1]，根本　孝幸[1]（[1]長崎大　院医歯薬　口腔生化，[2]長崎大　院医歯薬　細胞生物） |
| **P2-59** | オスウズラに形成された骨髄骨の吸収に対するプロゲステロンの影響<br>○山本　敏男[1]，塩津　範子[1,2]，片岡　陽平[1,3]，河井まりこ[1,4]，池亀　美華[1]，内部　健太[1]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態，[2]岡大病院　総合歯科，[3]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科，[4]大阪歯大　薬理） |
| **P2-60** | 骨量減少・骨髄の脂肪化と糖・脂質代謝メデイエーター FGF21/$\beta$Klotho の関連について<br>○南崎　朋子，吉岡　広陽，竹井悠一郎，吉子　裕二（広島大　院医歯薬保　硬組織代謝生物） |
| **P2-61** | Geranylgeraniol は骨芽細胞分化を促進する<br>○浦田真梨子[1,2]，古株彰一郎[1]，中富　千尋[1]，松原　琢磨[1]，平田-土屋　志津[2]，諸冨　孝彦[2]，北村　知昭[2]，自見英治郎[1]（[1]九歯大　分子情報生化，[2]九歯大　口腔保存） |
| **P2-62** | 炎症性骨破壊における破骨細胞の動態―バイオイメージングによる解析―<br>○鈴木　恵子[1,2]，長岡　正博[1]，鈴木　礼子[1]，篠田　　壽[3]（[1]奥羽大　歯　歯科薬理，[2]昭和大　歯　歯科薬理，[3]東北大　院歯） |
| **P2-63** | アディポネクチンによる破骨細胞形成系に及ぼす影響<br>○天野　　均，大浦　　清（大阪歯大　薬理） |
| **P2-64** | 破骨細胞は，骨基質を吸収するだけではなく，核数が多くなると骨細胞も吸収する～破骨細胞は核数依存的に異なった機能を発現するのか？～<br>○鈴木　礼子[1]，今井　　元[2]，長岡　正博[1]，鈴木　恵子[1]（[1]奥羽大　歯　歯科薬理，[2]奥羽大　歯　生物） |
| **P2-65** | メッケル軟骨吸収における軟骨基質内への血管系の侵入様相<br>○井上貴一朗[1]，牛島　夏未[2]，八木原　澄[1]，森田　　航[1]，高橋　　茂[1]，土門　卓文[1]（[1]北大　院歯　口腔機能解剖，[2]北大　院歯　学術支援） |
| **P2-66** | 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する有限要素法を用いた組織化学的解析<br>○渡邉　竜太，矢野　　航，佐藤　和彦，小萱　康徳，江尻　貞一（朝日大　歯　口腔解剖） |
| **P2-67** | ラットモデルにおけるインプラント周囲骨組織の治癒経過<br>○辻村麻衣子[1]，中原　　賢[2]，前田　健康[3]，吉江　紀夫[1]（[1]日歯新潟　解剖 2，[2]日歯新潟　先端研，[3]新潟大　院医歯　口腔解剖） |
| **P2-68** | エストロゲンによる鳥類骨髄骨の破骨細胞の機能およびアポトーシス制御について<br>○樋山　伸二，渡邉　峰朗，内田　　隆（広島大　院医歯薬保　口腔細胞生物） |

| | |
|---|---|
| **P2-69** | 低出力超音波パルスを照射したヒト歯槽骨骨膜由来細胞スフェロイドに関する超微構造学的研究<br>○宮城　直美[1]，東　　一善[1]，前田　信吾[2]，河田　　亮[1]，高橋　　理[1]（[1]神奈川歯科大　院歯　神経組織発生，[2]神奈川歯科大　総合教育） |
| **P2-70** | 軟骨発生および軟骨細胞分化における転写調節因子 Irx3 の役割<br>○玉村　禎宏[1]，目良　　恒[1]，糸数　万紀[1,2]，脇谷　滋之[1,3]（[1]武庫川女大　健康スポーツ科学，[2]大阪市大　院医　整形外科，[3]広島大　院医歯薬保　人工関節　生体材料） |
| **P2-71** | 破骨細胞前駆細胞の維持におけるファイブロネクチン N 末端領域の役割<br>○天野　　滋，大森　喜弘（明海大　歯　口腔生物再生医工） |

## 神経・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

| | |
|---|---|
| **P2-72** | カエル味覚受容器におけるカルシウム結合タンパク質カルビンディンとカルレチニンの発現<br>○安藤　　宏[1]，今村　泰弘[2]，田所　　治[3]，十川　紀夫[2]，金銅　英二[3]，北川　純一[1]（[1]松本歯大　口腔生理，[2]松本歯大　歯科薬理，[3]松本歯大　口腔解剖Ⅰ） |
| **P2-73** | マウス苦味受容味細胞の応答特性<br>○吉田　竜介，二ノ宮裕三（九大　院歯　口腔機能解析） |
| **P2-74** | マウス鼓索神経における脂肪酸に対する単一神経応答の解析<br>○安松　啓子[1,2]，二ノ宮裕三[1,2]（[1]九大　味覚嗅覚センサ研究開発，[2]九大　院歯　口腔機能解析） |
| **P2-75** | Cre-loxP によるマウス味蕾 3 型細胞における Mash1 の機能解析<br>○瀬田　祐司，豊野　　孝，片岡　真司，中富　満城，木部　琴乃（九歯大　解剖） |
| **P2-76** | 味蕾内レニン-アンジオテンシン系の機能解析<br>○重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]（[1]九大　院歯　口腔機能解析，[2]九大 味覚嗅覚セ） |
| **P2-77** | マウス末梢神経切断後の一酸化窒素合成酵素（NOS）の免疫組織化学的局在<br>○菊地　隆太[1]，安部　仁晴[2]，中川　敏浩[2]，渡邊　弘樹[2]（[1]奥羽大　院歯　口外，[2]奥羽大　歯　口腔組織） |
| **P2-78** | 顎関節機械刺激に対するウサギ視床ニューロンの応答特性<br>○鈴木　崇弘[1]，若森　　実[2]，坪井　明人[1,3]（[1]東北大　院歯　加齢歯科，[2]東北大　院歯　歯科薬理，[3]東北大　院歯） |
| **P2-79** | 三叉神経中脳路核ニューロンにおいて観察される h 電流による AMPA 受容体電流の抑制には棘様微絨毛内の Na+ マイクロドメインが関与している<br>○齋藤　　充，佐藤　　元，豊田　博紀，河野　　奨，尹　　東旭，姜　　英男（大阪大　院歯　顎治） |
| **P2-80** | 吻側孤束核ニューロンは心血管系と呼吸系からの求心性神経入力を受ける<br>○石塚　健一，佐藤　義英（日歯新潟　生理） |
| **P2-81** | シスプラチン投与による遅延性悪心誘発に対する脳幹部ドーパミン作動性ニューロンの関与<br>○平井　喜幸，久留　和成，前澤　仁志，舩橋　　誠（北大　院歯　口腔生理） |
| **P2-82** | マウスを用いた食品由来揮発性成分の Dimethylsulphide の臭いに対するマスキング作用の評価<br>○長田　和実（北医療大　歯　生理） |
| **P2-83** | 連続する舌運動の巧緻的制御時における大脳体性感覚ニューロンの発火パターンの多様性<br>○戸田　孝史，工藤　忠明（東北大　院歯　口腔生理） |
| **P2-84** | 嗅覚認識に関与する脳部位の結合解析による探索：7 テスラ MRI による fMRI 研究<br>○深見　秀之，佐原　資謹（岩医大　歯　生理） |
| **P2-85** | 2 光子励起顕微鏡を用いた歯髄刺激に応答する神経細胞の特定<br>○藤田　智史，越川　憲明，小林　真之（日本大　歯　薬理） |
| **P2-86** | カプサイシンの辛味認知とそれに伴う自律神経反応を担う脳機構<br>○佐藤　　元[1]，川上　晋平[2]，豊田　博紀[1]，齊藤　　充[1]，河野　　奨[1]，尹　　東旭[1]，姜　　英男[1]（[1]大阪大　院歯　顎治，[2]森永製菓株式会社） |
| **P2-87** | 咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス伝達の生後発達<br>○中村　史朗[1]，梶原　里紗[2]，望月　文子[1]，中山希世美[1]，清本　聖文[1]，井上　富雄[1]（[1]昭和大　歯　口腔生理，[2]昭和大歯） |
| **P2-88** | ラット赤核刺激による開口反射の促通における前庭神経核の役割<br>○佐藤　義英[1]，石塚　健一[1]，高橋　　睦[1,2]，岩崎　信一[1]（[1]日歯新潟　生理，[2]日歯新潟　補綴 1） |
| **P2-89** | 実験動物における睡眠時反復性咬筋活動の生理学的特性<br>○加藤　隆史[1]，佐藤　文彦[1]，吉田　　篤[1]，東山　　亮[2]（[1]大阪大　院歯　口腔解剖 2，[2]大阪大　院歯　クラウンブリッジ） |
| **P2-90** | 胎児期ビスフェノール A 曝露ラットにおける離乳前行動の解析<br>○藤本　哲也，西川　泰央（大阪歯大　生理） |

| | |
|---|---|
| P2-91 | ミクログリア BK チャネルを介したモルヒネ痛覚過敏メカニズムの解明<br>○林　良憲，中西　博（九大　院歯　口腔機能分子） |
| P2-92 | 三叉神経刺激で生じる顎・顔面領域の血流動態における副交感神経性血管拡張反応と血圧変動との相互作用<br>○石井　久淑，佐藤　寿哉（北医療大　歯　生理） |

## 筋

| | |
|---|---|
| P2-93 | TLE3 による筋分化調節機構<br>○古株彰一郎[1]，中富　千尋[1]，浦田真梨子[1]，松原　琢磨[1]，片桐　岳信[2]，自見英治郎[1]（[1]九歯大　分子情報生化，[2]埼玉医大　ゲノム　病態生理） |
| P2-94 | 咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1, miR-133a の機能<br>○成山明具美[1]，島崎　絵美[1]，安藤　準[2]，大貫　芳樹[3]，奥村　敏[3]，朝田　芳信[1]（[1]鶴見大　歯　小児歯，[2]鶴見大　歯　物理，[3]鶴見大　歯　口腔生理） |
| P2-95 | デキサメタゾン投与による咬筋の萎縮と遅筋化に対するクレンブテロールの拮抗作用<br>○梅木　大輔[1]，大貫　芳樹[2]，伊藤　愛子[1]，中村　芳樹[1]，奥村　敏[2]（[1]鶴見大　歯　歯科矯正，[2]鶴見大　歯　口腔生理） |

## 腫瘍

| | |
|---|---|
| P2-96 | マウス口腔扁平上皮癌細胞株（Sq1979）のリンパ節転移巣由来サブクローン（L 細胞）による Th1 型免疫反応の促進；その制御因子の同定と機能解析<br>○足立　充隆[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，稲垣　俊弘[1,2]，伊藤　宏衣[1,2]，鷲見　成紀[1,2]，村松　泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤　信夫[2]（[1]朝日大　歯　口腔外科，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学） |
| P2-97 | *Paeonia lutea* 葉の抽出物による扁平上皮癌の増殖・転移抑制効果<br>○椋代　義樹，本橋　宏美（昭和大　歯　口腔外科） |
| P2-98 | 角化嚢胞性歯原性腫瘍における角化関連タンパク質の免疫組織学的検討<br>○落合　隆永[1]，中野　敬介[2]，長谷川博雅[1]（[1]松本歯大　口腔病理，[2]岡山大　院医歯薬　口腔病理） |
| P2-99 | Pim 阻害による骨髄腫骨吸収亢進の抑制<br>○寺町　順平[1,2]，岡村　裕彦[1]，羽地　達次[1]，（[1]徳島大　院医歯薬　口組，[2]徳島大　院医歯薬　血液　内分泌代謝内科） |
| P2-100 | ニコチンの暴露は口腔がん細胞の増殖促進を誘導する<br>○西岡　貴志[1,2]，多田　浩之[3]（[1]東北大　院歯　口診，[2]東北大　院歯　インターフェイスプロジェクト支援，[3]東北大　院歯　口腔微生物） |
| P2-101 | 口腔癌細胞における Kruppel-like factor 4 発現とプロモーターのメチル化<br>○山口　光祐，千葉　忠成，美原　希美，須藤　遥，今井　一志（日本歯大　生命歯　生化） |

## 炎症

| | |
|---|---|
| P2-102 | 歯周疾患発症における EBV の関与　―EBV による炎症性サイトカインの産生誘導には TLR-NF-κB シグナルが関与する―<br>○今井　健一，落合　邦康（日本大　歯　細菌） |
| P2-103 | 口腔扁平苔癬，苔癬様病変についての病理組織学的，免疫組織化学的検討<br>○岡田　康男（日歯新潟　病理） |
| P2-104 | フェニトイン存在下でのヒト培養歯肉線維芽細胞のアポトーシス低下<br>○竹内　麗理[1]，松本　裕子[2]，平塚　浩一[1]（[1]日大松戸歯　生化，[2]日大松戸歯　薬理） |
| P2-105 | ヒト歯髄細胞の産生するシンデカン 4 は炎症に関与する<br>○鎌田　愛子，田村　功，合田　征司，吉川　美弘，堂前　英資，池尾　隆（大阪歯大　生化） |
| P2-106 | 胎仔唾液腺の放射線障害に対するラジカルスカベンジャーの効果<br>○那須　優則[1]，堀江　哲郎[1]，井出　吉昭[2]，三橋扶佐子[1]，中原　貴[2]（[1]日本歯大　生命歯　リサーチセンター，[2]日本歯大　生命歯　発生　再生） |
| P2-107 | 三叉神経脊髄路核尾側亜核内アストロサイトの活性化は咀嚼筋への侵害刺激により誘発される<br>○松田　哲史，中塚美智子，隈部　俊二（大阪歯大　口腔解剖） |
| P2-108 | カラゲニンおよびヒスタミン誘発ラット足浮腫に対するデクスメデトミジン塩酸塩の作用機序<br>○深田　哲也[1]，戸円　智幸[1]，橋本　修一[3]，砂田　勝久[2]（[1]日本歯大　生命歯　リサーチセンター，[2]日本歯大　生命歯　歯科麻酔，[3]日本歯大　生命歯） |

## 免疫

| | |
|---|---|
| P2-109 | 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する免疫制御機構の解明<br>○永尾　潤一，田崎　園子，橋本麻利江，成田　由香，長　　環，田中　芳彦（福歯大　感染生物） |
| P2-110 | 多機能性糖脂質によるマクロファージ METs 形成メカニズムの解析<br>○小田　真隆，黒澤　美絵，土門　久哲，寺尾　　豊（新潟大　院医歯　微生物） |
| P2-111 | 上皮細胞における TLR7 を介した免疫制御機能の解析<br>○松口　徹也[1]，楠山　譲二[2]，柿元　協子[1]，大西　智和[1]（[1]鹿児島大　院医歯　口腔生化，[2]鹿児島大　院医歯　口腔病理） |
| P2-112 | 炎症下の口腔粘膜にリクルートする T 細胞の解析<br>○Hirunwidchayarat Worawalun，大野　建州，Kang Siwen，永井　重徳，東　みゆき（医科歯科大　院医歯　分子免疫） |
| P2-113 | 口腔前癌病変における CD163+ 腫瘍関連マクロファージの分化誘導への浸潤ヘルパー 1 型 T 細胞の関与<br>○森　　一将[1]，廣井　美紀[2]，嶋田　　淳[1]，大森　喜弘[2]（[1]明海大　歯　口腔顎顔面外科，[2]明海大　歯　微生物） |
| P2-114 | マウス舌癌モデルにおけるケモカイン遺伝子の発現動態<br>○山口　　花，大森　喜弘（明海大　歯　微生物） |
| P2-115 | *Porphyromonas gingivalis* fimbriae による樹状細胞のクロスプレゼンテーション誘導<br>○多田　浩之[1]，松下　健二[2]，高田春比古[1]（[1]東北大　院歯　口腔微生物，[2]長寿センター　口腔疾患） |
| P2-116 | *Porphyromonas gingivalis* で増悪する動脈硬化および歯周病における NLRP3 インフラマソームの活性化<br>○落合　智子，小林　良喜，瀧澤　智美，桒原　紀子，續橋　　治，齋藤　真規（日大松戸歯　微生物免疫） |
| P2-117 | マウス骨髄由来間葉系幹細胞は共培養下で未分化単球／マクロファージ系細胞を CD206 陽性の免疫抑制性（M2）マクロファージに分化誘導する<br>○客本　斉子[1]，滝沢　尚希[2]，島　　杏奈[3]，帖佐　直幸[1]，加茂　政晴[1]，大久保直登[4]，衣斐　美歩[5]，八重柏　隆[2]，石崎　　明[1]（[1]岩医大　歯　生化，[2]岩医大　歯　歯周，[3]岩医大　薬　機能生化，[4]北大　院薬　臨床病態，[5]岩医大　薬　分子細胞薬理） |
| P2-118 | 概日リズムに依存した分泌型 IgA 抗体誘導経鼻ワクチン投与<br>○小林　良喜，桒原　紀子，續橋　　治，齋藤　真規，落合　智子（日大松戸歯　微生物免疫） |
| P2-119 | 抗微生物ペプチド cathelicidin の象牙質修復に対する促進的関与<br>○堀部　寛治，細矢　明宏，平賀　　徹，中村　浩彰（松本歯大　口腔解剖Ⅱ） |

## 微生物

| | |
|---|---|
| P2-120 | 免疫応答を誘導する歯周病原細菌の菌体成分の探索<br>○成田　由香，田崎　園子，橋本麻利江，永尾　潤一，長　　環，田中　芳彦（福歯大　感染生物） |
| P2-121 | *Porphyromonas gingivalis* の 外膜ヴェシクルは 2 型免疫応答を誘導する<br>○中尾　龍馬，泉福　英信（感染研　細菌一） |
| P2-122 | ワイセラ乳酸菌 W3 株のミュータンスバイオフィルム形成抑制効果<br>○土居　哲平，毛利　彰太，成瀬　　敦（ロッテ中研　口腔科学研） |
| P2-123 | *Streptococcus mutans* の既成バイオフィルムにおけるモノテルペンアルコールならびにセスキテルペンアルコールの浸透機構の評価<br>○藤田　真理[1]，長田　和実[2]，宮川　博史[1]，鎌口　有秀[1]，中澤　　太[1]（[1]北医療大　歯　微生物，[2]北医療大　歯　生理） |
| P2-124 | Roselle 抽出物のバイオフィルム形成，サイトカイン産生ならびに gingipaon 活性における影響<br>○Sulistyani Herastuti，藤田　真理，宮川　博史，鎌口　有秀，中澤　　太（北医療大　歯　微生物） |
| P2-125 | 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素は上皮細胞に対する細胞傷害性を有する<br>○岡橋　暢夫[1]，中田　匡宣[2]，住友　倫子[2]，桜井　敦朗[3]，桑田　啓貴[4]，川端　重忠[2]（[1]大阪大　院歯　口腔フロンティア，[2]大阪大　院歯　口腔細菌，[3]東歯大　小児，[4]昭和大　歯　口腔微生物） |
| P2-126 | *Streptococcus gordonii* Hsa とシアロ糖複合糖質との結合には 2 つのアルギニン残基が関与する<br>○田代有美子，高橋　幸裕，古西　清司（日本歯大　生命歯　微生物） |
| P2-127 | 歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛形成における Mfa5 の役割の解析<br>○長谷川義明[1]，永野　恵司[1]，吉田　康夫[1]，村上　幸孝[2]，吉村　文信[1]（[1]愛院大　歯　微生物，[2]朝日大　歯　口腔微生物） |
| P2-128 | 感染性心内膜炎由来 *Streptococcus oralis* 308 株の細菌学的解析<br>○近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，今村　圭吾[1]，星野　倫範[1]，中山　浩次[2]，藤原　　卓[1]（[1]長崎大　院医歯薬　小児歯，[2]長崎大　院医歯薬　微生物） |

| | |
|---|---|
| **P2-129** | 黄色ブドウ球菌の牛血清中における病原性因子発現性及び増殖性<br>○大貝　悠一，小松澤　均（鹿児島大　院医歯　口腔微生物） |
| **P2-130** | 緑膿菌 AHL 類似化合物によるビアペネム殺菌効果の増強について<br>○村上　圭史，弘田　克彦，三宅洋一郎（徳島大　院医歯薬　口腔微生物） |
| **P2-131** | *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子変異株の性状解析<br>○菊池有一郎[1]，柴山　和子[1]，国分　栄仁[1,2]，大原　直也[3]，中山　浩次[4]，石原　和幸[1,2]（[1]東歯大　微生物，[2]東歯大　口科研，[3]岡山大　院医歯薬　口腔微生物，[4]長崎大　院医歯薬　微生物） |
| **P2-132** | イヌ僧帽弁閉鎖不全症における歯周病関連細菌の関与<br>○渡辺　清子，浜田　信城（神奈川歯科大　微生物感染） |
| **P2-133** | *Candida albicans* の新規 T 細胞分化誘導抗原の探索<br>○長　　環，田崎　園子，永尾　潤一，成田　由香，橋本麻利江，田中　芳彦（福歯大　機能生物） |
| **P2-134** | 若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性<br>○福井佳代子[1]，今井あかね[2,3]，桑島　治博[1]，仲村健二郎[1]（[1]日歯新潟　薬理，[2]日歯新潟　生命歯　生化，[3]日歯新潟　短大） |
| **P2-135** | 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関与する CoA-transferase に関する研究<br>○佐藤　満成[1,2]，吉田　康夫[2]，永野　恵司[2]，長谷川義明[2]，武部　　純[1]，吉村　文信[2]（[1]愛院大　歯　有床義歯，[2]愛院大　歯　微生物） |
| **P2-136** | *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関与する Succinyl-CoA 還元酵素の酵素学的解析<br>○吉田　康夫，佐藤　満成，永野　恵司，長谷川義明，吉村　文信（愛院大　歯　微生物） |
| **P2-137** | *Streptococcus mutans* のフッ化物耐性に寄与する chloride channel permease<br>○村田　貴俊，花田　信弘（鶴見大　歯　探索歯） |
| **P2-138** | *Porphyromonas gingivalis* のリポ多糖合成に関わる 3 つの糖転移酵素遺伝子の発見<br>○庄子　幹郎[1]，佐藤　啓子[1]，雪竹　英治[1]，鎌口　有秀[2]，内藤真理子[1]，中山　浩次[1]（[1]長崎大　院医歯薬　微生物，[2]北医療大　歯　微生物） |
| **P2-139** | *Porphyromonas gulae* 41-kDa 線毛の役割<br>○佐々木　悠，渡辺　清子，古谷田泰徳，浜田　信城（神奈川歯科大　微生物感染） |
| **P2-140** | *A. actinomycetemcomitans* 簡易検出キットの開発と臨床応用<br>○續橋　　治，桒原　紀子，齋藤　真規，瀧澤　智美，小林　良喜，落合　智子（日大松戸歯　微生物免疫） |
| **P2-141** | *Prevotella intermedia* における菌株間のゲノム比較<br>○内藤真理子，中山　浩次（長崎大　院医歯薬　微生物） |
| **P2-142** | 非 RI 蛍光試薬による *Porphyromonas gingivalis* のアミノ酸とジペプチドの取り込みの評価<br>○小早川　健，根本　優子，馬場　友巳，根本　孝幸（長崎大　院医歯薬　口腔生化） |
| **P2-143** | *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路の抑制効果とその意義<br>○中山　真彰[1]，内藤真理子[2]，中山　浩次[2]，大原　直也[1]（[1]岡山大　院医歯薬　口腔微生物，[2]長崎大　院医歯薬　微生物） |
| **P2-144** | 歯周ポケットから分離された赤色色素産生性新規 *Propionibacterium* 属菌の解析<br>○齋藤　真規，桒原　紀子，續橋　　治，小林　良喜，瀧澤　智美，落合　智子（日大松戸歯　微生物免疫） |
| **P2-145** | *Mycoplasma salivarium* による NLRP3 インフラマソームの活性化<br>○杉山　正博，佐伯　　歩，長谷部　晃，柴田健一郎（北大　院歯　口腔分子微生） |
| **P2-146** | 肺炎球菌による宿主細胞の細胞死誘導能の解析<br>○土門　久哲[1]，坂上　雄樹[1]，小田　真隆[1]，山口　雅也[2]，川端　重忠[2]，寺尾　　豊[1]（[1]新潟大　院医歯　微生物，[2]大阪大　院歯　口腔細菌） |
| **P2-147** | 病原タンパク質分泌に関わる細胞内品質管理プロテアーゼ HtrA について<br>○佐藤　啓子[1]，近藤　好夫[2]，今村　圭吾[2]，内藤真理子[1]，中山　浩次[1]（[1]長崎大　院医歯薬　微生物，[2]長崎大　院医歯薬　小児歯） |
| **P2-148** | 次世代シークエンスを用いた口腔ケア剤使用時における健康高齢者口腔細菌数の網羅的解析<br>○田村　宗明[1,2]，阿部　和正[1]，大屋　　学[1,3]，関　　啓介[1,3,4]，落合　邦康[1,2]（[1]日本大　歯　細菌，[2]日本大　総歯研　生体防御，[3]日本大　歯　口腔健康科学，[4]日本大　歯　総合歯） |
| **P2-149** | *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 血清型 g のゲノム解析<br>○桒原　紀子，齋藤　真規，續橋　　治，瀧澤　智美，小林　良喜，落合　智子（日大松戸歯　微生物免疫） |
| **P2-150** | *Streptococcus criceti* OMZ 61 株の遺伝子変異 A2059G 23S rRNA と G439A *rplC*<br>○田村　晴希，山田ありさ，加藤　裕久（岩医大　歯　薬理） |
| **P2-151** | 歯学部学生における喫煙者と非喫煙者の口腔内細菌叢の比較<br>○中野　善夫[1]，谷口　奈央[2]，米田　雅裕[3]，廣藤　卓雄[3]，桑田　文幸[1]，埴岡　　隆[2]（[1]日本大　歯　化，[2]福歯大　口腔保健，[3]福歯大　総合歯） |

## シグナル伝達

| | |
|---|---|
| P2-152 | 歯周病原菌代謝産物・酪酸が PC12 細胞のデスレセプターシグナリングに及ぼす影響<br>○関　啓介[1,2]，神尾　宜昌[3,4]，Cueno Marni[3]，田村　宗明[3,4]，紙本　篤[2]，落合　邦康[3,4]（[1]日本大　歯　口腔機能科学，[2]日本大　歯　総合歯，[3]日本大　歯　細菌，[4]日本大　歯　生体防御） |
| P2-153 | FRET バイオセンサーを用いた時計タンパク質 BMAL1- CLOCK 二量体形成および細胞内局在の解析<br>○西出　真也（北大　院歯） |
| P2-154 | 長鎖遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気管平滑筋細胞増殖作用とその細胞内機序<br>○水田健太郎（東北大　院歯　麻酔） |
| P2-155 | 歯周病と老化との関連性：歯周病で見られる酪酸濃度が血液老化に及ぼす影響<br>○Cueno Marni[1]，田村　宗明[1,2]，落合　邦康[1,2]（[1]日本大　歯　細菌，[2]日本大　総歯研　生体防御） |
| P2-156 | MAP3K8/Cot/Tpl2 シグナル分子はマクロファージの LPS 刺激による分解の後，NF-κB による mRNA の誘導により回復する<br>○柿元　協子[1]，楠山　譲二[1]，坂東健二郎[2]，大西　智和[1]，松口　徹也[1]（[1]鹿児島大　院医歯　口腔生化，[2]明海大　歯　生化） |
| P2-157 | 象牙芽細胞機械刺激で誘発される三叉神経節ニューロン内向き電流: 象牙芽細胞-ニューロン共培養による odontoblast hydrodynamic receptor theory の電気生理学的解析<br>○佐藤　正樹，　木村　麻記，　小島　佑貴，　東川明日香，　隠田みゆき，　小倉　一宏，　望月　浩幸，　澁川　義幸，田﨑　雅和（東歯大　生理） |
| P2-158 | アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを用いた $Ca^{2+}$ バイオセンサー恒常発現細胞における培養時の $Ca^{2+}$ 応答と細胞の動きの同時解析<br>○森田　貴雄，根津　顕弘，谷村　明彦（北医療大　歯　薬理） |
| P2-159 | TGF-β 刺激により顎関節組織由来細胞が示す病的機能変化の調節機構を明らかにする研究<br>○横田　聖司[1]，帖佐　直幸[2]，衣斐　美歩[3]，菊池恵美子[1]，木村　仁迪[1]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，佐藤　和朗[1]，石崎　明[2]（[1]岩医大　歯　歯科矯正，[2]岩医大　歯　生化，[3]岩医大　薬　分子細胞薬理） |
| P2-160 | 甘味受容体 T1R2/T1R3 に対する味覚修飾作用の解析<br>○實松　敬介[1]，重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]（[1]九大　院歯　口腔機能，[2]九大　味覚　嗅覚セ　感覚生理） |
| P2-161 | 食欲調節因子に対するマウス脳幹部 GLP-1 分泌神経細胞の応答特性<br>○久留　和成，平井　喜幸，前澤　仁志，舩橋　誠（北大　院歯　口腔生理） |
| P2-162 | 歯の発生過程における血管形成の分子制御機構<br>○春原　正隆，佐藤　巌（日本歯大　生命歯　解剖 1） |

## 薬理作用

| | |
|---|---|
| P2-163 | プラセンタ（胎盤製剤）によるヒト歯肉線維芽細胞のⅠ型コラーゲンと炎症性サイトカイン産生に及ぼす基礎医学的研究<br>○益野　一哉[1]，今村　泰弘[2]，本田　義知[3]，王　宝禮[1]（[1]大阪歯大　歯科医学教育開発，[2]松本歯大　歯科薬理，[3]大阪歯大　中歯研） |
| P2-164 | ユージノールにより誘導される口腔正常細胞の代謝プロファイルの変化<br>○坂上　宏[1]，田中　庄二[2]，村上　幸生[2]，片山　直[2]，天野　修[3]，横瀬　敏志[4]（[1]明海大　歯　薬理，[2]明海大　歯　総合臨床，[3]明海大　歯　解剖，[4]明海大　歯　保存治療） |
| P2-165 | 骨吸収におけるエンドソーム/リソソーム小胞輸送に関与するタンパク質の同定とその機能解析<br>○岩竹　真弓，岡元　邦彰，筑波　隆幸（長崎大　院医歯薬　歯科薬理） |
| P2-166 | 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の Ca 依存 ATPase の性質と部分精製<br>○工藤　智也[1,2]，出山　義昭[3,4]，吉村　善隆[3]，鈴木　邦明[3]，山崎　裕[1]（[1]北大　院歯　高齢者，[2]二期会歯科クリニック，[3]北大　院歯　細胞分子薬理，[4]ポプラアベニュー歯科クリニック） |
| P2-167 | カフェストールは，カフェオールより破骨細胞分化阻害効果が弱く，骨芽細胞の成熟を促進する<br>○福間　裕，坂井　詠子，西下　一久，岡元　邦彰，筑波　隆幸（長崎大　院医歯薬　歯科薬理） |
| P2-168 | リン酸ナトリウムは bisphosphonate による骨芽細胞障害を増強する<br>○田島　雅道，坂上　宏（明海大　歯　薬理） |
| P2-169 | Shogaol および gingerol はナトリウムチャネル $Na_v1.8$ を阻害して口内炎疼痛を抑制する<br>○人見　涼露，小野堅太郎，山口喜一郎，稲永　清敏（九歯大　生理） |
| P2-170 | ニコチンによるノルアドレナリントランスポーター発現調節機構の解明<br>○十川　千春[1,4]，大山　和美[2]，十川　紀夫[3]，小崎　健一[1]（[1]岡山大　院医歯薬　歯科薬理，[2]岡山大　院医歯薬　RI 実験，[3]松本歯大　歯科薬理，[4]岡山大　院医歯薬　歯先端研セ） |

| | |
|---|---|
| **P2-171** | 沖縄産オニダルマオコゼの背鰭に由来するレクチンの精製<br>○加藤　光司[1]，中川　秀幸[1,2]，篠原　光子[1]，大浦　　清[1]（[1]大阪歯大　薬理，[2]四国大　看護　薬理） |
| **P2-172** | 口腔扁平上皮癌細胞に傷害活性を有する新規クマリン誘導体類のデザイン（その 2）<br>○石原真理子[1]，山内　雅司[2]（[1]明海大　歯　化学，[2]明海大　歯　医療情報） |

## その他

| | |
|---|---|
| **P2-173** | 覚醒サル腹側運動前野ニューロンの熱刺激に対する応答<br>○海野　俊平，岩田　幸一（日本大　歯　生理） |
| **P2-174** | ビタミン C 欠乏動物における様々な濃度のビタミン C 水溶液に対する行動学的応答<br>○安尾　敏明，諏訪部　武，硲　　哲崇（朝日大　歯　口腔生理） |
| **P2-175** | 小学校児童における味覚の現状<br>○佐伯　周子，井出　良治，高橋　誠之，今井　敏夫（日本歯大　生命歯　生理） |
| **P2-176** | 傾斜計を用いた食塊物性測定<br>○塩澤　光一，奥村　　敏（鶴見大　歯　口腔生理） |
| **P2-177** | D-dopachrome tautomerase 遺伝子転写における FOXO1 と PGC1$\alpha$ の関与<br>○岩田　武男[1]，栗林　恭子[2]，吉本　勝彦[1]（[1]徳島大　院医歯薬　分子薬理，[2]獨協医大　口腔外科） |
| **P2-178** | 哺乳類細胞における効率的なルシフェラーゼ遺伝子発現のためのコドン最適化と生物発光イメージング: 歯学研究への応用<br>○鈴木　崇弘[1]，江頭　美喜[2]，河合　達志[2,3]，金森　孝雄[1,3]，井上　　敏[4]（[1]愛院大　歯　生化，[2]愛院大　歯　歯科理工，[3]愛院大　歯　未来口腔医療研究センター，[4]JNC（株）横浜研） |

9 月 12 日（土）17：00～18：00　ポスター会場 2

## 学部学生ポスター

| | |
|---|---|
| **S-1** | ヒト星状神経節における TRPV1 および TRPV2 の分布<br>○藤井　勇記，佐藤　　匡，清水　良央，市川　博之（東北大　院歯　口腔器官構造） |
| **S-2** | 骨芽細胞特異的副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）トランスジェニックマウスにおける歯胚および歯槽骨の組織化学的検索<br>○山崎　七愛[1]，山本知真也[2]，長谷川智香[2]，本郷　裕美[2]，原口　真衣[2]，織田　公光[3]，小守　壽文[4]，網塚　憲生[2]（[1]北大　院歯，[2]北大　院歯　硬組織発生，[3]新潟大　院医歯　口腔生化，[4]長崎大　院医歯薬　口腔生化） |
| **S-3** | 唾液マーカーとストレスの関係<br>○秦　　史子[1]，葛城　啓彰[2]（[1]日歯新潟，[2]日歯新潟　微生物） |
| **S-4** | 歯胚発生過程における RELM-$\beta$/FIZZ2 局在<br>○高濱　　暁[1]，細矢　明宏[2]，中村　浩彰[2]（[1]松本歯大，[2]松本歯大　口腔解剖Ⅱ） |
| **S-5** | マウスの歯胚における *Hey1* および *Hey2* 遺伝子の発現パターン解析<br>○木部　琴乃[1]，中富　満城[2]，片岡　真司[2]，豊野　　孝[2]，瀬田　祐司[2]（[1]九歯大，[2]九歯大　解剖） |
| **S-6** | *c-fos* 遺伝子欠損マウスにおける骨芽細胞・骨細胞の微細構造学的検索<br>○阿部　未来[1]，本郷　裕美[2]，山本知真也[2]，長谷川智香[2]，網塚　憲生[2]（[1]北大　院歯，[2]北大　院歯　硬組織発生） |
| **S-7** | *Porphyromonas gingivalis* はヒトマスト細胞から IL-31 産生を誘導する<br>○高瀬　　彩[1]，多田　浩之[1]，西岡　貴志[2]，松下　健二[3]，高田春比古[1]（[1]東北大　院歯　口腔微生物，[2]東北大　院歯　口診，[3]長寿セ　口腔疾患） |
| **S-8** | ヒト唾液腺細胞は ATP 刺激により IL-6 を産生する<br>○根本　恭利[1,2]，黒石　智誠[2]，菅原　俊二[2]（[1]東北大　歯　6 年，[2]東北大　院歯　口腔分子制御） |
| **S-9** | 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分 Mfa5 の輸送機序に関する研究<br>○飯島　由羅，長谷川義明，永野　恵司，吉田　康夫，吉村　文信（愛院大　歯　微生物） |
| **S-10** | 破骨細胞の分化を誘導する小分子化合物の探索<br>○西川　実沙[1]，柿原　嘉人[1]，秋葉　陽介[2]，江草　　宏[3]，佐伯万騎男[1]（[1]新潟大　院医歯　歯科薬理，[2]新潟大　院医歯　生体補綴，[3]東北大　院歯　分子　再生補綴） |

# 抄　録

ロッテ基金特別講演（SL）

メインシンポジウム（MS-1～MS-4）

日本学術会議シンポジウム（CS-1～CS-6）

歯科基礎医学会学術シンポジウム（KS-1～KS-4）

日韓合同シンポジウム（JKS-1～JKS-4）

歯科基礎医学会学会奨励賞受賞講演（Y-1～Y-4）

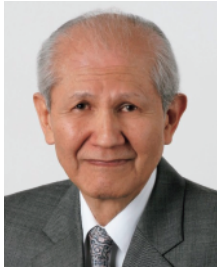
ランチョンセミナー（LS-1～LS-2）

サテライトシンポジウム（SS1～SS16）

一般演題（口演）

一般演題（ポスター）

## SL　ロッテ基金特別講演
## Special lecture accorded by the LOTTE foundation



**第一部　講演　13:00〜14:00**

「緑色蛍光たんぱく質 GFP の発見」

下村　　脩（ウッヅホール海洋生物学研究所特別上席研究員・ノーベル賞受賞者）

座長：影山　幾男（第 57 回歯科基礎医学会学術大会　大会長）

**第二部　対談　14:00〜15:00**

テーマ：日本の若手研究者をいかに育てるか

対談者：大浦　　清（一般社団法人 歯科基礎医学会 理事長）

住友　雅人（日本歯科医学会会長）

村上　龍男（鶴岡市立加茂水族館前館長　シニアアドバイザー）

下村　　脩（ウッヅホール海洋生物学研究所特別上席研究員）

下村　脩先生は，長崎医科大学附属薬学専門部を卒業後，長崎大学薬学部の助手となり，名古屋大学で理学博士を取得した．フルブライト奨学金により，米国プリンストン大学に留学の機会を得，ライフワークとなるオワンクラゲの生物発光とめぐり合う．

下村先生は，世界で初めてオワンクラゲより発光タンパク質イクオリンと緑色蛍光タンパク質 GFP を発見し，オワンクラゲの発光機構を解明した．

その後，種々の発光生物の科学的解明を行い，生物発光分野での世界的な権威となっている．特に GFP は，他の遺伝子に融合させて細胞に導入すると，生きた細胞内の特定の場所に蛍光を作り出すことができるため，遺伝子発現のレポーターやタンパク質の標識として多用されており，分子生物学の分野に大きな貢献をなしている．2008 年，GFP を発見したことにより，ノーベル化学賞を受賞した．

【ご略歴】

1928 年 8 月　京都府福知山市生まれ
1951 年　長崎医科大学附属薬学専門部　卒業
1951 年　長崎大学薬学部　実験実習指導員
1959 年　長崎大学薬学部　助手（〜1963 年）
1960 年　理学博士（名古屋大学）称号
1960 年　プリンストン大学研究員
1963 年　名古屋大学理学部附属水質科学研究所助教授
1965 年　プリンストン大学上席研究員（〜1982 年）
1981 年　ボストン大学客員教授（兼任）（〜2000 年）
1982 年　ウッヅホール海洋生物学研究所上席研究員
2001 年　同　　退職
2009 年　長崎大学名誉博士（薬学）称号

【栄典・受賞歴】

2004 年　Pearse Prize（英国王室顕微鏡学会）
2005 年　Emile Chamot Award（イリノイ州顕微鏡学会）
2006 年　朝日賞（朝日新聞社・朝日新聞文化財団）
2008 年　ノーベル化学賞
2008 年　文化勲章
2008 年　文化功労者
2010 年 3 月 31 日　学習院大学名誉博士（理学）
2013 年　米国科学アカデミー会員

【著書】

Shimomura, Osamu.（2006）. Bioluminescence: Chemical Principles And Methods, World Scientific Publishing Company. ISBN 9812568018
『クラゲに学ぶ：ノーベル賞への道』（長崎文献社 2010 年 ISBN 978-4-88851-157-5）
『クラゲ 世にも美しい浮遊生活』村上 龍男，下村 脩（PHP 新書）
『光る生物の話』（朝日選書）
『クラゲの光に魅せられて ノーベル化学賞の原点』（朝日選書）

## MS-1 The outlook for dentistry in Australia: the past, the present and the future

Grant Townsend

Sch Dent, Univ Adelaide, Australia

There were only five dental schools in Australia until about 10 years ago but there are now 12 dental schools in the University sector offering courses not only in dentistry but also in oral health (*e.g.* therapy and hygiene). This rapid increase has occurred without any national planning or coordination. There has also been an erosion of the autonomy of dental schools that once existed as separate faculties. This has been associated with severe funding difficulties and a lack of effective advocacy within the university and with governments about the distinctive needs and concerns of dentistry.

Dentistry's problems are a reflection of the issues facing all Australian universities, particularly the research intensive ones. The universities are generally keen for fees to be de-regulated but this could lead to $100,000 degrees that would raise issues of equity. The reforms that have occurred in the tertiary education sector in Australia have also led to corporate managerialism and a loss of academic collegiality.

It is likely that new graduates with large debts (faced with a competitive environment including therapists with expanded roles) will focus on those aspects of dentistry that provide the best remuneration. These include implants and milled crowns - procedures that require high levels of diagnostic and operative skill but for which evidence of long-term success is lacking. But these areas are only covered at a basic level in dental school. So there is a growing disconnect between the education of dental students and the type of practice they are likely to carry out on graduation. Furthermore, 85% of Australian dentists work in the private sector and many Australians cannot afford to pay for treatment, so a large proportion of the population is unable to access regular dental care.

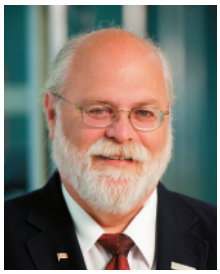
National bodies such as the Dental Board of Australia (DBA) and the Australian Dental Council (ADC) have pivotal roles to play in ensuring the standard of dentistry is maintained and there is now a mandatory requirement for registered dental practitioners to participate in continuing professional development (CPD). But what will happen to the standard of dental education and research, and the standard of dental care of Australians, in the future?

There are many challenges ahead - for dental schools, universities and governments. Dental schools need to ensure that their graduates demonstrate high levels of professionalism with a strong social conscience. Graduates also need to continue to learn, be able to evaluate evidence, and be prepared for an era of personalised medicine. Schools must also ensure that academics are able to carry out meaningful research. Universities need to understand that they cannot run high quality dental schools without resourcing them adequately. Governments need to understand that the mouth is part of the body and that oral health is integral to general health. This should then be reflected in the way they fund dental education and dental services to ensure that all Australians have access to high quality dental care.

Grant Townsend is Professor of Dental Science, Leader of the Craniofacial Biology and Dental Education Group, and Director of Assessment in the School of Dentistry at the University of Adelaide, South Australia. He was Associate Dean (Academic) throughout the 1990s when a PBL-based dental curriculum was introduced at the Adelaide Dental School, and he is still heavily involved in undergraduate and postgraduate teaching in the School, including teaching head and neck anatomy, neuro-anatomy, human growth and development, and local anaesthesia.

Grant's research interests include craniofacial biology, especially twin studies of the dento-facial region, and also dental education. He has published over 350 refereed papers and book chapters and has been invited to give lectures or act as an external examiner or consultant in many countries. He was awarded the Alan Docking Science Award in 2000 by the IADR (ANZ Division) for outstanding scientific achievement in the field of dental research and was made a Corresponding Member of the Finnish Dental Society in 2007 in recognition of outstanding contributions to dental research with Finnish collaborators. He has recently edited a special issue of the Australian Dental Journal with Professor Alan Brook, titled 'The face, the future, and dental practice: how research in craniofacial biology will influence patient care' and, with his colleagues in Adelaide and overseas, contributed several papers to the issue. He has also just published a book on his studies of twins that have spanned a period of over 30 years, titled 'Twin studies: research in genes, teeth and faces'.

## MS-2 Transfer of scientific knowledge into the dental curriculum



Charles Shuler

Fac Dent Univ British Columbia, Canada

The approach of a scientist to examine a research question involves the development of a specific research proposal. Clinical faculty members often comment that they are unfamiliar with the scientific method and consequently are not engaged in research projects. Yet, Clinical Care follows a systematic series of steps that are in fact quite closely related to the features of a research protocol. A patient's Chief Complaint presents a situation that naturally leads to a question, "Why did this happen?" This is equivalent to the generation of a research question that scientists investigate in their own research. Clinical and research questions lead to new knowledge, either through in depth analysis or scientific investigation that are often directly relevant to applications resulting in improved patient care. If the thinking of a skilled clinician and a basic scientist follow very similar pathways, how can new scientific knowledge advance patient care? Understanding of disease mechanisms is advancing rapidly and it is becoming clear that all patients have both genetic and environmental risk factors and that there exists a gene-environment relationship in the causation of human disease. The basic research that has generated these findings represents an important foundation on which clinicians can build to continually improve their approaches to patient treatment. However, it is critical that skilled clinicians are able to obtain and evaluate new scientific advances and appropriately integrate them into their practices. This necessitates in dental students an awareness of the role of research in the profession and the development of skills to find and assess information. Rather than simply learning what is known at the time of their dental education, students must be prepared to continually shape their patient care on the best available evidence that has been produced by rigorous scientific studies. In their 40 year careers in oral health care dentists will see many advances in scientific understanding. Are our graduates prepared to use them to the best benefit of their patients?

Dr. Shuler is the Dean of the Faculty of Dentistry of the University of British Columbia. Prior to being appointed at UBC he was a faculty member at the University of Southern California for 18 years. At USC he served as the Director of the University of Southern California Center for Craniofacial Molecular Biology holding an endowed chair position as the George and Mary Lou Boone Professor of Craniofacial Molecular Biology. He also served as the Director of the Graduate Program in Craniofacial Biology and the Associate Dean for Student and Academic Affairs at the USC School of Dentistry. Dr. Shuler received his B.S. in Biochemistry from the University of Wisconsin, his D.M.D. from Harvard School of Dental Medicine, his Ph.D. in Pathology from the University of Chicago and his Oral Pathology education at the University of Minnesota and the Royal Dental College Copenhagen Denmark. He has been active in assessing and managing clinical oral pathology patients with soft and hard tissue lesions. He maintains an active research program funded by the United States National Institute for Dental and Craniofacial Research that is focused on evaluating the molecular regulation of the secondary palate to better understand the etiology of cleft palate birth defects.

## MS-3 Dentistry the UK

Paul Coulthard

Sch Dent, The Univ Manchester, the United Kingdom

The purpose of UK Dental Schools is to produce degree level health care professionals and researchers and to undertake and disseminate research to improve global health. The dental team is changing with increasing recognition of the dentist as 'the team leader' and the team is changing to include, dental nurse, dental hygienist, dental therapist, orthodontic therapist, dental technician, and clinical dental technician. Currently the dentist undertakes 80% of clinical activity. However, we need better models of the 'dentist as a team leader' and the UK payment system does not encourage this philosophy.

The UK is part of the EU with free transfer of people and so of the total number of 40,500 registered dentists, 2,200 are new registrants/year, of which 1,300 are UK graduates and 40% of new registrants are EU/overseas dentists.

Worldwide there are 810 Dental Schools, In the UK there is 1 School per 3.5 million population and 1 graduate per 57,000.・In Brazil there is 1 School per 1 million and 1 graduate per 20,000 and 140 (70%) of Schools are private. There are no private Dental Schools in the UK yet. In the UK Dental Schools total academic staffing has increased over the last decade and we have introduced the 'Clinical Teacher' grade with career progression. However, there is a Clinical Academic shortage and the Research Base has reduced. The number of Postgraduate Educational places is very variable throughout the UK Schools but places are increasing.

Teaching and Learning styles are changing with more use of Enquiry-Based Learning, There are opportunities for students to intercalate and take a BSc degree during their dental degree. There is a harnessing of technology with use of Internet Teaching, Podcasting, Lecture Capture, and Asynchronous learning becoming popular. The role of staff is discrimination.・Students are encouraged to bring their own devices but connectivity needs to improve. This is all good for knowledge but not so useful for clinical skills and communication skills. There needs to be educational research so that there is an Evidence-Based methodology and teaching needs to be informed by research. Training needs to follow patient services and there are currently UK changes to patient services to encourage more care in primary care and less in hospitals. Students often attend 'Outreach Placements'. Three of the new UK Dental Schools almost entirely outreach teaching based with much of the education provided by general dental practitioners rather than dental specialists.

There is emphasis on a robust system of admissions to ensure that the individuals values are based on those of our NHS constitution and that they will be able to develop leadership, accountability, and high standards of care in putting patients first that are required. We want to ensure that the attributes of a professional are instilled. We also have a need to keep up with an aging population and an education that is responsive to the development of contemporary materials and techniques. We want professionals to recognise their limits and understand the importance of maintaining skills and self-development.

Professor Paul Coulthard has been Dean of the School of Dentistry since 2013. He is Professor of Oral and Maxillofacial Surgery and Consultant in Oral Surgery at *Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust* where he undertakes adult and paediatric Oral Surgery. He has a special interest in advanced surgical oral implantology including zygomatic Implants and management of patients with congenitally absent teeth and supporting tissues. He undertakes oral and maxillofacial reconstruction especially using bone grafting and extra-oral harvesting techniques. He has a special interest in the Control of Pain and Anxiety and especially the use of Conscious Sedation techniques.

Professor Coulthard is Chair of the *Oral Surgery and Oral and Maxillofacial Surgery Commissioning Guide Working Group for NHS England* responsible for developing a needs led outcome focused Care Pathway and producing a single operating Commissioning Framework to deliver improvements in quality and clinical outcomes.

## MS-4 The future dentistry in Japan

Akira Hamura

The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, Japan

In 1907, The Nippon Dental University as private school was established as the first dental school certified by the government in Asian countries. Establishing first national school was 21 years later than private's. 29 dental schools are in present Japan. 17 schools are private and other is national and prefectural.

There are about 100,000 dentists in Japan at present. The number of inhabitant is 125,000,000, so there is one dentist for 1,250 people. 70,000 dentists are in private practice. Total 90,000 dentists are working.

DMFT in 12-year old's was 5.4 in 1970 and 1.4 in 2011. Edentulous rate in 65 to 69 and over 80 years old were 35 and 65% in 1970, 5 and 40% in 2011. Proportion of person age 80 with 20 and more permanent teeth was 16% in 1992 and 40% in 2011. These data will show that Japanese oral health is improving so rapidly dental education is correct.

On the other hand, there are people like Japan Dental Association which insists that the number of dentists should be reduced. Because the expectation is that the Japanese population will keep decreasing and will be 86,000,000 in 2100, but the number of dentists doesn't change. The premise for this insistence is that the contents of dental health care will not be changed in the future.

However following point of the view of future dentistry, I'm considering to the number of dentists should still be not reduced. Two examples of future dentistry are shown below.

First is support of eating not only in elderlies but also in other young generation. Dentists can support the happiness of eating all through entire life. A decline of the body function by the aging also reduces the eating and swallowing functions. The dysphagia is often involved for a demented and post stroke patients. Oral health care and dysphagia rehabilitation prevent aspiration pneumonia.

The infant in a growth process does not obtain eating and swallowing functions sufficiently, is often observed Malnutrition obstructs growth and development. Dentists must be one of the members of the support team for the patient with dysphasia.

The other is the applicability to the regenerative medicine using the cells of human tooth. For instance stem cells from tooth pulp can differentiate into liver cell is useful for treatment of cirrhosis. It was shown by an animal experiment already.

These two examples indicate a possibility that the education of the dentistry can be contributed to the human health in the future.

The education for the future dentistry has just started in Japan.

Dr. Akira Hamura (DDS, PhD) gained Japanese dental license in 1979, and received his degree of dentistry from the Nippon Dental University, Tokyo, Japan in 1983. From 2003 to 2012 he was professor of General Dentistry in Hospital of the Nippon Dental University, and from 2013 professor of department of Geriatric Dentistry NDU. He is also the Dean of the School of Life Dentistry NDU at Tokyo.

Dr. Hamura has worked mainly in clinical and educational field. He was a person responsible for dental clinical education as president of NDU hospital from 2008 to 2012. In clinical dental education his areas of special interest include attitude, behavior, communication and habit of dental students. He and his colleague have developed new patient robot simulation system "SIMROID" since 2004.

Dr. Hamura received the award of advanced education system development by "SIMROID" from Japanese dental education association in 2011.

## CS-1　歯科基礎医学の多様性を基盤とした新たな歯科医学の展開―日本学術会議の立場から

○山口　　朗

日本学術会議会員
東歯大　口腔科学研究センター

我が国の歯科大学・歯学部では，基礎系分野に歯学部出身教員の配置が多数みられ，基礎医学・歯学に立脚した研究制度が普及している．その結果，我が国では歯学研究のできる歯科医師（Dental Scientist）が多数育成されてきた．さらに，我が国の歯学界は，歯学以外の先端的ライフサイエンス分野で活躍している研究者を輩出するとともに，歯学以外から優れた研究者の参入も加えて，多様性のある歯科基礎医学研究を展開するに至っている．これは我が国の歯科基礎医学の特徴といえる．今後，我が国の歯科基礎医学を国際的に発展させるためには，このような我が国の特性をさらに活かして優れた歯科基礎医学研究者を育成し，新たなパラダイムシフトを展開させる必要がある．
本講演では，日本学術会議と歯科基礎医学会の共同で実施した全国歯科大学・大学歯学部における歯科基礎医学研究者の多様性に関する実態調査の報告を含めて，多様性を基盤とした今後の歯科基礎医学の展開について述べたい．
【利益相反】利益相反なし

## Development of dental medicine based on diversity of dental basic sciences: the message of the Science Council of Japan

○Yamaguchi A

Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

In Japanese Dental Schools, many faculty members, who graduated from dental school, contribute to progress a variety of dental basic sciences. Some of such dentists are very active in the field of the advanced life sciences other than dentistry. Many excellent scientists, who are not dentists, also join the fields of dental basic sciences, and greatly contribute to advance our dental science/medicine. This compromised scientific framework is a characteristic of Japanese Dental School, and this system has contributed to construct diverse dental sciences in our country. The aim of this symposium is to encourage young researches to be more active scientists in the field of dental basic sciences, and to develop a new paradigm shift by promoting diversity in dental basic sciences. We hope to discuss about the future diversity in dental basic sciences by presenting status of staff diversity in Japanese Dental Schools based on the collaborative survey between the Science Council of Japan and the Japanese Association for Oral Biology.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## CS-2 歯科基礎医学分野からパラダイムシフトをおこすような人材を育成するために

○平田　雅人

九大　院歯　口腔細胞工学

日本の歯科大学・大学歯学部では基礎系分野にも教員が配置され，それぞれに応じて充実した教育・人材育成が行われていて，歯学のバックグランドを持った人材が歯学を含めたサイエンス各分野で活躍する礎になっています．今後とも継続して，あるいは更に力強く推進するにはどうしたら良いのでしょうか，共に考えたいと思います．

私は，常々我々教員側の責任は非常に重いと考えています．まずは学生を同じ道を目指そうとしている後輩として愛おしく思い，熱く教育することです．新しい教育技法が多々ありますが，使用言語がカタカナで難しく，それこそどこかの国の真似をしているだけだと思っています．唾の飛ぶような距離で双方向性の語らい合いをしながら，熱く智の伝道をすることが一番だと思っています．その中で先生方が研究生活で得た発見（たとえ小さくても）を学生に語りましょう．たとえ数名でも学生の心を打つはずです．ご自身の来た道を考えてみて下さい．尊敬する先生がいました．その先生の後を追う様にこの世界に入って来た例も多いのではないでしょうか．

さて，研究室ではどうしましょう．真似事ではない，常に何か新しいことを目指させましょう．Serendipity というのをご存知と思います．求めていたモノとは異なる発見をする能力，あるいはその発見したモノをいうのだそうです．そのような発見は予期することなく偶然におこるのでしょうが，一番重要なのは準備したココロが有るからだといわれます．準備したココロを養うには，日頃から幅広い知識，技術を求めて活動させることです．視野を広げさせることです．上に立つ先生が，歯学一番と思っていてはダメです．広い生命科学研究の世界を体験させることです．

【利益相反】利益相反はありません．

## Project for raising cutting-edge scientists in basal dental sciences

○Hirata M

Lab Mol Cellular Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

We, the faculty staff of Dental University, are responsible for raising our successive scientists dedicated for the promotion of basal dental sciences. To raise the cutting-edge young scientists, we have to initiate the project when they are dental students: we should receive their respects regarding the science and the humanity, and then we should educate them in a passionate fashion. You should introduce sometimes in the classroom the episodes what you found something for the first time in the world during your scientific carrier, such stories often let the students inspire and feel the world-wide events. When they visit you on their occasion of graduation with desire to be a graduate student, you should provide a warm welcome.

***Conflict of Interest:*** I declare that I have no conflicts of interest with the presentation.

## CS-3　基礎生命科学の一研究者として

○一條　秀憲

東京大　院薬　細胞情報

私の経歴は東大薬学教員の中では少々ユニークです．1985 年に東京医科歯科大学歯学部を卒業後，同大第一口腔外科専攻生，大学院を経て 1990 年から 3 年間，スウエーデン・ウプサラ市にあるルードヴィック癌研究所にポスドクとして留学しました．帰国後は東京医科歯科大学口腔病理学教室・助手，(財)癌研究会癌研究所生化学部・研究員を経て，1998 年 2 月再び東京医科歯科大学に教授として戻り，2002 年から現職につきました．

大学卒業以来，30 年に亘りほぼ一貫して細胞内シグナル伝達（最初の約 10 年間は TGF-$\beta$ スーパーファミリー）の解析を中心に研究生活を送ってきましたが，最近 20 年は特に物理化学的ストレスや病原体などの生物学的ストレスが細胞に受容認識され，シグナリングに変換される分子機構を中心に研究を行っています．これまでの研究生活において自分がきわめて幸運であったと思うことが二つあります．ひとつは，素晴らしい師と友人，ライバル，仲間，そして学生さん達に恵まれたこと，もうひとつは，少なくとも研究に関して「報われない努力がなかった」ことです．

本シンポジウムでは，基礎科学研究に魅せられた歯科出身の一研究者の歩みを，極めて個人的体験に基づいてご紹介させて頂きます．

【利益相反】利益相反状態にありません．

## As a basic life scientist

○Ichijo H

Lab Cell Signaling, Grad Sch Pharma Sci, Univ Tokyo

My career may be unique among those of the professors in the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo. In 1985, I graduated from Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University. After a resident of Oral Surgery, the University Hospital, I went on to the Graduate School of the same university as a graduate student at the First Department of Oral Surgery. Since 1990, I worked for 3 years at the Ludwig Institute for Cancer Research at Uppsala, Sweden, as a postdoctoral fellow. After returning to Japan, I worked as a research assistant at Oral Pathology, Tokyo Medical and Dental University. I became an associate, followed by an associate member at Biochemistry, the Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research. In 1998, I was back again to Tokyo Medical and Dental University as a professor at Laboratory of Cell Signaling. Then, in 2002, I moved to the current position in the University of Tokyo.

For the last 30 years, I have consistently focused on analysis of intracellular signaling (for the first 10 years, analysis of TGF-$\beta$ superfamily) since my graduation of the university. In recent years, I have been specifically interested in molecular mechanisms of how physical and chemical stresses are recognized and converted into signaling.

I feel extremely lucky as a scientist in my research life in two aspects. One is that I have been supported by excellent mentors, friends, rivals, colleagues and students. The other is that every effort has been rewarded as far as scientific research is concerned at least.

In this symposium, based on my very personal experiences, I would like to talk about my carrier history as a dental-oriented basic scientist.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## CS-4　新しいリンパ球 ILC2 の発見

○茂呂　和世[1,2,3]

[1]理研　統合生命医科学研究センター　免疫細胞システム研究
[2]横浜市大　院生命医　免疫生物
[3]日本学術振興機構　さきがけ

日本大学歯学部を卒業後，大学院 4 年間だけは基礎医学に身を投じてみようという軽い気持ちで慶應義塾大学大学院医学研究科に入学した．大学院ではいずれ歯科に戻ったときに役に立つであろうという考えから粘膜免疫ができる研究室に所属したが，数ヶ月で基礎研究にのめり込み，3 年目に未知のリンパ球と出会うことで研究者として生きていく決心がついた．
ナチュラルヘルパー細胞と名付けた細胞は，T 細胞，B 細胞，NK 細胞，NKT 細胞，LTi 細胞に次ぐ，第 6 のリンパ球として，現在では 2 型自然リンパ球（ILC2s）と呼ばれるようになり，2 型サイトカインを産生することで寄生虫や真菌への防御に働くことが明らかになっている．ILC2s がおもしろいのは感染防御に働く一方で，アレルギー疾患では症状の悪化に働くことである．つまり ILC2s をうまく制御できるようになれば，アレルギー疾患の画期的な治療法開発につながる可能性があるということである．
本公演では歯学部出身の研究者の 1 例として，これまでの研究とその時々に感じたものや経験したものなどを紹介させて頂きたいと思います．
【利益相反】利益相反はありません．

## Finding of novel lymphocyte; Type 2 innate lymphoid cell

○Moro K[1,2,3]

[1]Lab Immune Cell Systems, RIKEN Center for Integrative Med Sci
[2]Div Immunobiol, Dept Med Life Sci, Grad Sch Med Life Sci, Yokohama City Univ
[3]Precursory Res for Embryonic Sci Technol（PRESTO）, Jpn Sci Technol Agency

After I graduated from Nihon University School of Dentistry, I started my research career at Keio University Graduate School of Medicine with a casual thought that spending 4 years of my life doing basic science wasn't such a bad idea. I the laboratory where I can learn mucosal immunology because it would help me after I go back to the dental field. However, I got more interested and involved in the research during the first few months, and eventually decided to be a researcher but not a dentist when I accidentally discovered a novel lymphocyte population, which we named Natural Helper（NH）cells.
Five types of lymphocytes; T cells, B cells, NK cells, NKT cells and LTi cells are known to exist in the immune system. NH cells are now known to be the sixth type of lymphocyte and are categorized as group 2 innate lymphoid cells（ILC2）. ILC2s produce type 2 cytokines such as IL-5 and IL-13, and play pivotal roles in anti-helminth or anti-fungal infections. It is of interest that in contrast to their strong protective immunity against those infections, ILC2s also have the ability to exacerbate allergic inflammations. I believe that if we can better understand ILC2s and identify ways to regulate their functions, ILC2s will be a unique target for the treatment of allergic diseases.
In addition to the content of my research, I would like to talk about what I thought and felt as well as what I have learned in each step of the journey of my life in research.
***Conflict of Interest:*** I have no conflict of interest with this presentation.

## CS-5　骨リモデリングの制御機構の解明

○中島　友紀

医科歯科大　院医歯　分子情報伝達

演者は，長崎大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学博士）修了後，トロント大学オンタリオ癌研究所，オーストリア科学アカデミー分子生物工学研究所（IMBA），欧州連合（EU）マーリー・キュリー財団国際特別研究員へて，現在，東京医科歯科大学分子情報伝達学分野を主宰し，骨生物学の研究を推進している．骨の恒常性は，破壊と形成の動的なバランスにより保たれており，この再構築は“骨リモデリング”と呼ばれ，強靭な骨を維持し生命維持に必須なミネラル代謝を制御している．骨リモデリングは，骨構成細胞のクロストークによって制御されており，このバランスの破綻が，様々な骨疾患に繋がる．骨細胞は，骨基質に埋め込まれた特殊な細胞であり，神経細胞様の細胞突起によって骨内の骨細胞同士，そして，骨表面の破骨細胞や骨芽細胞とも密接にコンタクトしている．この細胞間ネットワークは，力学的刺激やホルモンなど生理活性物質の感受・応答を可能とし，骨の恒常性を制御していると考えられている．顎骨には歯牙が植立していることから，咀嚼筋を介した負荷に加え，歯を介した咬合力が，顎骨および歯槽骨に直接影響を与えることで，その骨量や構造の変化に深く関わっていると考えられている．従って，骨構成細胞による骨リモデリングの制御機構の解明は，全身性骨と歯槽骨の生理・病態を理解する上で重要なテーマである．

【利益相反】なし

## The elucidation of regulatory mechanisms of bone remodeling

○Nakashima T

Dept Cell Signal, Grad Sch Med Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ

Tomoki Nakashima is Principal Investigator of Department of Cell Signaling, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University. He graduated from the Graduate School of Pharmaceutical Science, Nagasaki University（Ph.D.）. He has been studying the mechanism of bone remodeling and intracellular signal transduction of bone component cells. Bone is constantly renewed by the balanced action of bone formation and bone resorption both of which mainly occur at the bone surface. This restructuring process called ”bone remodeling” is important not only for normal bone mass and strength, but also for mineral homeostasis. An imbalance of bone remodeling is often linked to various bone diseases. During bone remodeling, resorption by osteoclasts precedes bone formation by osteoblasts. Based on the osteocyte location within the bone matrix and the cellular morphology, it is proposed that osteocytes potentially contribute to the controls of bone remodeling by sensing mechanical stress and hormones. Alveolar bone remodeling is also directly influenced by occlusal force from the teeth. Thus, the elucidation of the regulatory mechanisms involved in long and alveolar bone remodeling is critical for a deeper understanding of the maintenance of healthy bone and dental disease.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## CS-6　発生の神秘に魅せられて

○大峡　　淳

新潟大　院医歯　口腔解剖

顎顔面は，生体の中でも最も複雑な形態を示し，知能，視覚，味覚，聴覚，咀嚼など特殊な機能を多数保有する非常に特異な組織である．そのため，その形成過程も極めて複雑なものとなる．まったくの臨床家であった私の研究者としてのスタートは，2000 年に英国の顎顔面発生生物学の研究室に留学したことが契機であった．今思えば，素人の無謀な挑戦であったが，結局，基礎の研究者となり，12 年間英国に滞在した．辞書によると，「パラダイムシフトとは，ある時代や集団を支配する物の見方や考え方が，非連続的・劇的に変化すること．同時代に共通して用いられる思考の基本的な枠の転換.」とある．2000 年の時点では，臨床をやめることも，海外に長期間滞在することも予想しておらず，自分の中でのパラダイムシフトであったと感じる．
神秘的でダイナミックな発生メカニズムに魅せられて，すでに 15 年が経過した．1990 年代に，従来の発生学に生化学，遺伝子工学，分子生物学手法が加わり遺伝子改変マウスが開発され，発生生物学は大きく変貌した．私が基礎研究を始めた頃は，遺伝子改変マウスを用いた実験が，歯科界にも浸透してきた頃のように記憶する．あれからわずか 15 年で，遺伝子改変マウスによる実験は一般化し，顎顔面に様々な異常を示す数多くの遺伝子改変マウスが報告された．歯に関しても，歯の完全に欠損したマウス，咬頭形成不全を示すマウス，過剰歯を持つマウス，歯根のみ欠損したマウス，歯の位置異常を示すマウス，エナメル形成不全を示すマウスなど，予想できる表現形はある程度報告された．まさにパラダイムシフトであった．
　発生生物学研究も，様々な方向へと舵を切ったと感じる．新たな発生生物学が，次のパラダイムシフトにどう絡んでいくか，しっかりと，くらいついていきたい．
【利益相反】利益相反状態にありません．

## Paradigm shift – from the viewpoint of developmental biology

○Ohazama A

Dept Oral Anat, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

The vertebrate head is one of the most elaborate and crucial structures of the body, since it performs and processes diverse functions such as intelligence, visual perception, the sense of taste, auditory perception and mastication. The head therefore shows significantly complex developmental processes. My career as a basic scientist started in 2000 when I began working in a developmental biology lab in the UK. Since then, I have been intrigued by the dynamic mechanisms of head development.
The definition of a paradigm shift is “the dramatic change in the paradigm of a scientific community, or a change from one scientific paradigm to another”. Over the last two decades, developmental biology has been one of the fastest growing and most exciting fields in biology, and has changed many aspects of dental research. Numerous experimental transgenic mouse models have been established during this period, most of which have been reported to show a variety of craniofacial anomalies including many tooth phenotypes. As such, developmental biology has driven a major paradigm shift in the field of dental research.
I would like to catch up with new aspects of developmental biology that might play a role in the next paradigm shift.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## KS-1　ライブイメージングと数理計測で見る脊椎動物の発生ボディプランの調節機構

○飯村　忠浩[1,2,3]

[1]愛媛大　PROS バイオイメージング
[2]愛媛大　ADRES 病態機能解析
[3]愛大病院　創生医療センター・人工関節センター

脊椎動物の骨格形態基盤は，胚発生期のボディプランにある．骨格形態は種に特異的である一方で，ボディプランには共通のメカニズムが内包されている．共通のボディプランとしては，頭方から尾方への組織付加による「体軸の伸長」とそれを追うように進行する「分節化」がある．我々は，ライブイメージングと画像の定量的解析から，後方化 Hox 遺伝子群が体軸伸張を徐々に抑制することを見いだした．また，体軸の伸長に内包されるリズム機構を，ライブイメージングによる計測と数理モデルシミュレーションとの比較から，明らかにした．このようなイメージングと計測によるアプローチによる運動器の生理・病態解析法にも言及し，議論の一助としたい．
【利益相反】利益相反状態にありません．

## Regulatory mechanisms of vertebrate developmental body plan revealed by live-imaging and mathematical analyses

○Iimura T[1,2,3]

[1]Ehime Univ PROS, Bio-Imaging
[2]Ehime Univ ADRES, Analytical Bio-Med
[3]Ehime Univ Hosp, Translational Res Center and Artificial Joint Integrated Center

Skeletal patterning in vertebrates is endowed by a process of body plan. Skeletal morphology is highly specific for species, however, body plan is established by well-conserved systems that involves body axis elongation and segmentation of developing embryo. By combinatorial approaches of live-imaging and numerical analyses, we quantitatively investigated roles of posterior *Hox* genes in slow-down mechanism of body axis elongation. Furthermore, by comparing live-imaging-based numerical analyses and mathematical modeling, we successfully uncovered a mechanism of periodic axis elongation. We will discuss how combinatorial approaches of imaging and mathematical analyses can be applied for musculoskeletal system.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## KS-2　蛍光生体イメージングで解く細胞動態ネットワークの世界

○石井　　優[1,2]

[1]大阪大　院医／生命機能・免疫細胞生物
[2]JST, CREST

生命システムでは「動き」が重要である．多種多様な細胞の動態は時空間的に精緻にコントロールされている．このようなシステムの研究には，従来の組織学的解析法では不十分であった．固定・薄切した組織観察では，細胞の「形態」や「分子発現」などを解析することはできるが，細胞の「動き」を解析することはできない．細胞の動きを見るためには，「生きた細胞」を，「生きた組織」「生きた個体」の中で観察する必要がある．本演者は深部組織の観察に適した多光子励起顕微鏡を駆使して，生きた細胞の生きたままの動きのある世界を捉えることを可能にしてきた．本講演では，演者がこれまで行ってきた骨髄や免疫組織の生体イメージング研究を中心に紹介し，見ることによって初めて分かった様々な免疫細胞の巧妙な動きとその制御機構について解説する．破骨細胞は炎症によって活性化して骨を破壊・吸収するマクロファージであるが，骨髄内の血管から出入りしながら「壊すべき場所」を探していた．また，一旦骨に引っ付いても，骨表面で奇妙な動きをしながら機能を発揮していた．リンパ節で，皮膚で，肺で，腸内で，脂肪組織で，様々な免疫細胞はそれぞれに特徴ある動きと機能を示していた．これら細胞の生きた動きの制御機構は，時間軸をもって生命現象を捉えることが可能な，生体イメージング技術があったからこそ得られた新知見である．

【利益相反】著者は利益相反状態にあります．

## Intravital multiphoton microscopy visualizing an ‘invisible hand’ controlling immune and bone cell dynamics *in vivo*

○Ishii M[1,2]

[1]Dept Immunol Cell Biol, Grad Sch Med Frontier Biosci, Osaka Univ
[2]JST, CREST

During the last decade, intravital multi-photon microscopy has launched a new era in the field of biology. By using this advanced imaging technique we and other groups have established a new system for visualizing in situ behavior of a diversity of living cells within intact tissues and organs. Among them our lab has succeeded in visualizing the various dynamic phenomena within bone, a tissue where various kinds of hematopoietic and immune cells are produced and egress toward their respective workplaces all over the body. Although bone is a secured and mysterious organ, it has been poorly analyzed by conventional methodology such as histological analyses with decalcified bone sections. By using intravital bone imaging technology in our hand, we have revealed in vivo mode of migratory and functional behaviors of osteoclasts, bone-resorbing macrophages contributing arthritic bone destruction as well as osteoporosis. Besides bone tissues, we have established the system for visualizing immune cell dynamics in situ, such as in lung, small intestine, and skins. In this presentation, I will present our latest data on cellular dynamics in immunology and bone biology, and discuss the future advances in clinical therapeutics and medical sciences brought by the new technology.

***Conflict of Interest***: The author declares conflicts of interest associated with this manuscript.

## KS-3　シグナル伝達のバイオイメージングと臨床応用

○大場　雄介

北大　院医　細胞生理

緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein, GFP）の発見は，蛍光バイオイメージングとそれを用いたシグナル伝達研究を大いに加速した．我々は，GFP とフェルスター共鳴エネルギー移動（Förster/fluorescence resonance energy transfer, FRET）や蛍光蛋白質再構成法（bimolecular fluorescence complementation, BiFC）等の技術を用いて，生きた細胞における低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras の活性制御機構と機能の解析に取り組んできた．最近，Ras と標的因子 PI3K の複合体がエンドゾームにリクルートされ，この結合がエンドサイトーシス亢進やエンドソームの成熟化，インフルエンザウイルス粒子取込に重要であることを明らかにした．また，Ras-PI3K シグナルの上流因子を探索した結果，感染直後に生じるカルシウムオシレーションを FRET バイオセンサー Cameleon で捉え，カルシウムイオンがインフルエンザウイルスの宿主細胞侵入の鍵となる因子であることを報告した．一方，単一細胞レベルの解析というイメージングの特性は，基礎研究のみならず応用面でも有用性が高い．実際我々は，FRET バイオセンサー Pickles を用いた薬剤感受性試験を開発した．現在は慢性骨髄性白血病をモデル疾患とした臨床応用を展開中で，従前技術では得られない薬剤投与前の効果判定が可能となった．当日は最近のデータを紹介しつつ，バイオイメージングの可能性について議論したい．

【利益相反】本研究の一部はソーラボジャパン株式会社の奨学寄附金によりサポートされています．

## Visualization of intracellular signal transduction by fluorescent biosensors and their clinical application

○Ohba Y

Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med

The discovery of the green fluorescent protein（GFP）has notably accelerated fluorescence bioimaging of intracellular signaling. We have worked on regulatory mechanisms and functions of the small GTPase Ras in living cells using GFP and its related techniques, including Förster/fluorescence resonance energy transfer（FRET）and bimolecular fluorescence complementation（BiFC）. We discovered that a complex of Ras and its effector molecule PI3K was recruited to the endosomes, which plays a role in the promotion of endocytosis and influenza virus entry. In addition, through probing upstream factors of Ras-PI3K signaling, we captured the emergence of calcium oscillations just after infection using the FRET-based biosensor Cameleon and found that $Ca^{2+}$ is a key factor for influenza virus entry. On the other hand, usefulness of fluorescence bioimaging is not limited to basic researches, but rather expanded into clinical situations. In fact, we developed a clinical test to evaluate drug efficacy using the FRET biosensor Pickles. The biosensor makes it possible to predict the future drug responses before administration for each individual chronic myeloid leukemia patient, which could not be achieved by any previously available techniques. I would like to introduce recent data regarding such projects and argue about the possibility of bioimaging.

***Conflict of Interest:*** This study is in part supported by the endowment fund from Thorlabs Japan Inc.

## KS-4　初期発生における蛍光イメージングによる心臓・血管形成機構の解明

福井　一，横田　泰宏，中嶋　洋行，千葉　彩乃，若山　勇紀，安藤　康史，福原　茂朋，○望月　直樹

国循センター　研究所　細胞生物

発生では，臓器形成に必要な物質の供給のために必須な循環システム（心臓・血管・血球）が先行して形成される．心臓・血管がダイナミックに形成される過程を理解するには，その形成過程での形態変化と同時に情報伝達系を可視化することが不可欠である．このために，我々は胚が透明で遺伝子操作が容易かつ体外で発生が進むゼブラフィッシュを用いて循環システム構築過程を捉えている．

心筋細胞・血管内皮細胞で特異的に活性化するプロモーターの下流に蛍光蛋白質あるいは，情報伝達を可視化する蛍光蛋白質プローブを発現させることで，両細胞群の増殖・遊走・形態変化を捉えてきた．さらにこれらの細胞がいかなる情報伝達系で制御されているかをプローブにより検討してきた．心臓・血管ともに中胚葉由来の組織であり，内胚葉との相互作用も発生には影響を及ぼすことが報告されてきた．このために，内胚葉と心筋細胞の同時可視化によりこの相互作用を制御する分子メカニズムについても検討してきた．

本発表では心筋細胞・血管内皮細胞の可視化による心臓形成機構の分子メカニズムの研究について手法を紹介するとともにその成果をまとめて報告する．

【利益相反】なし

## Deciphering cardiovascular development during embryogenesis by fluorescence imaging

Fukui H，Yokota Y，Nakajima H，Chiba A，Wakayama Y，Ando K，Fukuhara S，○Mochizuki N

Dept Cell Biol, Natl Cerebr & Cardiovasc Ctr Res Inst

Development of cardiovascular system precedes other organogenesis during early embryogenesis, because other organogenesis requires oxygen and nutrition supply by cardiovascular system. During embryogenesis, cardiogenesis and angiogenesis are dynamically regulated to establish circulation. We have tried to simultaneously visualize this dynamic cell behavior and its signal transduction. To visualize them, zebrafish embryos are useful because they are transparent, easy to manipulate genes, and extra-maternal development. We can observe the morphological changes by marking the cardiomyocytes and endothelial cells with simple fluorescent proteins under the control of their specific promoters. In addition, by inserting transgenes encoding fluorescent protein-based molecular probes, we can monitor the signal transduction that regulates the cell behavior.

In our presentation, we will report our recent results obtained by visualizing cardiovascular development using fluorescence imaging of zebrafish embryo: how cardiomyocytes migrate toward the midline, how intersmitic vessels sprout from dorsal aorta, and how caudal vein plexus is formed.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## JKS-1 Role of Runx2/Cbf$\beta$ complex in skeletal tissues

Na-Rae Park, Kyun-Eun Lim, and ○Je-Yong Choi

Dept Biochem Cell Biol, Kyungpook Natl Univ Sch Med

Disruption of Runx2 function results in complete missing of mature osteoblasts and compromised function of hypertrophic chondrocytes. Core binding factor $\beta$ (Cbf$\beta$) is a partner protein of Runx transcription factors and has been purified as a Runx complex. Because of embryonic lethality in Cbf$\beta$ null mice, the contribution of Cbf$\beta$ to Runx2 function has not been determined in skeletal tissues well. Here, we conditionally deleted Cbf$\beta$ in chondrocyte ($Cbf\beta^{\Delta cc/\Delta cc}$) and osteoblast ($Cbf\beta^{\Delta ob/\Delta ob}$) specifically using *Col2-Cre* and *Col1-Cre* mice, respectively. $Cbf\beta^{\Delta cc/\Delta cc}$ mice died immediately after birth. $Cbf\beta^{\Delta cc/\Delta cc}$ mice showed delayed chondrocyte maturation. $Cbf\beta^{\Delta ob/\Delta ob}$ mice were fertile and showed normal growth and development. However, bone mass and cortical bone thickness were reduced in long bone of $Cbf\beta^{\Delta ob/\Delta ob}$ mice. Mineral apposition rate was also reduced, which was due to the increase of flat-shaped osteoblasts in Cbf$\beta\Delta$ob/$\Delta$ob mice. Runx2 was decreased in both chondrocytes and osteoblasts derived from $Cbf\beta^{\Delta cc/\Delta cc}$ and $Cbf\beta^{\Delta ob/\Delta ob}$ mice, respectively. Decrease of Runx2 resulted in the reduction of various chondrogenic or osteogenic markers. Heterodimerization of Cbf$\beta$ with Runx2 was detected in chondrocytes and osteoblasts. These results indicate that the complex formation of Cbf$\beta$ with Runx2 in skeletal tissues plays an essential role for both chondrocyte differentiation and postnatal bone maintenance.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## JKS-2 Contribution of the *Scx*$^+$/*Sox9*$^+$ cell population to the establishment of the junction between tendons/ligaments and cartilage

○Chisa Shukunami

Dept Mol Biol Biochem, Basic Life Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ

Tendons connect muscles to the bone and function as the mechanical force transmitters, while ligaments bind bones together to stabilize joints. In the early stages of musculoskeletal development, progenitor cell populations for the musculoskeletal components migrate and settle down in the prospective region to give rise to cartilage, muscle, tendon, and ligament primordium. Each musculoskeletal primordium initially develops as independent components, but tendons and ligaments subsequently integrate each component into a single functional locomotive unit. During the postnatal growth, hyaline cartilage in the chondrotendinous/chondroligamentous junction (CTJ/CLJ) is gradually replaced by bone and fibrocartilage to generate the fibrocartilaginous enthesis in the osteotendinous/osteoligamentous junction (OTJ/OLJ). Through the lineage tracing studies using *Rosa*-CAG-LSL-*tdTomato* reporter mice crossed with *Cre-recombinase* (*Cre*) knock-in mice of *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*) or transgenic mice expressing *Cre* under the control of the promoter/enhancer of *Scleraxis* (*Scx*), we found that *Scx*$^+$/*Sox9*$^+$ cells contribute to the establishment of the CTJ/CLJ. Sox9 is known to be a key transcription factor for cartilage formation, whereas *Scx*, a basic helix-loop-helix transcription factor, regulates maturation of tendons and ligaments. Our study indicates that the *Scx*$^+$/*Sox9*$^+$ progenitor population is a unique multipotent cell population that gives rise to tenocytes, ligamentocytes, and chondrocytes. Conditional inactivation of *Sox9* in *Scx*$^+$/*Sox9*$^+$ cells resulted in newborn death due to defective hyaline cartilage formation in the CTJ/CLJ. Impaired formation of hyaline cartilage in the CTJ/CLJ and the fibrocartilaginous enthesis in the OTJ/OLJ is also observed in *Scx* null mice. In this symposium, functional implications of the *Scx*$^+$/*Sox9*$^+$ cell population in the CTJ/CLJ and OTJ/OLJ will be discussed.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## JKS-3 Calcium signaling for osteoclast differentiation

Hyung Joon Kim, Zang Hee Lee, and ○Hong-Hee Kim

Dept Cell Dev Biol, Seoul Natl Univ Sch Dent

The differentiation of osteoclasts from the progenitor cells is controlled by a complex network of intracellular signaling pathways primarily triggered by RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) via its receptor RANK. The molecular events mediated by fluctuations in cytosolic calcium concentration comprise one of the signaling pathways critical for osteoclast differentiation. Osteoclasts show an oscillatory pattern in cytosolic $Ca^{2+}$ concentrations during differentiation. For the initiation of $Ca^{2+}$ oscillation, the activation of PLC$\gamma$ by RANKL, in cooperation with immune receptors, and the engagement of inositol 1,4,5-triphosphate receptor type2 ($IP_3R2$) by the PLC product $IP_3$ are essential. RANKL-induced $Ca^{2+}$ oscillation triggers calcineurin-dependent dephosphorylation and nuclear translocation of NFATc1, which controls the transcription of osteoclastogenic genes. Therefore, the molecular mechanisms involved in the regulation of $Ca^{2+}$ oscillations are of great importance in the understanding osteoclast differentiation. We found that calcium pumps PMCA (plasma membrane $Ca^{2+}$-ATPase) 1 and PMCA4 were up-regulated during osteoclastogenesis. Gene knock-down of PMCAs increased the RANKL-induced $Ca^{2+}$ oscillations and osteoclast differentiation *in vitro*. Conversely, overexpression of PMCAs decreased $Ca^{2+}$ oscillations and osteoclastogenesis. PMCA4 also had an effect on pre-osteoclast fusion via regulation of NO production. Mice heterozygous for PMCA1 or null for PMCA4 showed lower bone volume in trabeculae and more osteoclasts on bone surface than the wild type mice. Furthermore, GEO databank analyses revealed that PMCA4 mRNA levels correlated with peak bone mass in premenopausal women. Collectively, our results suggest that PMCAs play important roles in regulating $Ca^{2+}$ signaling in osteoclasts and thereby bone metabolism in both mice and humans.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## JKS-4 Regulation of osteoclast differentiation and function by Wnt signals

○Yasuhiro Kobayashi[1], Shunsuke Uehara[2], Nobuyuki Udagawa[2], Naoyuki Takahashi[1]

[1]Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ

[2]Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ

Wnt ligands regulate bone mass through β-catenin-dependent canonical and -independent noncanonical signaling pathways. Wnt/β-catenin signaling in osteoblast-linage cells induces the expression of osteoprotegerin, a decoy receptor of RANKL, which, in turn, inhibits osteoclast formation. We previously reported that Wnt5a, a typical noncanonical Wnt ligand secreted from osteoblast-lineage cells promoted the expression of RANK in osteoclast precursors, thereby enhancing RANKL-induced osteoclast formation (Nature Medicine, 2012). Mechanistically, Wnt5a induced the recruitment of c-Jun on the Rank promoter through Ror2 (a co-receptor of Wnt5a)-mediated signals. We have also reported that Wnt5a-Ror2 signaling is important for the bone destructions in type II collagen-induced arthritis model mice. Thus, Wnt5a-Ror2 signals represent a therapeutic target for bone diseases including arthritis. Recently, two research groups reported that Wnt4 and Wnt16 inhibited RANKL-induced activation of Nf-κb and Nfatc1 in osteoclast precursors, thereby inhibiting osteoclast formation (Nature Medicine, 2014). Both Wnt4 and Wnt16 failed to activate Wnt/β-catenin signaling in osteoclast precursors even though Wnt16 activated Wnt/β-catenin signals in osteoblastic cells. These findings indicate that Wnt4 and Wnt16 inhibit osteoclast formation through the activation of noncanonical Wnt signaling in osteoclast precursors. Furthermore, we have found that Wnt5a-Ror2 signals regulate the bone-resorbing activity of osteoclasts as well as osteoclast differentiation. Thus, these inhibitory Wnt ligands for osteoclastogenesis tightly regulate osteoclast formation in conjunction with Wnt5a. The roles of Wnt5a, Wnt4, and Wnt16 in osteoclast differentiation and function will be discussed.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## Y-1　ヒトの等尺性舌突出時における皮質-筋コヒーレンス解析：脳磁図による研究

○前澤　仁志

北大　院歯　口腔生理

【目的】精緻な舌運動は発声，咀嚼，嚥下に重要な役割を果たしている．舌の随意運動時における大脳皮質の関与を明らかにするために，舌前方突出時の脳磁図と筋電図のコヒーレンス解析を行った．【方法】対象は健常成人 15 名（男性 11 名，女性 4 名，平均 27.4 歳）．等尺性舌前方突出時の両側の舌筋電図と脳磁図の同時計測を行った．脳磁図と筋電図は，サンプリング周波数 997 Hz，周波数帯域 0.1－300 Hz で記録した．脳磁図と筋電図のコヒーレンスは周波数分解能 1 Hz で解析した．対照として短母指外転筋のコヒーレンス解析を行った．皮質-筋の機能的結合を評価するために，13－40 Hz の周波数帯域を解析に用いた．得られた脳磁図-筋電図コヒーレンス分布から電流双極子を計算し，被験者の MR 画像に重畳した．また，脳磁図と筋電図の信号間の時間的関係を調べるため，クロスコレログラムの波形解析により皮質-筋の伝導時間を算出した．【結果】脳磁図-筋電図コヒーレンスは左右側の舌ともに両側半球で 14－36 Hz に認め，左右側の舌ともに対側半球優位であった．左右側の舌の筋電図-筋電図コヒーレンスも 14－32 Hz に認めた．母指の脳磁図-筋電図コヒーレンスは対側半球で 15－33 Hz に認めた．舌の電流源は中心前溝に求まり，母指より前方かつ下方であった．脳磁図と筋電図の時間的関係は，脳磁図が筋電図よりも先行しており，舌運動時における皮質-筋の伝導時間は母指運動時の伝導時間よりも有意に短かった．【結論】舌前方突出時には両側半球の運動野から両側の舌に遠心性運動コマンドが出力され，舌への運動出力は左右半球ともに対側優位であることが示唆された．

【利益相反】申告すべき利益相反はありません．

## Cortico-muscular coherence during isometric tongue protrusion in humans: an MEG study

○Maezawa H

Dept Oral Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent

Purpose: The objective of this study was to investigate the functional connection between both cortical hemispheres and each side of the tongue during voluntary tongue protrusion in humans. Methods: The functional connection was investigated using oscillatory interactions between whole-head magnetoencephalographic（MEG）signals and electromyographic（EMG）signals from both sides of the tongue during isometric tongue protrusion. We also recorded MEG-EMG coherence for thumb during the abductor pollicis brevis（APB）contraction. Result: MEG-EMG coherence was observed at 14-36 Hz over both hemispheres for each tongue side. Thumb coherence was detected at 15-33 Hz over the contralateral hemisphere. Tongue coherence at 14-36 Hz was larger over the contralateral than that over the ipsilateral hemisphere for both tongue sides. The sources for tongue were located in the lower part of the central sulcus and were anterior and inferior to the APB areas, thus agreeing with the classical homunculus in the primary motor cortex. The time lag between the cortex and tongue was shorter than the time lag between the cortex and thumb. Conclusions: These results suggest that during tongue protrusions, descending motor commands are modulated by bilateral cortical oscillations, and each tongue side is dominated by the contralateral hemisphere.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## Y-2 NF-κB p65 は Smad4 と結合することで BMP2 誘導性の骨形成を抑制する

○平田-土屋 志津[1,2]，福島 秀文[3]，片桐 岳信[4]，大手 聡[4]，進 正史[4]，永野 健一[5]，青木 和広[5]，諸冨 孝彦[2]，杉山 悟郎[1]，中富 千尋[1]，古株彰一郎[1]，土井 貴裕[6]，竹内 弘[1]，大谷 啓一[5]，寺下 正道[2]，平田 雅人[7]，北村 知昭[2]，自見英治郎[1]

[1]九歯大 健康増進，[2]九歯大 口腔機能，[3]福歯大 細胞生理，[4]埼玉医大 ゲノム 病態生理，[5]医科歯科大 院医歯 硬組織薬理，[6]理研 生体応答情報技術開発サブチーム，[7]九大院歯 口腔細胞工学

骨形成タンパク質 BMP は，転写因子 Smad 依存性に骨芽細胞分化や異所性骨の形成を誘導する．一方，転写因子 NF-κB は炎症反応や免疫応答などに関与する．我々はこれまでに，NF-κB の活性化が BMP 刺激による骨芽細胞分化を抑制することを明らかにしてきた．そこで NF-κB の活性化が BMP 刺激による骨芽細胞分化を抑制する分子機構について検討した．BMP2 のみ，あるいは BMP2 と NF-κB 阻害剤を含有・凍結乾燥した各コラーゲンペレットをマウス背筋膜下に移植したところ，BMP2 と NF-κB 阻害剤を含有したペレットにおいて，骨形成量が増加した．また，胎生 13.5 日齢の野生型（WT），および p65 欠損（p65-/-）マウス胎仔から調製した線維芽細胞（MEF）を BMP2 で刺激すると，p65-/- MEF では，WT MEF と比較して強い ALP 活性上昇と多数の ALP 陽性細胞が誘導された．しかし，両細胞間で Smad1/5/8 のリン酸化レベルに差は認められなかった．次に p65 および Smad4 の野生型および遺伝子欠失変異体を作製し，BMP シグナルに対する p65 の作用機序を検討した．p65-/- MEF に WT p65 を過剰発現させると，BMP2 刺激で誘導される Id1-Luc レポーターの活性が抑制された．しかし，p65 の TA2 領域を欠失させた変異体には抑制効果が認められなかった．さらに p65 は Smad1 とは結合せず Smad4 の MH1 ドメインを介して結合した．以上より，p65 の TA2 領域が Smad4 の MH1 領域と相互作用し，Smad 複合体の DNA 結合を抑制することで BMP 刺激による骨芽細胞分化を抑制すると考えられる．このことから p65 と Smad4 との会合部位を特異的に阻害する薬剤ができれば，BMP による骨形成を促進する有効な創薬になる可能性が考えられる．

【利益相反】利益相反状態にありません．

## Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF-κB via an interaction with Smad4

○Hirata-Tsuchiya S[1,2], Fukushima H[3], Katagiri T[4], Ohte S[4], Shin M[4], Nagano K[5], Aoki K[5], Morotomi T[2], Sugiyama G[1], Nakatomi C[1], Kokabu S[1], Doi T[6], Takeuchi H[1], Ohya K[5], Terashita M[2], Hirata M[7], Kitamura C[2] and Jimi E[1]

[1]Dept Health Improvement, Kyushu Dent Univ, [2]Dept Oral Function, Kyushu Dent Univ, [3]Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll, [4]Div Pathophysiol, Res Center Genomic Med, Saitama Med Univ, [5]Sec Pharmacol, Dept Bio-Matrix, Grad Sch, Tokyo Med Dent Univ, [6]Technol Deve Team for BioSignal Program, Subteam for BioSignal Integration, RIKEN BioResource Center, [7]Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Bone morphogenetic proteins（BMPs）enhance bone formation and osteoblast differentiation *in vivo* and *in vitro* via a Smad signaling pathway. Recent findings revealed that the activation of nuclear factor-κB（NF-κB）inhibits BMP-induced osteoblast differentiation. Here, we show that NF-κB inhibits BMP signaling by directly targeting the Smad pathway. In mouse embryonic fibroblasts（MEFs）prepared from mice deficient in p65, the main subunit of NF-κB, BMP2 induced osteoblastic differentiation via the Smad complex to a greater extent than that in wild-type MEFs. In p65-/- MEFs, the BMP2-activated Smad complex bound much more stably to the target element than that in wild-type MEFs without affecting the phosphorylation levels of Smad1/5/8. Overexpression of p65 inhibited BMP2 activity by decreasing the DNA binding of the Smad complex. The C-terminal region, including the TA2 domain, of p65 was essential for inhibiting the BMP-Smad pathway. The C-terminal TA2 domain of p65 associated with the MH1 domain of Smad4 but not Smad1. Taken together, our results suggest that p65 inhibits BMP signaling by blocking the DNA binding of the Smad complex via an interaction with Smad4. Our study also suggests that targeting the association between p65 and Smad4 may help to promote bone regeneration in the treatment of bone diseases.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## Y-3　歯の他家移植はマウス歯髄幹細胞/前駆細胞の維持を阻害する

○斎藤浩太郎

新潟大　院医歯　硬組織形態

歯髄幹細胞/前駆細胞は歯の損傷後の歯髄治癒過程を規定する鍵となる役割を担うが，歯の自家および他家移植後のこれらの細胞の長期的動態やその維持機構に関しては十分明らかになっていない．そこで本研究は，歯髄幹細胞/前駆細胞維持機構を明らかにすることを目的に，歯の自家および他家移植後のこれらの細胞の長期的動態を検索した．妊娠 ICR マウスに 3 日間 BrdU を腹腔内投与し，生後 3 週齢仔獣の上顎第一臼歯を抜去後に再植，あるいは歯根を除去したのちに舌下部に自家および他家移植し，Label-retaining cells（LRCs）の動態を追跡した．術後 1 から 8 週間後にマウスを固定し，電顕にて観察，あるいは抗 Nestin，抗 BrdU，抗 Osteopontin，抗 Ki-67 免疫組織化学，*Dentin sialophosphoprotein*（*Dspp*）の *in situ* hybridization および TUNEL 染色を光顕にて観察した．再植および舌下自家移植後の歯髄では，実験期間中を通して LRCs が維持されており，これらの細胞は高い増殖能と象牙芽細胞への分化能を有していた．一方，舌下他家移植後の歯髄では，免疫学的拒絶反応が認められない標本においても LRCs は術後 4 週に歯髄中央部から消失した．舌下他家移植では，術後 1 週において LRCs のアポトーシスが有意に亢進していたが，再植および舌下自家移植では有意な差は認められなかった．以上より，他家移植に伴うドナー・ホスト間相互作用が歯髄幹細胞/前駆細胞の維持を阻害し，結果としてこれらの細胞の消失を誘導することが示唆された．本口演では，歯髄幹細胞/前駆細胞の局在と維持機構の解明に向けて，現在研究を進めているマイクロアレイ解析にて他家移植後の歯髄中で下方制御される因子の探索と Doxycycline 誘導 H2B-GFP マウスを用いた研究結果についても紹介する．

【利益相反】利益相反状態にありません．

## Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice

○Saito K

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

This study aimed to elucidate the influence of allograft on the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells following tooth replantation and allo- or auto-genic tooth transplantation in mice using BrdU chasing, immunohistochemistry for BrdU, Osteopontin, Nestin and Ki67, *in situ* hybridization for *Dspp*, transmission electronmicroscopy and TUNEL assay. Following extraction of the maxillary first molar in BrdU-labeled animals, the tooth was immediately repositioned in the original socket, or the roots were resected and immediately allo- or auto-grafted into the sublingual region in non-labeled or the same animals. In the replants and autogenic transplants, dense LRCs remained in the center of dental pulp associating with the perivascular environment throughout the experimental period and possessed a proliferative capacity and maintained the differentiation capacity into the odontoblast-like cells or fibroblasts. In contrast, LRCs disappeared in the center of the pulp tissue by postoperative week 4 in the allografts. The disappearance of LRCs was attributed to the extensive apoptosis occurring significantly in LRCs except for the newly-differentiated odontoblast-like cells even in cases without immunological rejection. The results suggest that the host and recipient interaction in the allografts disturbs the maintenance of dense LRCs, presumably stem/progenitor cells, resulting in the disappearance of these cell types.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## Y-4　骨細胞は破骨細胞形成抑制因子としてインターフェロンβを産生する

○林田千代美

明海大　歯　口腔解剖

骨リモデリング機構の維持（骨吸収と骨形成の均衡維持）には，力学的負荷が重要で，骨細胞は，負荷を感知し，リモデリング調節の司令塔と推測されている．リモデリングは適宜局所的に行われ，通常，骨格の大半はリモデリング不要な状態にある．そこで，不必要に骨吸収が起こらないためには，破骨細胞形成を抑制する仕組みが働き，それを制御するのは骨細胞であると考え，その機構解明を目的として本研究を遂行した．

M-CSF による骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞の分化誘導期に，株化骨細胞 MLO-Y4 の培養上清を添加し培養した細胞では，破骨細胞への分化能低下，RANKL 誘導性 c-fos タンパク質の翻訳阻害，*Protein kinase R* mRNA 増加，転写因子 STAT のリン酸化促進が観察された．これらの作用は，抗 interferon-β（IFN-β）中和抗体によって一部回復した．初代骨細胞についても検討するため，骨細胞のみを含む骨片（OEBF）を調製し，骨髄細胞と非接触状態で共存培養した．M-CSF と sRANKL により破骨細胞分化を誘導すると，OEBF は破骨細胞分化を抑制し，その抑制効果の一部は IFN-β 依存的であった．

IFN-β の全身性欠損マウスは骨粗鬆症を呈するため，IFN-β が骨の粗鬆化（破骨細胞形成の亢進状態）を抑制する因子であること，そして，そのメカニズムとして，RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が IFN-β を産生し，オートクライン・パラクライン的に作用して破骨細胞分化を抑制するというネガティブフィードバック機構が 2002 年に報告されているが，本研究から，RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が産生する量よりもはるかに大量の IFN-β を骨細胞が産生することも明らかとなり，骨細胞が産生する IFN-β が破骨細胞形成の負の制御に重要な役割を演じていることが示された．

【利益相反】演題発表に関連し，開示すべき利益相反関係にある企業などはありません．

## Osteocytes produce interferon-β as a negative regulator of osteoclastogenesis.

○Hayashida C

Dept Oral Anat, Meikai Univ Sch Dent

Although old and disordered bones are continuously remodeled with new ones to maintain the integrity, the most surface of bones are in non-resorbing status. We assumed that osteocytes negatively regulate osteoclast differentiation and function to keep the non-resorbing status. Based on the hypothesis, we examined the role of osteocytes in regulating osteoclastogenesis.

When osteoclast precursors were formed from bone marrow cells（BMs）by M-CSF treatment with conditioned medium（CM）from osteocytic MLO-Y4 cells, the generated cells diminished the capacity for osteoclastogenesis. The decreased capability was consistent with the increased *protein kinase R* mRNA expression and the decreased c-Fos translation. Furthermore, the CM induced the phosphorylation of STAT-1 in osteoclast precursors. To confirm the effect of MLO-Y4 CM, we prepared non-osteocytic cell-free osteocyte-enriched bone fragments（OEBFs）. The OEBFs, as well as MLO-Y4 CM, reduced the commitment of BMs into osteoclast precursors. These effects were partially abrogated by anti-interferon（IFN）-β neutralizing antibody. Indeed, the MLO-Y4 cells and the primary osteocytes embedded in OEBFs expressed IFN-β greater than osteoclast lineage cells.

In conclusion, we found that osteocytes produce IFN-β as an inhibitory factor of osteoclastogenesis. Our findings may provide a new insight into the mechanisms underlying the osteocytic regulation for bone remodeling.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## LS-1　エルゼビア社主催　若手研究者のための Author Workshop：学術論文作成に必要な画像処理とプレゼン技法について

○大島　勇人[1,2]

[1]新潟大　院医歯　硬組織形態，[2]J Oral Biosci 誌編集委員長

研究はその成果としての論文や本の出版を伴う．言い換えれば，研究者は論文や本の出版を通して社会に研究成果を還元する義務を負っている．したがって，論文執筆作業は研究者にとって極めて重要な社会的な活動であると言える．研究者は物事を明らかにしようとするときに仮説を提唱し，その仮説を検証していく．先人たちの研究結果や自分の実験により得られた結果をベースに，いかに論理的に仮説を構築して，それを検証していくかが重要になる．それには，徹底した情報取得と得られた情報の信頼性の評価が「科学的方法」の活用の必要条件となる．また，「仮説」と「実験」との間には密接な相互関係があり，実験的に立証不可能な仮説は空想であるといえる（Paul K Nakane 2014）．一方，「発表する」ことは論理的な検証の第一歩であり，聴き手にとって「ためになり，面白く，わかりやすく」なくてはいけない．貴重な時間を，プレゼンを聴くことに費やしているからである．常に聴き手の立場に立ってプレゼンができるように配慮することが重要になる．学術的なプレゼンの場合には，序論・本論・結論の三部構成にするのが一般的である．高等学校までに学習する文章のスタイルは「起承転結」が一般的かもしれない．起承転結とは，問題提起→起を承けた展開部分→論理をいったん転ずる→まとめの「四拍子」の展開である．（英語の場合は特に）論理的なまとまりをもった文章を表現するときには，まず大きな枠組みをつかみ，だんだん細くしぼりこんでいくことが原則であり，序論・本論・結論の「三拍子」の要素から構成されるのが基本である．
本講演では，若手研究者を対象に，得られた情報の信頼性の評価の鍵を握る画像処理技法について解説し，学術論文を効率的に作成するコツを伝えたい．さらに，学会でのプレゼンを聴き手にとってわかりやすく魅力的なものにするポイントについても言及したい．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Author workshop for young researchers supported by Elsevier: How to make a scientific paper including image processing and give an impressive presentation

○Ohshima H[1,2]

[1]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci,　[2]EIC of J Oral Biosci

Research urges researchers to publish papers and books. In other words, researchers is obliged to contribute their research outcomes back to the general public with the publication of papers and books. Thus, making a scientific paper is a quite important social activity for researchers. For the clarification of some concerns, researchers aim to propose a hypothesis and verify whether this hypothesis is right or not. To achieve this purpose, it is essential to create a logical hypothesis based on the findings obtained from the previous studies and how the researchers verify the hypothesis is a key step in their success. The thorough information acquisition and the evaluation of information reliability are prerequisite steps for the application of scientific strategy. On the other hand, giving a presentation is the first step for the logical verification of raised concerns and should be instructive, interesting, and intelligible for an audience. The scientific presentation is composed of “introduction”, “body”, and “conclusion.” The speakers lay out the outline first and move to the details as funneling liquid. In this lecture, I focus on the preparation of a scientific paper including image processing tips and how to give an impressive presentation.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## LS-2　医の博物館への招待

○西巻　明彦

日歯新潟　医の博物館

医の博物館は平成元年 9 月，新潟県より博物館相当施設として日本で最初に認可を受けた医学専門博物館であり，同時に大学内博物館でもある．博物館の理念は，創設者であり現在も館長である中原　泉学長（日本歯科大学理事長・学長）が,「現在は過去の蓄積ですから，私どもの今は先人の努力の積み重ねの上に成り立っています．とりわけ学術文化の世界においては，後人の仕事はあくまでも先人の活動の継承であります」と述べている．医の博物館の目的は医学および医療に関する資料を収集・保存し，医学史の教育研究，さらに資料を一般公開し，学術文化の発展に寄与することである．現在，医の博物館が所蔵する史料は約 2 万点で，すべて寄贈によるものであり，医・歯・薬に関する資料が展示・保管されている．代表的な資料としては，アンドレアス・ヴェサリウスの『人体の構造に関する 7 つの章』（1543），チャールズ・ダーウィンの『種の起源』（1859），エドワード・ジェンナーの『牛痘法の研究』（1798），さらに近代歯科医学の始まりといわれるピエール・フォシャールの『外科歯科医』（1823），山脇東洋の『蔵志』（1759），杉田玄白・前野良沢の『解体新書』（1774）などを展示している．

博物館の扉をあけると向かって右側に『人体の構造に関する 7 つの章』が展示されている．特徴的な事は，身体が骨・筋肉など 7 つの部分に分けて描写，記述されていることである．この時期の解剖図は解剖体がポーズをとり，背景に風景が描かれている．これは 15～16 世紀にかけては常に人々が自分の死を思い，自分の死に備えるメメント・モリ（死を思え）が一般的であり，また宗教により支配された中世から，1 人の人格としての自我意識の目覚めがこのような描写になったと言える．

博物館は空間と時間の変化の中で，空間時間を越えて私達のアイデンティティを過去と現在を結びつける装置として大きな意義があると考える．

【利益相反】なし

## Guidance to museum of medicine and dentistry

○ Nishimaki A

Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Museum of Medicine and Dentistry

This museum opened in September, 1989 as the first museum of medicine and dentistry in this country. Expanded from the Room of Medical and Dental Materials formerly established in 1977, it is now a public museum, registered by the Niigata Prefecture. The museum's purpose is to contribute to the progress of science by providing an arena for the use of historical materials in education and research.

A confirmation of our scholastic spirit: History is not merely a chronological table. 'Today' obviously comes after 'Yesterday' and 'the Present' is the accumulation of the 'Past', so it can be said that what we are, is based on the accumulation of every effort made by our predecessors.

Above all, in the field of science, it is necessary to know that we are merely inheritors of our predecessors' achievements. There is no study without history and to belittle our history is to belittle our own efforts.

Thus, the museum is a confirmation of our taking pride in our history and honoring those who came before us.

1980 年　日本歯科大学歯学部卒
1984 年　日本歯科大学大学院歯学研究科修了（組織学）歯学博士を授与される
1992 年　日本歯科大学新潟歯学部医の博物館非常勤講師
現在　　日本歯科大学新潟生命歯学部医の博物館客員教授・副館長
　　日本歯科医史学会理事

## SS1-1　象牙質の進化と歯の進化

○田畑　　純

医科歯科大　院医歯　硬組織構造生物

象牙質の起原は，古生代のいわゆる“甲冑魚”のもつ甲皮と考えられている（Halstead 1969）．甲皮は上層から様象牙質，様海綿状骨，様層板状骨の 3 層からなる分厚く重い硬組織であったが，やがて，薄く軽い硬組織へと変貌していく．そして，体表に残ったものはウロコへ，体内へ移動したものは体幹骨へ，口腔内へと入ったものは歯となったと考えられている．では，なぜ，体幹骨は骨だけでできており，歯は象牙質，セメント質，エナメル質の複合体に成り得たのだろうか．また，ウロコは咀嚼と無関係であるにもかかわらず，シーラカンスのウロコやハコフグの骨鱗のように象牙質様の構造があり得るのはなぜだろうか．本シンポではこうした謎について考察を試みつつ，いくつかの話題を提供したい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Dentin evolution and tooth evolution

○Tabata M J

Sec Biostructural Sci, Grad Sch Med & Dent, Tokyo Med Dent Univ

Origin of dentin is considered to be the ostracoderm, on which so-called “armored fish” in the Paleozoic era draped (Halstead 1969). Ostracoderm, which had been thick and heavy 3-layered hard tissue composed by dentin-like layer, spongy bone-like layer, and lamellar bone-layer, was evolving into thin and light hard tissue. During this evolution, the tissue remained in the body surface became fish scales, the tissue dived into body deep became bony skeleton, and the tissue immigrated into oral cavity became tooth. However, the skeleton why choose bone, and the tooth why become complex composed by dentin, cementum and enamel?　Fish scale is not masticatory organ. But why fish scale, in the case of Coelacanth and boxfish, has often dentin-like structure?　So, I will try to examine the enigma as above, and to present topics of interest.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS1-2　下等脊椎動物における象牙質の多様性と進化

○笹川　一郎

日歯新潟　先端研

魚類を中心に象牙質の多様性と進化を検討し，象牙質の基本的な特徴を探る．無顎類の皮甲表層にある歯状体（象牙質結節）あるいは小鱗に真正象牙質の原型が認められる．この段階から保護のための硬組織であると同時に感覚器の機能と過剰なカルシウム排泄機能を合わせ持っていたとされる．骨と真正象牙質の間には細胞の極性の程度によりいくつか中間的構造が存在する．歯をもつ顎口類のなかで，魚類には多様な象牙質がある．それらは真正象牙質，骨様象牙質，脈管象牙質，皺壁象牙質，均質象牙質などである．間葉細胞のみによって形成される高石灰化組織のギンザメのプレロミンと肺魚の岩様象牙質，間葉細胞と上皮細胞の両者によって形成されるエナメル質様高石灰化組織である板鰓類型エナメロイドと硬骨魚類型エナメロイドも象牙質の特殊な型と考えられる．これらは象牙質形態形成の多様性を示している．脊椎動物の上陸により内骨格が発達し，鱗などの外骨格は縮小するが，水中に残った条鰭類魚類でも似たような過程が進行する．歯では真正象牙質とエナメル質の組み合わせを持つ肉鰭類の系統が上陸して両生類となる．初期の迷歯類は発達した皺壁象牙質を有し，この形質は魚類の肉鰭類，基幹条鰭類と共通する．皺壁象牙質は爬虫類・哺乳類の一部にも引きつがれる．象牙質はその進化の過程を反映した多様性を内包しており，哺乳類でも形成条件の変化によってそれらが顕現すると考えられる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Variation and evolution of dentin in lower vertebrates

○Sasagawa I

Adv Res Center, Nippon Dent Univ at Niigata

To examine the fundamental features of dentin, the variation and evolution of dentin in lower vertebrates are discussed. In Paleozoic agnathans（Ostracodermi）, prototype of orthodentin（tubular dentin）was found in the odontodes（dentin tubercles）situated at the outermost layer of dermal armors. The functions of the dermal armors were not only protection, but also sensitivity and deposition of superfluous calcium. Several types of intermediate structures existed between the orthodentin and bone. In ganthostomes, there were a bewildering variety of dentin found in the teeth of fish, e. g. orthodentin, osteodentin, vasodentin, plicidentin and homogenous dentin. It is possible that pleromin in chimaeras and petrodentin in lungfish as well as enameloid are recognized to be a type of dentin. Ancestor of terrestrial vertebrates is sarcopterygians in which teeth consist of orthdentin and enamel. Plicidentin is a common character among labyrinthodont amphibians as well as basic actinopterygians and sarcopterygians. It is likely that the evolutionary background causes in parts the variation occurring during dentinogenesis even in mammals.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS1-3　高石灰化組織となる象牙質，肺魚の Petrodentine

○岡　　俊哉[1]，石山巳喜夫[2]，笹川　一郎[3]

[1]日歯新潟　生物
[2]日歯新潟　新潟短大　歯科衛生
[3]日歯新潟　先端研

【目的】肺魚類の歯は，歯板と呼ばれる特徴的な形状を示す．歯板の主要な構成成分である petrodentine（岩様象牙質）は石灰化度が高く哺乳類のエナメル質に匹敵する硬度を有する．petrodentine は条鰭類や板鰓類の歯を構成しているエナメロイドと酷似した組織構造と石灰化度を持つ一方で，その発生様式が大きく異なり，周囲の骨様象牙質と同様に odontoblast のみの関与で形成される．その機構の詳細を解明するため，petrodentine 形成細胞について組織化学的な検索を試みた．
【方法】3 種の現生肺魚（*Protopterus aethiopicus, P. dolloi, Lepidosiren paradoxa)*を入手，常法により組織切片を作成した後，ALP，ACP，TRAP 等の酵素組織化学染色，ワンギーソン，PAS などの一般染色および，各種免疫染色，透過電顕による観察を行った．
【結果と考察】肺魚 odontoblast には ALP および ACP の高い酵素活性を示す時期があり，ワンギーソン染色の光顕像とあわせて petrodentine 形成過程における有機基質の分解と吸収という二相性の細胞機能を裏付ける所見と考えられた．petrodentine の前駆体（prepetrodentine）形成，および引き続いて起こる petrodentine 成熟完了前後の odontoblast は PAS 強陽性を示し，電顕による観察でも odontoblast の細胞質および突起部分にグリコーゲンの顕著な貯留が確認された．odontoblast による petrodentine 形成には，グリコーゲンの蓄積が何らかの重要な役割を果たしている事が推察される．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Petrodentine（hypermineralized dentin）in lungfish

○Oka S[1]，Ishiyama M[2]，Sasagawa I[3]

[1]The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Dept Biol
[2]The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Junior Coll
[3]The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Adv Res Center Anat

**Introduction:** Petrodentine, a principal constituents of the lung fish tooth plate, is a well-mineralized tissue similar to mammalian enamel, and analogous to enameloid. Petrodentine is formed solely by odontoblasts, while enameloid is a composite tissue produced by both odontoblasts and dental epithelial cells. To clarify the details of petrodentine formation, the odontoblasts during the stage of petrodentine formation were investigated using histological and histochemical techniques.
**Materials and Methods:** Three species of extant lungfish（*Protopterus aethiopicus, P. dolloi, Lepidosiren paradoxa*）were used in this study. Tooth plates during the stage of petrodentine formation were observed by means of histochemistry to detect enzyme activity, acid phosphatase（ACPace）, alkaline phosphatase（ALPace）and tartrate-resistant acid phosphatase（TRAP）, and PAS reaction to identify glycogen. In addition, conventional transmission electron microscopy was used for observing the fine structure.
**Results and Discussions:** Odontoblasts showed marked ALPase and ACPase activities during the maturation stage, but not during the secretory stage. The morphological and histochemical results suggest that odontoblasts have two functional stages. During the stage of maturation, odontoblasts showed intense PAS reaction, and glycogen particles were observed by transmission electron microscopy. These results suggest that glycogen in odontoblasts play an important role in the development of petrodentine.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS1-4　爬虫類（ワニ）の象牙質形成，成長線形成機構を中心に

○三島　弘幸

高知学園短大　医療衛生

爬虫類のワニ類は哺乳類以外でセメント質と歯槽骨をもつ現生動物である．また歯の交換様式では一生歯性や二生歯性とは異なり，多生歯性である．象牙質では成長線が明瞭に観察できる．ワニ類の象牙質形成や石灰化様式，あるいは成長線に関する特徴を検索することを研究の目的とした．研究材料はアメリカアリゲーター *Alligator mississippiensis*，クチヒロカイマン *Caiman latirostris*，メガネカイマン *Caiman crocodilus* を用いた．
多生歯のワニでは，象牙前質の幅は 4-25 μm であり，髄角部で広く，根尖部につれて狭くなっていた．歯冠部の石灰化前線面において石灰化球の大きさは哺乳類のものより小型であった．髄角部から根尖部にかけて，石灰化球の形態は変化していた．歯根の根尖部では石灰化球が観察されなかった．石灰化球の表面は針状構造を呈していた．ヒトなどの有根歯と異なり，石灰化球の Ca/P 比では歯冠部と歯根部で差異が見出されなかった．Ca，P，Mg，S，Al の元素が検出された．根尖孔が閉鎖したヒトの石灰化球と異なり，微量元素として Cl が検出された．象牙質の顕微ラマン分光分析では，一生歯性のクジラの結晶に比較し，$CO_3$が多く含有していた．象牙質結晶の配向性において，ワニの歯冠部ではヒトなど有根歯と異なり，結晶の配向性が認められた．歯冠部で成長線が明瞭であり，結晶の配向は成長線の方向やコラーゲン線維の配列と平行であった．孵化前において，4 μm 周期の規則的な成長線が観察された．孵化後においては，象牙質の成長線の形成周期では，① 1 日周期，② 2－3 日周期，③ 14 日周期，④月齢（28 日）周期の 4 種の成長線周期が見出された．成長線の周期性は出産前後で変化する可能性が示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がない．

## Dentin formation and formation mechanism of incremental lines in crocodilian, reptile

○Mishima H

Dept Med Hygiene, Dent Hygiene Course, Kochi Gakuen Coll

The width of predentin was 4-25 μm. Calcospherites of crocodilian teeth of polyphyodont were smaller than those of mammalian teeth of diphyodont. The shape of calcospherites changed from the pulp horn region of crown predentin to the apical region of root predentin. The calcospherites were not observed in the apical region. The surface of calcospherites had needle-like structure. The Ca/P ratio of crocodilian calcospherites did not have the regional difference like that of human calcospherites. In the enamel-covered crown dentin of crocodilian polyphyodont teeth, the crystal orientation was recognized. The axis of crystal orientation was almost parallel to the tooth axis and almost to the direction of incremental lines in dentin. Before hatching, the incremental lines were uniform, and their average width was 4 μm. After hatching, the incremental lines of periodicity were observed in the dentin. The four type's incremental lines were 1-day interval, 2-3 days interval, approximately 14-day interval, and approximately 28-day interval, respectively.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS1-5　脊椎動物の進化における骨格形成の変遷

○山口　　朗

東歯大　口腔科学研究センター

5 億 4 千年前のカンブリア期にさまざまな形の生物が誕生し，3 億 4 千万年前に脊椎動物が初めて上陸したと考えられている．その後，我々人類の骨格が形成されるまでに，脊椎動物の骨格は環境に適応して様々な変遷を遂げてきたと考えられる．特に，水生と陸生の脊椎動物との間では生活する環境要因が大きく異なるために，水生から陸生に移行した時に骨格にもダイナミックな構造的変化が起り，新たな機能を獲得したと想像される．

水生脊椎動物は浮力に助けられて活動するために彼らの受ける重力は約 1/6G といわれているが，陸生脊椎動物は常に 1G の重力に抵抗して活動している．また，水生脊椎動物と陸生脊椎動物ではカルシウムの摂取法に関しても大きな差異がある．水生脊椎動物は周囲の水にカルシウムが含まれているために，生活に必要なカルシウムは効率良く水中から採取することが可能で，生体内にカルシウムを貯蔵するための組織，器官は必要としないかもしれない．しかし，陸生脊椎動物は空気中にカルシウムが存在しない環境で生存するために，生活に必要なカルシウムは食物から摂取する必要が生じ，骨格がカルシウムを貯蔵する組織，器官として重要な役割を担うようになったと考えられる．

以上のように水生脊椎動物と陸生脊椎動物の骨格は，重力に対する抵抗性とカルシウム貯蔵庫としての機能の点で大きく異なり，このような差異は骨格の形態と機能にも反映されていると想像できる．我々はこのような観点から水生脊椎動物と陸生脊椎動物の骨格の差異を明らかにすることを目的として種々の脊椎動物の骨格を形態学的に解析している．本発表では種々の脊椎動物の骨格の形態学的特徴を述べ，その構造がカルシウムの貯蔵庫としての機能に適しているか否かを考察したい．

【利益相反】本発表に関する利益相反はなし．

## Evolutional changes in skeletal tissues in vertebrates

○Yamaguchi A

Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

Vertebrates live in various environments. The morphology and function of bones might be affected by the habitats of each vertebrate, because the mechanical strain and the mineral intake are different between aquatic and land vertebrates. Many studies have been conducted on the morphology and function of bones in mammals, but the number of such studies in fishes, amphibians, and reptiles is limited. Further, the details of bone structure in fishes, amphibians and reptiles have not been elucidated by standardized techniques to assess the function of bone. This lack of extensive comparative research hampered the understanding of not only the phylogeny of bones but also the evolutional changes in bone metabolism. To understand the evolutional changes in the interaction between morphology and function of bones, we investigate the bone structures in various vertebrates. In the present study, I would like to discuss the roles of bone structures in the mineral storage among various vertebrates.

***Conflict of Interest:*** The author declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-1　エナメル質の起原

○川崎　和彦

ペンシルバニア州大　人類

エナメル質は非コラーゲン性の基質が，分泌後ただちに石灰化を開始して形成する点で，骨や象牙質など他の硬組織と大きく異なる．このためエナメル質の基質を形成するアメロゲニン，アメロブラスティンおよびエナメリンはかなり特殊な機能をもつタンパク質であり，これらをコードする遺伝子の進化は，エナメル質の進化と強く結びついていると考えられる．ところが，これらの遺伝子は進化速度がきわめて速く，進化の過程は長い間不明であった．しかしゲノム配列を利用し，遺伝子の構造や染色体上での位置を解析した結果，これらのエナメル基質の遺伝子は，脊椎動物の進化の過程で共通の祖先遺伝子から重複して生じたことが示唆された．さらに骨や象牙質の基質遺伝子の多くもまたこの祖先遺伝子から重複してできたことが示唆され，これらの遺伝子はSCPP遺伝子群と呼ばれるようになった．SCPP遺伝子群の発見はエナメル質がより古い組織である骨や象牙質から進化したことを示唆する．次にエナメル基質遺伝子の系統分布を調べてみると，肉鰭類であるシーラカンスはすべての遺伝子をもつが，条鰭類であるガーは哺乳類のエナメル基質に最も多く含まれるアメロゲニンをもたないことがわかった．マウスを用いた実験により，アメロゲニン遺伝子が欠損してもエナメル質は形成を開始するが，アメロブラスティンあるいはエナメリンが欠損するとエナメル質を全く形成しないことが知られている．この結果は，エナメル質の起源がアメロゲニンの起源より古いこと，さらにガーの歯や鱗で認められるエナメル質が古いエナメル質の特徴を維持していることを示唆する．化石資料では，条鰭類と肉鰭類の共通祖先のエナメル質は鱗でのみ認められる．またギンザメにはSCPP遺伝子が一切みつからない．以上から，アメロゲニンの起源より古いエナメル質は硬骨魚類の鱗で進化し，これがのちに歯で使われるようになったと考えることができる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する

## The origin of dental enamel

○Kawasaki K

Dept Anthropol, Penn State Univ

The dental enamel is characterized by the non-collagenous organic matrix that initiates mineralization immediately after deposition. This suggests highly specialized characters of the principal enamel matrix proteins, amelogenin, ameloblastin, and enamelin, and a strong relationship between the evolution of enamel and evolution of the genes coding for these proteins. However, the evolution of these genes had been largely unknown due to their high evolutionary rates. It was genome sequences that allowed us to delineate the origin and evolution of these genes. Our genome analyses suggested that the enamel matrix genes and various other genes involved in bone and dentin mineralization arose by repeated duplications from a common ancestor. We now refer to them as the secretory calcium-binding phosphoprotein（SCPP）genes. This finding implies that the enamel arose by modifications of a bone- or dentin-like tissue that arose earlier in vertebrates. Phylogenetic distribution of the enamel matrix genes further suggests that a primitive enamel arose in a common ancestor of lobefins and rayfins and that the true enamel arose subsequently in lobefins. The fossil record reveals that common ancestors of rayfins and lobefins had enamel on the scale surface. This enamel appears to be ancestral to our dental enamel.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-2　四肢動物のエナメル質の分子進化

○新谷　誠康

東歯大　小児歯

歯は顎との共存的進化により，捕食器という生存のための必須の器官として利用され，脊椎動物に適応放散と繁栄の礎を与えたと考えられている．ゆえに歯の進化をたどることは，生物進化を研究する上で重要なことであり，歯の分子進化学的研究はその一端を担うものである．歯の細胞外基質タンパク質は骨の非コラーゲン性基質タンパク質やミルクカゼイン，唾液タンパク質群とともに遺伝子重複の結果現れた分泌型カルシウム結合リン酸化タンパク質の一部であると考えられている．なかでも，エナメル質の形成に関与する細胞外基質タンパク質やタンパク質分解酵素には歯に特異的な分子が多い．我々はこれまでにエナメル質形成に関与する分子のうち，アメロジェニン，アメロブラスチン，エナメライシン（マトリックスメタロプロテイナーゼ 20）の四肢動物における分子進化に関する研究に携わってきた．その結果，これらの分子には四肢動物の進化を通して保存されてきた特徴が存在することがわかった．このような特徴は機能を営むために必要不可欠であったため，負の選択圧が働いた結果保存されたものと考えられる．一方で，種間にアミノ酸配列や遺伝子構造，発現様式の変化が生じていることを見いだした．動物の硬組織にエナメル質が出現してから，これらの分子は独自の進化をたどってきたと考えられ，その帰結として現生動物のエナメル質が存在している．エナメル質は両生類，爬虫類，哺乳類間でその形態学的構造が異なっている．それゆえ，これらの遺伝子の発現量の加減や発現タイミングの変化，コードするタンパク質の変化がエナメル質の進化を引き起こしてきたと考えられる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する

## Molecular evolution of dental enamel in tetrapods

○Shintani S

Dept Pediatr Dent, Tokyo Dent Coll

One of the major innovations accompanying the emergence of jawed vertebrates was the development of teeth, as the combination of jaws and teeth enabled gnathostoma to colonize new environmental niches and allowed adaptive radiation. To understand how this innovation occurred, it is necessary to delineate the evolutionary history of the genes involved in tooth development. Enamel matrix proteins are considered to be included in a secretory calcium-binding phosphoprotein family and have arisen by gene duplication and subsequent divergent evolution of a single ancient gene. We have investigated the molecular evolutions of tooth-specific enamel forming molecules such as amelogenin, ameloblastin and enamelysin（matrix metalloproteinase 20）. It was observed that each molecule shared common characteristics in tetrapods, suggesting that negative selection might be acting against functional changes. On the other hand, several changes of amino acid sequences, gene structures and expressions of the molecules were found during evolution. The evolutionary consequences of the molecules lead to morphologically different enamel among amphibians, reptiles and mammals. Furthermore, transitions in the organization of the enamel are also considered to be a reflection of the addition, diminution, or changes in timing for gene expression of the molecules.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-3　肉鰭類アメロジェニン遺伝子の分子生物学的解析

○三上　正人

日歯新潟　微生物

エナメル質の系統発生を考える上で，基質の主要蛋白であるアメロジェニンの存在が有効な指標となる．免疫組織化学的なデータから魚類では条鰭類の一部と肉鰭類にエナメル質が存在するとされてきたが，それらの遺伝子解析は進んでいなかった．我々は種々の両生類のアメロジェニン遺伝子の塩基配列をもとにPCRプライマーを設計し，肉鰭類の一種である肺魚の歯板cDNAライブラリーからアメロジェニンと推定される遺伝子をクローニングした．cDNAとして619塩基からなり，アミノ酸128残基をコードしていた．両生類以上のアメロジェニンは180～200アミノ酸残基から構成されるが，肺魚ではそれらと比較して少ない．アミノ酸配列を他種のアメロジェニンと比較すると，ヒトと44%，各種両生類と30～40%一致した．大腸菌を用いて発現させた組換えタンパクは，抗ブタアメロジェニン抗血清と反応することが確認された．また，ISHによるmRNAの発現解析から，エナメル質に接しているエナメル芽細胞に発現が認められた．以上の結果から，クローニングした遺伝子は肺魚のアメロジェニン遺伝子と同定した．さらに我々はもう一種の肉鰭類であるシーラカンスのアメロジェニン遺伝子のクローニングにも成功した．シーラカンスゲノムデータベースからアメロジェニンと推定される遺伝子配列を見出し，仔魚の顎部分のcDNAライブラリーをもとにクローニングを試みた．その結果，1,614塩基からなり，165アミノ酸残基をコードする遺伝子を得た．アミノ酸配列の比較において，ヒトと34%，有尾両生類と32%，肺魚と31%一致した．この遺伝子は最終第7エキソンに約1 kbの非翻訳領域をもつのが特徴である．これら二種類の肉鰭類のアメロジェニン遺伝子が同定されたことにより，これまで未知の領域であった魚の段階のアメロジェニン遺伝子の特徴が明らかになり，エナメル質の起源を探索する上で重要な発見になるものと思われる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Molecular biological analysis of amelogenin genes in sarcopterygii

○Mikami M

Dept Microbiol, The Nippon Dent Univ Sch Dent at Niigata

The amelogenin genes from mammals, reptiles and amphibians have been already cloned and sequenced. However, the genes in the several fish which expressed tooth enamel were not cloned. Recently, we have succeeded in cloning and sequencing the cDNA encoding the amelogenin in two kind of sarcopterygii, lungfish（*Lepidosiren)* and coelacanth（*Latimeria*）, from tooth germ cDNA libraries. This is the first report on the characterization of the amelogenin genes in fish. The amelogenin genes of lungfish and coelacanth encode 128 and 165 amino acid residues, respectively. The amelogenin proteins of sarcopterygii are thus smaller than those of amphibians and reptilians. This phenomenon is speculated to be a primitive characteristic in phylogenetically of this gene. In lungfish, *in situ* hybridization demonstrated the intense expression of the amelogenin mRNA in the cytoplasm of the epithelial cells surrounding a basal portion of the tooth plate, where was an additional portion of the newly enamel.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-4　条鰭魚類 ガーパイクの歯と鱗の上皮性蛋白の発見

○石山巳喜夫

日歯新潟　短大　歯科衛生

全骨類硬骨魚のガーパイクの歯と鱗にはエナメル質様の薄層が存在し，前者はカラーエナメル，後者はガノインとよばれている．両者は形態的類似性および免疫組織化学的解析により，哺乳類のエナメル質と相同の組織であるとみなされているが，これを証明する遺伝子レベルの研究は存在しない．今回，筆者と協力者はガーパイクの顎と皮膚の cDNA ライブラリーから RT-PCR により未知の遺伝子をクローニングしたので，その特徴を解析した．この遺伝子は本来 真骨類硬骨魚では SCPP5 という歯の遺伝子が存在する位置にあったものであるが，シークエンスの結果，それとはほとんど相同性のないことがわかった．この遺伝子の cDNA は 1478 bp から成り，232 アミノ残基をコードしている．ゲノム DNA 配列と並べてみると，本 cDNA は 14 のエクソンから構成され，第 2 エクソンに開始コドンがあり第 13 エクソンに停止コドンが存在する．アミノ酸の構成は 56％が疎水性残基で，中性残基が 31％であり，もっとも数の多いのがプロリン（P）で 21.4% を占め，ついでグルタミン（Q）が 16.7% である．この比率は アメロジェニンのアミノ酸組成に良く似ており，さらに停止コドンの直前には親水性のドメインがあり，アミノ酸配列が VEEQD で，両生類（無足類）のアメロジェニンと一致する．このように，この蛋白はアメロジェニンと良く似た特徴を示すものの，エクソン/イントロン構造がまったく異なることと，アミノ酸配列の相同性がきわめて低いことから，アメロジェニンではなく，その類似蛋白であると考えられる．ちなみに，ISH の解析により本蛋白の遺伝子はカラーエナメル，エナメロイドおよびガノイン層の形成細胞に発現しており，これらに共通の基質蛋白であることが推察される．おそらく，本蛋白がガーパイクにおいてはアメロジェニンに代わって高石灰化組織の主要蛋白になっているものと思われる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Cloning and sequencing of a SCPP5-like gene expressed in the tooth germ and scales of the gar（Holostei）

○Ishiyama M

Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata

We have cloned a gene from two different cDNA libraries, one made from the jaws and the other from the skin of the spotted gar, *Lepisosteus oculatus*. This gene corresponds in chromosomal location to the SCPP5 gene in teleosts and consisted of 1478 bp, encoding 232 amino acid residues. The major amino acids in this protein are proline（P）and glutamine（Q）, accounting for 21.4% and 16.7%, respectively. The ratio of P to Q in this protein is similar to that in amelogenin, the essential protein in the enamel matrix of mammals. Despite the similarity in amino acid composition, no significant amino acid sequence similarity was detected. Furthermore, the exon intron structure was considerably different from each other. A recent analysis suggested that the gar does not have the amelogenin gene. Therefore, I assume that the role of this protein during the development of the collar enamel and the ganoin layer in the gar may be similar to that in amelogenin during enamel formation in mammals.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-5　魚類の歯胚におけるエナメル蛋白遺伝子および *Dmp1* 遺伝子の発現解析

○中富　満城

九歯大　解剖

魚類の歯の硬組織は主にエナメロイドと象牙質から構成される．哺乳類のエナメル質とは異なり，エナメロイドは基底膜の歯乳頭側に形成される間葉主体の硬組織であると考えられている．また条鰭類に属するガーパイクの歯においては，尖頂部のキャップエナメロイドに加えて側壁部に上皮性のカラーエナメル質を有する事が知られている．しかしながら魚類のエナメロイド，カラーエナメル質および象牙質の形成過程における詳細な細胞機能や分子機構については未解明な点が多い．そこで我々はガーパイクの *AMELOBLASTIN*（*AMBN*），*ENAMELIN*（*ENAM*），*SCPP5* および *DMP1* 各遺伝子のクローニングを行い，歯胚における mRNA 発現パターンの解析を試みた．その結果，*AMBN*，*ENAM* および *SCPP5* はカラーエナメル質を形成するエナメル芽細胞で強い発現が認められた．ガーパイクのゲノムは *AMELOGENIN*（*AMEL*）遺伝子を欠く為，肉鰭類や哺乳類のエナメル質形成における *AMEL* の機能をガーパイクにおいては *SCPP5* が代償している可能性が示唆された．またエナメロイドに隣接する内エナメル上皮細胞もこれらの遺伝子を発現しており，エナメロイドの形成に関与する上皮性エナメル蛋白の由来が組織学的に実証された．興味深い事に体表の皮小歯の歯胚においてもこれらの遺伝子の発現が検出され，顎歯と皮小歯が共通の機構で形成される可能性が示唆された．一方 *Dmp1* の発現は象牙芽細胞に限局していた．エナメル上皮や象牙芽細胞におけるこれらの遺伝子の発現には時期特異性が認められた事から，硬組織の形成段階に応じた遺伝子発現調節機構が存在すると考えられる．なお一般的な硬骨魚類の鱗は間葉由来であるが，ガーパイクの体表は上皮由来のガノイン鱗で覆われる．本シンポジウムでは魚類の歯と鱗の形成過程における分子機構の相同性についても議論したい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The temporospatial expression patterns of enamel protein genes and *Dmp1* in garpike tooth buds

○Nakatomi M

Div Anat, Kyushu Dent Univ

Lepisoteus is unique in that epithelium-derived collar enamel covers the shaft of its teeth in addition to enameloid on the apex. In contrast, enamel does not exist in teleosts and their teeth are capped with enameloid only. To identify temporospatial expression patterns of enamel protein genes such as *AMELOBLASTIN*（*AMBN*）and *ENAMELIN*（*ENAM*）and an odontoblast marker *DMP1* in developing tooth germs of garpike, section *in situ* hybridization analysis was carried out. As a result, *AMBN* and *ENAM* transcripts were detected in both enamel forming ameloblasts and the inner enamel epithelium adjacent to enameloid, suggesting that these genes are involved in the formation of both collar enamel and enameloid. Notably, the expression of these genes were localized in developing dental cuticles as well, implying that the common or similar formation mechanism exists between jaw teeth and dental cuticles. On the other hand, *DMP1* expression was observed only in mesenchyme-derived odontoblasts. Our study revealed time- and region-specific expression patterns of *AMBN*, *ENAM* and *DMP1* in garpike tooth germs, which will be the basis of further functional analyses.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS2-6　ガーパイクの歯と鱗における SCPP5 蛋白の免疫組織化学

○笹川　一郎

日歯新潟　先端研

硬骨魚類条鰭類ガーパイクにおいて硬組織形成関連蛋白 SCPP5 が抽出されたので，この SCPP5 の器官・組織内分布を免疫組織化学により探索した．ガーパイク（成魚）の顎歯 collar enamel 形成期歯胚と ganoine 形成期ガノイン鱗（再生鱗と非再生鱗）を材料とし，固定後水溶性樹脂に包埋した．抗 SCPP5 抗体を用いた protein-A gold 法で免疫染色を行い，光顕と透過電顕で観察した．形成期の collar enamel 基質と基質形成期 ganoine 基質（preganoine）は共に強い陽性反応を示した．Preganoine 層内の表面に垂直な細線維構造上，D-E 境下の象牙質と鱗 ganoine 直下の骨質，さらに歯胚 ameloblasts と鱗の内ガノイン上皮細胞の顆粒構造にもそれぞれ陽性反応が認められた．一方，成熟期 collar enamel と ganoine では，これらの強い反応は消失した．この結果から，SCPP5 蛋白は歯の collar enamel 基質と鱗の ganoine 基質（preganoine）　の主要蛋白であるあることが示され，哺乳類エナメル質の amelogenin と似た機能を有している可能性が考えられる．さらに，同じ材料を哺乳類由来の amelogenin に対する抗体を用いた免疫組織化学で観察した先行研究では，ほぼ同様な陽性反応の分布を観察しているので，この抗 amelogenin 抗体に反応した蛋白は SCPP5 であることが示唆される．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Immunohistochemical analyses for SCPP5 protein on the jaw teeth and ganoid scales of gars, Lepisoteus oculatus, a bony fish

○Sasagawa I

Adv Res Center, Nippon Dent Univ at Niigata

In order to examine the localization of SCPP5 protein, I subjected gar tooth germs and ganoid scales to light and transmission electron microscopic immunohistochemistry using an antibody against gar SCPP5. The collar enamel matrix and ganoine matrix（preganoine）exhibited marked immunoreactivity to the anti-SCPP5 antibody. The immunolabeling was observed on the electron-dense fibrils, most of which were arranged perpendicular to the surface, in the preganoine organic matrix, and in the granules in the ameloblasts facing collar enamel and the inner ganoine epithelial cells. On the other hand, the mature collar enamel and ganone did not exhibit immunoreactivity to anti-SCPP5 antibody. These results suggest that both collar enamel matrix and preganoine contain SCPP5 protein as a major component, and the gar SCPP5 protein performs similar functions to the amelogenins found in higher vertebrates. In the previous studies, the same localization of the amelogernin-like protein has been detected by the immunohistochemistry using antibodies against mammalian amelogenins. It is likely that the amelogernin-like protein corresponds to SCPP5.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS3-1　ゴルジ体の構造維持における VAMP4 の役割

○設楽　彰子[1]，渋井　　徹[2]，岡山　三紀[3]，荒川　俊哉[4]，溝口　　到[3]，坂倉　康則[2]，田隈　泰信[4]

[1]米国立衛生研，[2]北医大　歯　解剖，[3]北医大　歯　矯正，[4]北医大　歯　生化

ほ乳類細胞のゴルジ体は核近傍においてリボン状構造を呈する．Vesicle-associated membrane protein 4（VAMP4）は真核細胞のトランスゴルジネットワーク（TGN）に主として発現する SNARE タンパク質であり，初期エンドソームから TGN への逆行性の輸送を制御することがよく知られているが，ゴルジ体における役割には不明な点が多い．そこで我々は RNA 干渉法（RNAi）を用いて HeLa 細胞における VAMP4 の遺伝子発現を抑制し，ゴルジ体の形態を観察したところ，リボン状のゴルジ体が断片化することが示された．断片化したゴルジ体は細胞質中に均一に分散するのではなく，本来のゴルジ体が局在する核近傍に集合していた．電子顕微鏡および免疫組織化学的手法によりゴルジ体の形態を詳細に観察したところ，断片化により短縮したゴルジ体は層板構造を維持していることが明らかになった．さらに VAMP4 ノックダウン細胞において，ゴルジ体のリボン状構造の維持に重要とされる微小管の構造は正常に保たれており，ゴルジ体から細胞膜方向への正方向の小胞輸送にも変化が見られないことが示された．VAMP4 と特異的に結合し SNARE 複合体を形成する syntaxin 6，syntaxin 16，Vti1a の遺伝子発現を RNAi により抑制したところ，断片化したゴルジ体が核近傍に集積することが観察された．以上の結果から（1）TGN と初期エンドソーム／細胞膜間における正方向と逆方向のバランスのとれた小胞輸送が，ゴルジ体のリボン構造維持に必要であること，（2）VAMP4 の発現抑制により，初期エンドソームから形成された小胞が TGN に融合する際の SNARE 複合体の形成が抑制されることによってゴルジ体の断片化が惹起されることが示唆された．小胞輸送の中心となって働くゴルジ体は，非常に動的な器官であり絶えず膜融合と分離をくり返している．ほ乳類細胞におけるゴルジ体のリボン状構造の形成・維持機構をおよびその生理的意義について今後更なる研究が必要であると考えられる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The role of VAMP4 to maintain the ribbon structure of the Golgi apparatus

○Shitara A[1]，Shibui T[2]，Okayama M[3]，Arakawa T[4]，Mizoguchi I[3]，Sakakura Y[2]，Takuma T[4]

[1]IMTS, OPCB, NIDCR, NIH，[2]Div Anat，[3]Div Orthodont，[4]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

The mammalian Golgi apparatus forms a twisted ribbon-like network in the juxtanuclear region. Vesicle-associated membrane protein 4（VAMP4）, a v-SNARE protein expressed exclusively in the trans-Golgi network（TGN）, plays a role in retrograde trafficking from the early endosome to the TGN, although its precise function within the Golgi apparatus remains unclear. To define the role of VAMP4 in maintaining the Golgi structure, we depleted VAMP4 using RNA interference technology. Depletion of VAMP4 from HeLa cells led to fragmentation of the Golgi ribbon. These fragments were not uniformly distributed throughout the cytoplasm, but remained in the juxtanuclear area. Electron microscopy and immunohistochemistry showed that in the absence of VAMP4, although the length of the Golgi stack was shortened, the stacking appeared normal. In VAMP4-depleted cells, microtubule integrity is maintained, and anterograde trafficking was not impaired. Depletion of the cognate SNARE partners of VAMP4, syntaxin 6, syntaxin 16, and Vti1a also induce Golgi fragmentation. These observations suggest that（1）a normal balance in membrane transport between the TGN and the EE/plasma membrane interface is required to maintain the Golgi ribbon, and（2）depletion of VAMP4 perturbs SNARE-mediated membrane fusion between EE-derived vesicles and the TGN, and may thereby induce Golgi fragmentation.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS3-2　耳下腺腺房細胞における分泌顆粒へのタンパク質選別輸送機構

○吉垣　純子，横山　　愛，加藤　　治

日大松戸歯　生理

タンパク質が細胞外へ分泌される経路には，調節性分泌経路と構成性分泌経路が存在する．調節性分泌は神経細胞や内分泌・外分泌細胞が持つメカニズムで，合成されたタンパク質を分泌顆粒に貯留し，特定の刺激を受けて初めて開口放出する．一方，構成性分泌は全ての細胞が持つ仕組みであり，小胞体で合成されたタンパク質を，貯留することなく直ちに小胞で分泌する．2 つの分泌経路を持つ細胞は，それぞれの経路で分泌されるタンパク質をどのように振り分けているのか？その選別はゴルジ装置で行われていると考えられているが，メカニズムについては不明な点が多い．

我々は，分泌タンパク質の選別輸送機構を解析するために，耳下腺腺房細胞の初代培養細胞にリポータータンパク質である HaloTg を発現する系を開発した．耳下腺に発現するタンパク質と HaloTag の融合遺伝子を細胞に導入し，細胞内局在と刺激依存的な分泌量を測定することによって，調節性分泌経路への輸送効率を解析した．その結果，唾液アミラーゼのシグナルペプチド配列のみを付加した HaloTag（SS25H）は，分泌顆粒へ輸送され刺激依存的に分泌量が増加した．このことから調節性分泌経路への輸送が示されたが，刺激非依存的な分泌量が内在性アミラーゼと比較して高く，一部は構成性分泌経路へも輸送されていると考えられた．そこで，唾液タンパク質の 1 つであるシスタチン D（Cst5）の全長遺伝子と融合させた HaloTag（Cst5H）を作成した．Cst5H は SS25H に比べ非刺激時の分泌が抑えられていた．また，Cst5H の細胞内局在はアミラーゼのシグナルとよく一致し，その共局在率およびシグナル強度の相関係数が高かった．したがって，シスタチン D はアミラーゼと協同して，より効率良く分泌顆粒へ輸送されることが予想された．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Selective transport of proteins into secretory granules of salivary acinar cells

○Fujita-Yoshigaki J，Yokoyama M，Katsumata-Kato O

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Secreoty proteins are exocytosed via two pathways: regulatory and consitutive secretory pathways. In the regulatory pathway, neuron, endocrineand exocrine cells store newly synthesized proteins in secretory granules and release them upon specific stimulation. In the constitutive pathway, proteins are immediately secreted by small vesicles. Secretory proteins may be separated into two pathways in the Golgi apparatus and the mechanism is unknown.

To study the sorting mechanism in salivary glands, we have been using HaloTag, a reporter protein that was constructed to bind fluorescent ligands. We found that HaloTag that has only a signal peptide sequence（SS25H）was sorted into secretory granules of parotid acinar cells and was released in response to stimulation. However, its basal secretion without stimulants was higher than that of amylase, suggesting that SS25H was also transported to constitutive pathway. When cystatin D, one of major saliva proteins, fused with HaloTag（Cst5H）was expressed in parotid acinar cells, the basal secretion was lower than that of SS25H. Moreover, the localization of Cst5H was overlapped with that of amylase better than SS25H. These results suggest that cystatin D may interact with amylase, which can promote sorting into secretory granules in parotid acinar cells.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS3-3　ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 による EGFR 細胞内輸送制御

○花房　　洋[1]，慶田城　迅[2]，松本　邦弘[1]

[1]名大　院理　生命理
[2]神戸大　院医　病態シグナル

上皮成長因子受容体（EGFR）シグナルは細胞の増殖や生存に重要なシグナルである．しかし，その過剰な活性化は，細胞の癌化を引き起こすことが知られている．このため，活性化した EGFR はすみやかにダウンレギュレーションされる．活性化した EGFR は，エンドサイトーシスによって細胞膜から取り込まれ，早期エンドソーム，後期エンドソームを経てリソソームに運ばれ分解される．この過程は EGFR シグナルのダウンレギュレーションに必須である．我々は最近，ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 が，EGFR の細胞内トラフィックを制御していることを明らかにした．LRRK1 は，Ras 様 GTPase ドメインや MAPKKK 様キナーゼドメインを持つ，分子量 240 kDa の巨大なタンパク質である．これまでの研究から，（1）LRRK1 が活性化した EGFR と複合体を形成し，EGFR の早期エンドソームから後期エンドソームへの移行に必要なこと，（2）LRRK1 が ESCRT-0 複合体と相互作用し，EGFR のエンドソーム内腔への陥入に必要なこと，を明らかにした．早期エンドソームに局在した EGFR は，微小管上を Dynein モーター蛋白質によって後期エンドソームへと運ばれる．LRRK1 はこの過程を，自身のキナーゼ活性依存的に制御していた．そこで LRRK1 の基質を探索したところ，微小管プラス端結合因子 CLIP-170 を同定した．質量分析を用いた解析から，LRRK1 は CLIP-170 の C 末 Zn knuckle ドメインに存在する，1384 番目のスレオニン残基をリン酸化することが明らかとなった．Zn knuckle ドメインは，CLIP-170 と Dynactin サブユニット p150 Glued との結合に重要であることが知られている．我々は，LRRK1 がこの部位をリン酸化することで，CLIP-170 と p150 Glued との結合を促進し，その結果，EGFR を含むエンドソームの微小管上の輸送を制御していることを明らかにした．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Regulation of EGFR intracellular trafficking by ROCO family kinase LRRK1

○Hanafusa H[1]，Kedashiro S[2]，Matsumoto K[1]

[1]Div Biol Sci, Grad Sch Sci, Nagoya Univ
[2]Div Path Sig, Dept Biochem Mol Biol Kobe Univ

Ligand-induced activation of the EGF receptor（EGFR）initiates trafficking events that relocalize the receptors from the cell surface to intracellular endocytic compartments. Early endosomes containing activated EGFR migrate along microtubules as they mature into late endosomes. We have recently shown that LRRK1, which contains a Ras-like GTPase domain and a MAPKKK-like kinase domain, regulates this EGFR transport in a manner dependent on its kinase activity. However, the downstream targets of LRRK1 that modulate this transport function have not been identified. Among LRRK1-interacting proteins, we identified CLIP-170, a microtubule plus-end protein, as a substrate of LRRK1. LRRK1 phosphorylates CLIP-170 at Thr-1384, located in its C-terminal zinc knuckle motif, and this promotes its association with dynactin-dynein complexes. We found that LRRK1 phosphorylation of CLIP-170 causes the accumulation of p150Glued, a subunit of dynactin, at microtubule plus-ends, thereby facilitating the migration of EGFR-containing endosomes.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS3-4 Lysosome-associated membrane protein 1/2 によるミトコンドリア細胞内輸送の制御

○横山　三紀

医科歯科大　院医歯　硬組織病態生化

Lysosome associated membrane protein 1/2（LAMPs）はリソソーム膜に豊富に存在する糖タンパク質である．発見当初 LAMPs は，リソソーム膜を裏打ちする糖衣を形成し，加水分解酵素からリソソーム膜を保護すると考えられていた．しかし LAMPs 欠損細胞においてもリソソームの構造は形態的にも機能的にも保持されており，一方，LAMPs が欠損するとオートファジーやファゴサイトーシスの過程が障害されることが明らかになった．LAMPs はリソソームとファゴソームの細胞内での位置を制御することにより両者を効果的に融合させることが示唆されている．
本研究では骨芽細胞における LAMPs の役割を明らかにする目的で，前骨芽細胞由来細胞株 MC3T3-E1 および骨細胞由来細胞株 MLO-Y4 細胞を用いて，siRNA による LAMPs 発現低下によるオルガネラの細胞内での位置決めへの影響を調べた．オルガネラの細胞内での位置は微小管に沿った輸送に依存し，プラス方向（核近傍の微小管形成中心に向かう方向）とマイナス方向（細胞膜に向かう方向）の輸送のバランスにより決定される．そこでオルガネラの核からの距離の分布を定量的に評価した．
MC3T3-E1 細胞において LAMP-1, LAMP-2，およびその両者の siRNA による発現低下はミトコンドリアの核近傍への集積を増加させた．LAMP-1 の発現低下の効果の方が LAMP-2 低下の効果よりも顕著であった．これに対して，MC3T3-E1 細胞の場合よりもミトコンドリアが核近傍に多く，かつ樹状突起部分にも存在する MLO-Y4 細胞では，LAMP-1, LAMP-2 の siRNA によるミトコンドリアの位置の変化はみられなかった．これらの結果から LAMPs は MC3T3-E1 細胞においてミトコンドリアの細胞内での位置決めに関与することが示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Lysosome-associated membrane proteins（LAMPs）regulate intracellular positioning of mitochondria

○Yokoyama M

Dept Biochem, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent

Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2（LAMPs）are highly glycosylated proteins that are abundant in lysosomal membranes. LAMPs were initially considered to act as a barrier to protect lysosomal membranes from the lytic luminal environment, by forming a glycocalyx. However, it was found that the structure and function of lysosomes are not appreciably affected even in the absence of LAMPs. On the other hand, the deficiency of LAMPs impairs the process of autophagy and phagocytosis. The deficiency of LAMPs in MEFs also affects the intracellular positioning of both phagosomes and lysosomes.
In the present study, we demonstrated that the siRNA-mediated downregulation of LAMP-1, LAMP-2 or their combination enhanced the perinuclear localization of mitochondria, in the pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1. On the other hand, in the osteocytic cell line MLO-Y4, in which both the lysosomes and mitochondria originally accumulate in the perinuclear region and mitochondria also fill dendrites, the effect of siRNA of LAMP-1 or LAMP-2 was barely observed. Our results suggest that LAMPs may regulate the positioning of mitochondria in MC3T3-E1 cells［Experimental Cell Research（2015）331:211-222］.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS3-5　骨系細胞におけるリソソームの新しい機能

○筑波　隆幸

長崎大　院医歯薬　歯科薬理

リソソームは約 60 種類の加水分解酵素を含有する細胞小器官である．リソソームは神経疾患，免疫，感染症，癌，細胞分化などと密接に関連することが知られている．本シンポジウムでは特に骨系細胞である破骨細胞と骨芽細胞におけるリソソームの機能について最近の我々の知見を中心に紹介したい．

破骨細胞はリソソーム関連オルガネラと呼ばれる“特殊なリソソーム”を形成して骨吸収を行っている．我々は破骨細胞分化過程において発現レベルが上昇する Rab27A 遺伝子を同定した．Rab27A が欠損した破骨細胞では，細胞の多核化と巨大化を示すことが分かった．この分子メカニズムとして M-CSF 受容体である c-fms や RANKL 受容体 RANK の輸送機構の異常により，受容体のシグナルが増強していることを見出した．一方 Rab27A が欠損するとリソソームタンパクの輸送異常により骨吸収能が有意に低下していた．このように Rab27A は破骨細胞において受容体やリソソームタンパク質の輸送に必要であることが示された．

一方，骨芽細胞分化とリソソーム機能との関連を調べたところ，骨芽細胞分化に伴いほとんどのリソソームタンパク質が増大していた．同時にリソソームタンパク質のマスター転写因子である TFEB の発現上昇を認めた．そこで TFEB の遺伝子ノックダウン実験を行ったところ，骨芽細胞分化は阻害され，分化過程においてアルカリホスファターゼやオステオカルシン等の分化マーカーの発現量は低下した．逆に TFEB の過剰発現実験を行うと，骨芽細胞分化は増強され，各種分化マーカーの発現量は増加した．さらに詳細に解析すると，TFEB ノックダウン実験により，骨芽細胞分化を制御する ATF4 と CHOP の 2 つの転写因子が TFEB の下流因子であることを明らかとなった．これらの結果から，骨芽細胞分化には様々なリソソーム形成因子やリソソーム機能が深く関していることが示された．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する

## New functions of lysosome biogenesis in bone cells

○Tsukuba T

Dept Dent Pharmacol, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ

Lysosomes are an organelle that contains more than 60 acid hydrolases. Lysosomes are closely associated with neuronal diseases, immunity, infection, cancer, and cell differentiation. In this symposium, I will talk about our recent findings concerning lysosome functions in osteoclasts and osteoblasts.

Osteoclasts resorb the bone matrix through forming specialized lysosomes termed as “Lysosome Related Organelle”. We identified Rab27A as up-regulated gene during osteoclast differentiation. Rab27A-deficient osteoclasts showed multinucleated and giant cells. In Rab27A-deficient osteoclasts, abnormal transport of receptors such as c-fms and RANK resulted in enhanced signaling, and aberrant transport of lysosome proteins caused reduced bone resorbing activity in osteoclasts.

When we investigated lysosome functions of osteoblast differentiation, we found that expression levels of various lysosome proteins were up-regulated. By gene knockdown method, depletion of TFEB, a master regulator of lysosomal biogenesis, markedly inhibited osteoblast differentiation. Conversely, overexpression of TFEB resulted in strikingly enhanced osteoblastogenesis. By analysis of down-stream effector molecules, TFEB knockdown was found to cause marked up-regulation of ATF4 and CHOP, both of which are essential factors for osteoblastogenesis. These results indicate that various lysosome regulating factors are involved in osteoblast differentiation.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS4-1　乳製品副産物による人工唾液の開発

○石川　康子[1]，Pieczonka Tomasz[1]，Bragiel Aneta[1]，薮内さつき[2]，竹内　祐子[2]，柳沢志津子[3]，福田　佳奈[4]，金　　智蓮[4]，金　　敦祚[4]，吉岡　昌美[3]

徳島大　院医歯薬　[1]分子薬理，[2]地域医療福祉，[3]口腔保健福祉，[4]アプロサイエンス社

乳製品の副産物であるホエーは，筋肉の蛋白質合成を促進することから，運動選手の筋力増強や高齢者のサルコペニア予防に使われている．私共は，ホエーから口腔機能の老性低下を阻止・修復する人工唾液を開発している．ホエーから人工唾液として用いるには余剰な成分を除去後，8週齢と80週齢雄ラットに1ケ月間飲用させたところ唾液腺の老性萎縮が修復された．舌下腺で最も顕著な修復を認めたので，舌下腺よりtotal RNAを抽出してマイクロアレイで解析した．シスタチンSの遺伝子Cyss，プローリン－リッチ蛋白質の遺伝子Prp2, Sgp158, Prp15, Prb1，グロブリンの遺伝子Obp3，アンドロゲン結合蛋白質の遺伝子Abpa, Abpz，カリクレインの遺伝子Klk1, GK11, Klks3等でホエーを飲用したラットにて，水飲用ラットより2倍以上の発現上昇を認めた．Venn図解析の結果から，人工唾液を飲用したすべての84週齢のラットの舌下腺で水飲用より1.5倍以上上昇し，中心的な役割を果たしている可能性がある遺伝子として，Transcriptional factor AP-2 beta（Tcfap2b）を見つけた．また，唾液と舌下腺のWestern-blotting解析において，人工唾液を飲用したラットで水飲用よりCystatin S, Lysozyme, Basic proline-rich protein等の濃度の上昇を認めた．そこで，人介在研究を行った．老人福祉施設に入居中の80～98歳の男女8名に人工唾液原料を1ケ月間飲用していただき，唾液量や唾液のプロテオーム解析を行った．飲用後の唾液量はすべての被験者で増加し，飲用前の唾液量が少ないほど増加率は大きく，飲用前の唾液量に対する増加率の相関係数は-0.90183であった．また，飲用後の唾液でシスタチンS，アンドロゲン調節蛋白質，$\alpha$-アミラーゼ等に有意な増加を認めた．このように，本人工唾液飲用後は，唾液の量･質ともに改善され，老化による口腔乾燥症に有効と思われる．また，本人工唾液はラットの肺組織の老性萎縮に対しても有効であることから高齢者の呼吸不全の緩解にも役立つことが期待でき，実用化へ向けて努力している．

【利益相反】利益相反はない．

## Development of artificial saliva using whey

○Ishikawa Y[1]，Pieczonka T[1]，Bragiel A[1]，Yabuuchi S[2]，Takeuchi Y[2]，Yanagisawa S[3]，Fukuta K[4]，Kim J[4]，Kim D[4]，Yoshioka M[3]

Dept [1]Med Pharm，[2]Community Med & Welfare，[3]Oral Health Sci & Soc Welfare, Tokushima Univ Grad Sch，[4]APRO Life Sci In. Inc.

Whey, a co-product of cheese manufacture, stimulates protein synthesis in post-exercise person and muscle protein accretion in elderly people. Using whey, we produce artificial saliva. Young（8-week-old）and elderly（80-week-old）male rats were given water or whey, which removed the surplus materials, ad libitum for 1 month. Whey restored the age-dependent atrophy in sublingual glands（SLG）. Total RNA isolated from SLG of whey group and water group was analyzed by DNA microarray（GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array, an affymetric system）. In elderly rats, cystatin S（Cyss）, proline-rich protein（Prp2, Sgp158, Prp15, Prb1）, globulin（Obp3）, and androgen binding protein（Abpa）were more than 2 times higher in SLG from whey group compared to that from water group. The analysis of Venn diagram suggests that transcriptional factor AP-2beta plays crucial role in SLG of whey group. In the analysis of Western blotting, the concentrations of cystatin S, basic proline-rich protein, lysozyme were also higher in saliva and SLG from whey group compared to water group. Elderly persons（80～98-year-old）also drunk original materials of whey. Whey improved quality and quantity of saliva from elderly persons. These results suggest that whey is valuable materials to develop artificial saliva.

***Conflict of Interest:*** There is no conflict of interest associated with this manuscript.

## SS4-2 唾液腺 BDNF 強制発現トランスジェニックマウスにおける神経生理学的変化とヒトの精神神経疾患の病態評価における唾液検査の応用

○東　雅啓[1]，猿田　樹理[1]，杉本　昌弘[1,2]，近藤　裕介[1,3]，斎藤　一郎[4]，槻木　恵一[1]

[1]神奈川歯科大　院　口腔科学，[2]慶應大　先端生命科学研，[3]東海大　医　病理診断，[4]鶴見大歯　病理

Brain-derived neurotrophic factor（BDNF）は中枢に多く存在し，神経の分化や機能制御に関与している．また末梢組織にも広く存在するが，局所における機能は未だに十分に解明されていない．以前に我々は，血中 BDNF が唾液腺由来であることを見出した．そこで，唾液腺産生 BDNF が血中へ移行することで全身にどのような影響を及ぼすか検討するため，BDNF 遺伝子を唾液腺に特異的に発現させたトランスジェニック（Tg）マウスを作製した．唾液腺特異的に発現する PSP をプロモーターとし，さらに生体に存在しない HA タグを付加したコンストラクトを設計した．これにより内因性 BDNF と区別でき，唾液腺産生物質の機能解析に貢献する実験系である．我々はこの系を用いて唾液腺産生 BDNF が中枢へ移行しているかを確認し，それによる神経生理学的変化を検討した．導入遺伝子は耳下腺に特に強い発現が認められた．また，Tg マウスでは Wt と比較し血中の BDNF 濃度が有意に高く，唾液中への移行も確認できた．さらに海馬における BDNF およびその受容体 TrkB の発現量は Tg マウスで有意に高く，GABA 産生酵素である GAD1 の発現も有意に高かった．その結果より代謝レベルで検討したところ，Tg マウスの海馬において GABA の産生が亢進していた．また行動解析では，open field test における center 侵入回数・滞在時間が，高架式十字迷路においては open arm 侵入回数が Tg マウスで有意に高かった．以上の結果より，唾液腺産生 BDNF が中枢へ移行することで抗不安効果を発揮することが示唆された．また現在，慶應義塾大学精神・神経科学教室との共同研究で，精神神経疾患患者の唾液中に含まれる BDNF 量と病態との関連性を検討しているので紹介する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The neurophysiological changes in forced expression of salivary gland-derived BDNF transgenic mice and the application of saliva test in evaluation of human psychiatric disorder

○To M[1]，Saruta J[1]，Sugimoto M[1,2]，Kondo Y[1,3]，Saito I[4]，Tsukinoki K[1]

[1]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent，[2]Inst Adv Biosci, Keio Univ，[3]Dept Pathol, Tokai Univ Sch Med，[4]Dept Pathol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Brain-derived neurotrophic factor（BDNF）abound in central nervous system, and this factor involves in differentiation and functional regulation of neural tissue. Although this factor exists widely in peripheral tissue, the functional significance remains to be elucidated. To determine whether salivary BDNF has effect on whole body, we developed transgenic（Tg）mice with HA tag-BDNF gene which was regulated by the mouse parotid specific-protein（PSP）promotor. We investigated using the Tg mice characterized by the transition of salivary BDNF to brain whether there are the neurophysiological change in Tg. HA-BDNF protein was detected in saliva of Tg. Moreover, BDNF, TrkB as a BDNF receptor, and glutamic acid decarboxylase 1 which produce GABA from glutamate were statistically higher Tg mice than Wt in the hippocampus. Metabolomic profiles in hippocampus of Tg showed facilitation of GABA release. In the open field test, the total number of entries into the center of an open field was significant difference between groups. Furthermore, in the elevated-plus maze, Tg showed significantly increased the number of entries into the open arms. In conclusion, we suggest that salivary glands-produced BDNF has antianxiety effect by being transfer into central nervous system.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS4-3　ヒト唾液ペプチドの研究：ペプチドミクスから機能解析へ

○斎藤　英一[1]，金子　陽徳[2]，幡本　晃太[2]，瀬賀　拓哉[1]，加藤　哲男[3]，谷口　正之[2]

[1]新潟工大　院工
[2]新潟大　院自然
[3]東歯大　化

【目的】ペプチドミクス解析によりヒト唾液には多様な短鎖ペプチドが含まれていることが示されているが，「唾液短鎖ペプチドの役割と働き」ならびに「唾液ペプチドームと病態の関係」に関する知見は限られているのが現況である．既に，我々はいくつかの唾液短鎖ペプチドに抗菌活性が保存されていることを明らかにしたが，本研究では唾液短鎖ペプチドの動物細胞に対する生理活性（免疫賦活・抗炎症活性，血管新生促進活性，創傷治癒促進活性）を検討したので報告する．
【方法】Histatin 3 の断片［Histatin 5（DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY）と Histatin 9（RKFHEKHHSHRGYR）］を化学合成した．大腸菌（*E. coli* O55: B5）のエンドトキシン（LPS）で刺激したラットマクロファージ（RAW264）の 24 時間培養後における一酸化窒素（NO）産生量を指標にして，合成ペプチドの免疫賦活・抗炎症活性を注意深く再検討した．マトリゲル試験法によりヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の管腔形成を追跡しながら Histatin 9 の血管新生促進活性を分析した．マウス胎児皮膚線維芽細胞（NIH3T3）を用いて，スクラッチ試験により Histatin 9 の創傷治癒促進活性を評価した．
【結果と考察】Histatin 5 と 9（100-2000 μM）は *E.coli* O55:B5-LPS で刺激した RAW264 の NO 産生を濃度依存的に亢進させた．この現象は Histatin 断片が細胞内の誘導型 NO 合成酵素の発現を高めたことで惹起されたと思われる．マトリゲル試験法により，Histatin 9（10 μM）が HUVEC の管腔形成レベルを 1.23 倍に増強させることが判明した．また，スクラッチ試験の成績は Histatin 9（0.1 μM）が 72 時間後に創傷幅を 42.6% に低減させることを明確に示した．これらの生理活性は Histatin 1 や Histatin 3 などの親タンパク質でも報告されているが，我々の実験データは親タンパク質のプロテオリシス断片の中にも当該の生理活性が保存されていることを示す．以上の知見を総括すると，ヒト唾液は創薬医療や口腔保健の分野において有望で利用価値が高い複数の短鎖ペプチドを含んでいると結論される．
【利益相反】利益相反はありません．

## A study of human salivary peptides: From peptidomics to physiological analysis

○Saitoh E[1]，Kaneko A[2]，Hatamoto K[2]，Sega T[1]，Kato T[3]，Taniguchi M[2]

[1]Grad Sch Technol, Niigata Inst Technol
[2]Grad Sch Sci & Technol, Niigata Univ
[3]Dept Chem, Tokyo Dent Coll

A large number of nascent peptide fragments resulted from proteolysis of parent salivary proteins have been identified by peptidomics analysis, although the information on their physiological significance is limited. To elucidate the biological activity of the proteolytic fragments of histatin 3 in human saliva, the effect of synthetic histatins（5 and 9）on nitric oxide（NO）production in *E. coli* O55: B5-lipopolysaccharide-stimulated RAW264 rat macrophage cells was examined. The histatins augmented the NO production. This augmentation is suspected to be due to enhanced expression of an inducible type of NO synthase. Subsequently, an angiogenesis assay and an *in vitro* scratch test were introduced to elucidate further biological potentials of histatin 9. It was shown that histatin 9 promotes the tube formation of human umbilical vein endothelial cells and enhances a wound healing potential on NIH 3T3 mouse embryonic fibroblast cells. The findings indicate that the biological activities of parent histatin 3 are conserved in the sequence of histatin 9. Taken together, it can be concluded that human saliva contains small peptides capable of being utilize in the field of oral health and drug discovery.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS4-4 マウス顎下腺灌流法による上皮膜輸送機能解析　膜タンパクと水分泌との関係について

○中本　哲自[1]，近藤　祐介[2]，向坊　太郎[2]，城所　愛美[2]，今村　　敦[2]，宗政　　翔[2]，
正木　千尋[2]，細川　隆司[2]

[1]松本歯大　歯科補綴，[2]九歯大　口腔再建リハビリ

顎下腺灌流法は上皮膜輸送研究において確立された解析方法であるが，遺伝子改変動物へ適用するため，約 10 年前からマウスにも応用された．われわれはこれまでに K チャネル（IK channel, BK channel），チャネル内在型の ATP receptor（P2X7），水チャネル（AQP5），腺房細胞基底膜の陰イオン輸送担体（NKCC1），腺房細胞の pH 調節因子である交換輸送担体（NHE1～4），ムスカリンレセプター（M3）を解析した．K チャネルは腺房細胞での陰イオン輸送を維持するために不可欠と考えられていたが，コンダクタンスの異なるチャネルが相補的役割を担っていた．また，プリン受容体のうち P2X7 レセプターはムスカリン刺激時の唾液分泌を抑制した．AQP5 は水チャネルの中でも唾液分泌に中心的な役割を果たしているとされているが，*Aqp5*$^{-/-}$の解析結果でもこれを追認できた．加えて *Aqp5*$^{-/-}$より回収された微量な分泌中のイオン濃度は著しい $K^+$上昇を観察した．NKCC1 の解析では，腺房細胞での陰イオン輸送の約 70％がこれによって行なわれ，残りが重炭酸イオン関与の系が担っていた．加えて NKCC1 は低浸透圧環境下において活性化しており水分調節に関与していることが示唆された．NHE1～4 の解析では *Nhe1*$^{-/-}$のみ分泌抑制傾向を示したが他は分泌に影響していなかった．*M3*$^{-/-}$は *in vivo* での pilocarpine 刺激では分泌抑制であったのに対し，灌流実験における carbachol 刺激ではほぼ完全に分泌抑制していた．一部の膜タンパクはノックアウトにより致死的であるため解析されていないが，今後，組織特異的なノックアウトの普及に伴い，より解明が進むと期待される．

【利益相反】演題発表に関連し，開示すべき COI 関係にある企業等はありません．

## Analysis of epithelial transport by the ex vivo mouse submandibular gland perfusion technique in genetically modified mice ～ the relationship between membrane proteins and water secretion ～

○Nakamoto T[1]，Kondo Y[2]，Mukaibo T[2]，Kidokoro M[2]，Imamura A[2]，Munemasa T[2]，
Masaki C[2]，Hosokawa R[2]

[1]Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ，[2]Dept Oral Reconstruct and Rehabil, Kyushu Dent Univ

The ex vivo perfused submandibular gland is a well-established method to analyze salivary gland fluid secretion, and this technique has also been applied to gene disrupted mice. We analyzed knockouts over the last decade to assess the functions of K channels（IK and Maxi-K）, ATP receptor（P2X7）, water channel（AQP5）, $Na^+$-$K^+$-$2Cl^-$ cotransporter（NKCC1）, $Na^+/H^+$ exchangers（NHE1～4）and muscarinic receptor（M3）. The Maxi-K channel is important for $K^+$ release in saliva, while the IK and Maxi-K K channels work together to establish a negative membrane potential in salivary acinar cells. Purinergic stimulation induced salivation was reduced in *P2X7*$^{-/-}$ mice. In addition, purinergic activation during muscarinic salivation reduced secretion. AQP5 is the most important water channel in saliva secretion, *Aqp5*$^{-/-}$ seemed to enhance ion transport, which resulted in high osmotic saliva. NKCC1 was critical for keeping a high［$Cl^-$］in acinar cells, i.e. almost 70 % of salivation was decreased in *Nkcc1*$^{-/-}$ and control glands perfused with bumetanide, a potent NKCC1 inhibitor. NKCC1 is also activated by perfusion with hypotonic solutions. NHE analysis revealed that only *Nhe1*$^{-/-}$ mice had marginally reduced salivation. Analysis of *M3*$^{-/-}$ mice previously detected only a slight reduction in salivation in vivo, however ex vivo perfusion studies showed a critical reduction in carbachol-induced salivation. Studies of gene disruptions in mice have provided critical information, however in some cases systemic knockouts cannot survive. In these cases, conditional knockouts will lead to a better understanding of the fluid secretion mechanism.

***Conflict of Interest:*** Authors declare there is no conflict of interest.

## SS4-5　ラット 3 大唾液腺における副交感神経性血流増加反応の相違

○佐藤　寿哉，石井　久淑

北医療大　歯　生理

唾液の水や電解質は血管内の血漿に由来するため唾液腺における血流増加反応は唾液分泌に重要であると考えられる．唾液腺の血流増加は三叉神経の求心性入力により副交感神経を介して反射性に生じることから唾液分泌量に大きな影響を及ぼすと考えられる．大唾液腺の相対分泌比は異なることが知られているが，これらの唾液分泌様式と副交感神経を介した血流調節との関係は不明である．そこで我々はウレタン麻酔し人工呼吸下で管理したラットの舌神経を求心性に電気刺激（1-30 V, 1-30 Hz, 20 s）することにより誘発させた 3 大唾液腺の血流増加反応をレーザースペックルイメージング血流計にて同時に測定した．なお，交感神経と迷走神経による影響を排除するために両神経とも頸部にて切断した．舌神経刺激は 3 大唾液腺に刺激強度と頻度に依存した急峻な血流増加反応を誘発したが，耳下腺と舌下腺と比較して顎下腺では有意に高い血流増加反応を認めた．この血流増加反応はヘキサメソニウム（自律神経節遮断薬）の静脈内投与により有意に抑制された．アトロピンの静脈内投与により耳下腺および顎下腺の血流増加はほぼ完全に抑制されたが，舌下腺の血流増加は約 60％に抑制され，アトロピンの感受性に有意な差が認められた．したがって，3 大唾液腺で生じる副交感神経性血流増加反応は 1）感覚入力により反応性が異なる，2)コリン作動性と非コリン作動性血管拡張線維の構成比が異なることが示唆された．これらの違いが各唾液腺の相対分泌比の違いと密接に関係していると考えられる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Differences in regulation of parasympathetic vasodilation in the major salivary glands in the rat

○ Sato T，Ishii H

Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Blood flow increase in salivary glands plays an important role in salivary secretion, because salivary fluid is created from blood plasma. Electrical stimulation of trigeminal nerves causes parasympathetic blood flow increase in rat salivary glands. Although there are differences in secretory ratio in major salivary glands, the relationship between salivary secretion and control of hemodynamics via parasympathetic nerves is unclear. In the present study, we examined blood flow in the major salivary glands during electrical stimulation of the central cut end of the lingual nerve（LN）in the urethane-anesthetized rats using a laser speckle imaging flow meter. The LN stimulation elicited intensity- and frequency-dependent blood flow increases. The increase was significantly high in submandibular gland in stimulation at high intensity or frequency. The administration of autonomic cholinergic ganglion brocker hexamethonium significantly inhibited increases. The administration of atropine completely inhibited increases in parotid and submandibular gland, and partly inhibited the increase in sublingual gland. Thus, our results suggest that 1）the magnitude of increase in three glands depends on sensory input, and 2）the increases are evoked by cholinergic and non-cholinergic fibers. These results seem likely to involve differences in salivary secretion in the three glands.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS4-6　内因性 peroxidase 活性による諸種哺乳動物の唾液腺腺房細胞の性状

○盛口　敬一[1]，内海　倫也[1]，城ケ原貴通[2]，小田　銑一[2]，本田　雅規[1]

[1]愛院大　歯　口腔解剖
[2]岡山理大　理　動物

3-3`diaminobenzidine tetrazolium（DAB）は免疫組織でよく知られている．新しい方法ではないが内因性 peroxidase（EPO）活性を検出することができる．唾液腺の EPO 活性を検出することにより，細胞の消長を調査するときに非常によい標識となる．我々はラットの耳下腺，顎下腺，舌下腺でそれぞれ生後，漿粘液細胞の存在が認められ，異なる分化を示すことを明らかにしている．また成獣ハムスター顎下腺では導管部の顆粒管に EPO の活性が観察されるが，終末部には存在しないとされていた．しかし弱いながらも観察されることを，固定液の濃度の改良により証明した．さらに，EPO 活性を行った成獣ハムスター顎下腺の中の一例に認めた粘液様組織について共焦点レーザー顕微鏡による検討を加えた結果，舌下腺組織の顎下腺への迷入であることを突き止めた．また食虫目の成獣スンクスの顎下腺では顆粒管部のミエリン様小体に強く EPO 活性が認められるが，遠位とは異なり近位腺細胞に EPO の活性が存在し，一般的な漿液細胞の半月の形成とは異なることが判明した．また最近では動物園から供給されたサイの耳下腺について，分泌顆粒の EPO 活性検出を通常切片で行い，EPO 活性に伴う DAB 反応産物構成元素の内，窒素（N）元素に着目し，分析電顕（JEM 1400 Plus）によるエネルギー分散型 X 線分光法（EDS）マッピング観察により，二相性の分泌顆粒の芯状部分に N が限局して存在することが明らかとなり，漿粘液細胞である可能性が示唆された．以上の結果から，古典的とも思われる DAB 法ではあるが，簡便な方法であり分析電顕と組み合わせて使うことにより，さらなる研究の発展が期待できると思われる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Endogenous peroxidase activities in the properties of variable mammalian salivary glands

○Moriguchi K[1]，Utsumi M[1]，Jogahara T[2]，Oda S[2]，Honda M[1]

[1]Dept Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ, Sch Dent
[2]Dept Zool, Okayama Univ, Fac Sci

Using 3-3`diaminobenzidine tetrazolium（DAB）is probably the important of the classical histochemical method. We detected endogenous peroxidase activity（EPO）in the properties of variable mammalian salivary glands. In the salivary glands of postnatal rats, the seromucous acinar cells were found in the parotid and sublingual glands. These seromucous cells later differentiated into different cell types: serous and mucous cells. As the submandibular gland developed, serous cells differentiated into the seromucous cells. Next, we found EPO in the acinar cells as well as the granular duct cells（GDC）in the adult hamster submandibular gland by the low concentrated fixation method. Other investigators, however, have reported that EPO localized only in the GDC of this gland. On the other hand, the acinus of the adult *Suncus murinus* submandibular gland consisted of distal and proximal cells. Heavy reaction products were seen in the myelin-like bodies of GDC. A weaker EPO also showed secretory granules of proximal cells. Recently, the resin ultra-thin sections of an adult rhinoceros parotid gland were then incubated in a DAB reaction medium and observed under analytical electron microscopy with energy dispersive x-ray spectroscopy（EDS）. We demonstrated EPO in the electron-dense core of the granules, which were not fairly homogeneous.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS4-7　アミラーゼ分泌と $Ca^{2+}$：第 1 回談話会から引きずる未解決の課題

○東城　庸介

北医療大　歯　教育支援

第 1 回唾液腺談話会が札幌で開催されてから今回で 29 年目を迎えます．第 1 回談話会の計画に係わった一人として，この会がこのように長く続いたことを大変うれしく思うと同時に，唾液腺が歯科基礎医学における重要な研究対象であることを改めて認識させられる次第です．今回の世話人である今井先生から，「唾液腺談話会」設立の経緯を含めて話してほしいという依頼を受けましたので，30 年前に共に談話会の計画・運営に係わった倉橋昌司（口腔生理），田隈泰信（口腔生化）の両先生にも助けていただきながら，曖昧になった記憶を呼び覚ますことにしました．最先端で活躍している現役の皆さんにはカビが生えたような退屈な思い出話かと思いますが，この会の意義を再確認する良い機会になれば幸いです．また，当時，私にとっての一番の関心事は，“$Ca^{2+}$はアミラーゼ開口分泌における最終のメディエーターか？”という疑問でした．この問題については多くの研究が費やされてきたにもかかわらず，未だ完璧な答えは見つかっていないと思います．私の中で未だ解決できないこの疑問について，当時の研究を紹介しながらお話しさせていただきます．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言いたします．

## Amylase exocytosis and $Ca^{2+}$, which is the unsolved problem continuing from the 1st Daekisen Danwakai

○Tojyo Y

Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

The Daekisen Danwakai was started in Sapporo in 1987 with the aim of contributing to the development of research activities for salivary glands in the Japanese Association for Oral Biology. I believe that it has provided good opportunity to exchange new and useful information among active members. In this symposium, I will talk of details to the start of the 1st Danwakai. In addition, I will discuss the involvement of $Ca^{2+}$ in amylase exocytosis, because it was the most interesting subject for me at that time.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS5-1　中枢神経系における共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM を用いた 3D-CLEM

○薗村　貴弘

金沢医大　医　解剖二

SBF-SEM 法は，走査電子顕微鏡のカラムに内蔵したウルトラミクロトームで自動的に薄切を行い，試料表面を薄切に続いて順次 SEM で撮像する事ができる．SBF-SEM で得られる像の白黒反転画像は，従来の TEM 像と酷似しており，この SBF-SEM を用いることにより，これまで共焦点レーザー顕微鏡で撮影していたメゾスケールの連続画像を，TEM-like 像として容易に得ることができる様になった．さらに集束イオンビーム（FIB）で試料を薄切する FIB-SEM を用いれば，Z 軸方向のさらに高い解像度を得られるようになり，また硬組織や金属などの硬い資料でも同様の三次元連続画像を得る事ができる．

また，近年では，それらの TEM-like 像と事前に撮影された蛍光顕微鏡像との相関顕微鏡（CLEM）が盛んに行われている．我々は，免疫組織化学法を用いた標本で，FIB-SEM と共焦点レーザー顕微鏡を相関させるべく，ラット脳の神経細胞の樹状突起と軸索終末を蛍光抗体で免疫標識し，軸索終末が樹状突起に近接していることを共焦点レーザー顕微鏡像で検出したのち，免疫電顕用に試料作成して FIB-SEM で撮影し，両者を相関させることに成功した．

今回はこのように従来の免疫組織化学法で FIB-SEM と共焦点レーザー顕微鏡による 3D-CLEM によって観察されたシナプス像の一例と，このような TEM-like 像を得られる 3D-SEM の今後の展望をご紹介する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## 3D-CLEM by combining confocal laser-scanning microscope with FIB-SEM in the central nervous system

○Sonomura T

Anat II, Kanazawa Med Univ

In the serial block-face scanning electron microscopy（SBF-SEM）method, samples were automatically sectioned with an ultramicrotome placed inside a scanning electron microscope column, and the block surfaces were imaged one after another by SEM to capture back-scattered electrons. The contrast-inverted images obtained by the SBF-SEM were very similar to those acquired using conventional TEM. SFB-SEM has made easy to acquire image stacks of TEM in the mesoscale, which is taken with the confocal laser-scanning microcopy（CF-LSM）. Furthermore, Focused ion beam-incorporated SEM（FIB-SEM）has enabled the acquisition of three-dimensional images with a higher z-axis resolution compared to ultramicrotome-equipped SEM.

We tried immunocytochemistry for FIB-SEM and correlated this immunoreactivity with that in CF-LSM. Dendrites and terminals of neurons in the rat brain were immunolabeled with fluorescence antibody. After detection of the sites of terminals apposed to the dendrites by using CF-LSM, immunoreactivities were further developed for EM, respectively.

We showed that conventional immuno-cytochemical staining for TEM was applicable to FIB-SEM. Furthermore, several synaptic contacts, which were thought to exist on the basis of CF-LSM findings, were confirmed with FIB-SEM, revealing the usefulness of the combined method of CF-LSM and FIB-SEM.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS5-2　力学的負荷に対する歯根膜組織変化の 3 次元超微形態解析

○平嶋　伸悟[1,2]，太田　啓介[1]，金澤知之進[1]，都合亜記暢[1,3]，楠川　仁悟[2]，中村桂一郎[1]

[1]久留米大 医 顕微解剖，[2]久留米大 医 歯口セ，[3]久留米大 医 電顕

歯根膜組織は，矯正力等の力学的負荷に応答し改変が起こる．この組織は歯周組織恒常性維持の中心的役割をしていると考えられており，周囲組織のリモデリングに関わることが示唆されている．力学的負荷による dynamic な変化は光学顕微鏡レベルで解析されているものの，細胞レベル・線維レベルでどの様に改築されていくのかの詳細は明らかではない．歯根膜組織の構造/生理機能の理解を更に深めるには，細胞の空間的な構造変化と歯根膜線維改築の関係性を詳細かつ同時に観察する事が重要である．しかし組織内の線維の走行を細胞突起の広がりと共に 3 次元的に観察することは従来極めて困難であった．

近年，走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた連続断面観察法によって，検体組織を電子顕微鏡レベルの高い空間分解能で 3 次元的に解析する手法が開発された．その手法の 1 つに FIB/SEM tomography がある．本手法は収束イオンビーム（FIB ; Focused Ion Beam）搭載型 SEM を用い，FIB による試料表面の平滑切削と SEM による試料表面の組成画像取得という操作を自動で交互に繰り返す事で組織の詳細な三次元構造を得る事ができるものである．

今回我々は，力学的負荷による歯根膜の構造変化を明らかにすべく，光学顕微鏡および，FIB/SEM を用いた電子顕微鏡レベルでの三次元構造の観察を行った．

FIB/SEM 用の試料は，咬合圧を除去したマウスと対照群マウスより歯根膜を含む下顎骨標本を取得し，固定後重金属染色を行い樹脂に包埋した．80 μm 角の歯根膜領域は FIB/SEM を用いて 100 nm の空間分解能で再構築し，得られたデータから歯根膜線維と細胞の詳細な形態を 3 次元的に抽出し，両者の関係性とその特徴について解析を行った．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Three dimensional ultrastructure analysis for the influence of mechanical stress in periodontal ligament

○Hirashima S[1,2]，Ohta K[1]，Kanazawa T[1]，Togo A[1,3]，Kusukawa J[2]，Nakamura K[1]

[1]Dept Anat, Kurume Univ Sch Med，[2]Dent & Oral Med Center, Kurume Univ Sch Med，[3]EM Lab, Cent Res Unit, Kurume Univ Sch Med

Structure of periodontal ligament is known to change their organization by loading of mechanical stress. The process is suggested to be responsible for remodeling of periodontal tissue. During the loading of mechanical stress to the tooth, it is observed that the drastical re-organization of collagen bundles in the periodontal ligament. Their re-organization is considered to conduct by fibroblast-like cells. These cells extend their fine cellular processes between the collagen bundles that can be observed by TEM, but their 3D organization and the relationship to the collagen bundles are quite difficult to visualize using conventional methods.

As FIB/SEM tomography is a recent SEM based 3D-reconstruction method, each image data has sufficient resolution to trace cellular membrane. Therefore, the reconstruction data obtained using this method is able to extract the complete 3D architecture of the cells and the collagen bundles in the remodeling periodontal ligament with electron microscopic resolution.

Specimens were obtained on mice normal mandibles and occlusion hypofunction mandibles 1, 2, 4 weeks after the operation remove occlusal force by milling off the maxillary tooth. After the reconstruction, we evaluated the 3D characteristics of periodontal ligament cells and the relationships between cells and collagen bundles during remodeling of it.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS5-3　直交配置型 FIB-SEM を用いた骨組織の三次元的解析

○橋本　真奈[1]，長岡　紀幸[2]，原　　徹[3]，上岡　　寛[1]

[1]岡山大　院医歯薬　歯科矯正
[2]岡山大　院医歯薬　共同利用施設
[3]物質・材料研究機構

骨はモデリングによりその大きさを増し，リモデリングにより外界の刺激に応じてその形を絶えず変化させている．骨組織形成の初期段階で観察されるモデリングは，骨芽細胞が骨基質であるコラーゲンを産生し，そのコラーゲンネットワークを温床として石灰化が起こり，硬い骨組織が形成される過程を踏む．この過程を観察するためには，骨の形成を担う骨芽細胞と，それらが構成した骨微細構造を同時に 3 次元的に捉えることが必要であると考える．しかし，細胞はマイクロ単位の大きさであるのに対して，骨微細構造を形成するコラーゲン線維はナノ単位であることから，従来の方法では観察範囲と解像度の間でトレードオフの問題が生じる．そこで，今回我々は直交配置型 FIB-SEM を用いて 16 日齢ニワトリ胚頭蓋骨を試料とし，1 辺 25 $\mu$m の立方体領域を 25 nm 毎に約 1000 枚の連続撮影を行い，三次元再構築を試みた．直交配置型 FIB-SEM は FIB 装置と SEM 装置が直交し配置されていることで，観察方向や部位がやや制限されるが，高い分解能とコントラストをもった SEM 像を得ることができる．今回，骨芽細胞からコラーゲン細線維を排出する過程が観察し，さらに，石灰化物がコラーゲン線維束で石灰化領域を拡大していく様子や骨組織内部の骨細胞を高詳細に観察することができた．さらに，今回得られた像から，三次元構築ソフト Amira と ZIB actin Filament を用いてコラーゲン線維を抽出し，コラーゲン線維の走行本数や走行角度が解析できた．この形態計測を行うことにより，骨モデリングの初期の過程におけるコラーゲン線維の三次元的構築を詳細に検討できるものと考える．

【利益相反】利益相反がないことを宣言する．

## Three-dimensional analysis of the bone using the orthogonal arranged FIB-SEM

○Hashimoto M[1]，Nagaoka N[2]，Hara T[3]，Kamioka H[1]

[1]Dept. Orthodont Okayama Univ Grad Sch Med Dent
[2]Lab Electron Microscopy, Okayama Univ Grad Sch Med Dent
[3]NIMS

Bone increases its size by modeling and is constantly changing its shape in response to outside stimuli by remodeling. In the modeling, osteoblasts produce collagen and sequentially calcification occurs on the basis of the collagen network. To observe this process, it is necessary to observe bone cells as well as the bone microstructure in three-dimensionally. However, a trade-off problem occurs between the observation range and resolution. Therefore, we used newly-developed orthogonal arranged FIB-SEM for observation of embryonic chick calvaria in the size of 25 $\mu$m cubic region with 25 nm-resolution. Although the viewing direction and the site are somewhat limited with the FIB-SEM, it is possible to obtain high resolution and high contrast SEM images. In this study, we observed collagen production by osteoblasts and calcification in the region of collagen bundles. In addition, we could analyze the number and the direction of collagen fibers by extracting the collagen fibers using three-dimensional construction software Amira and ZIB Action Filament. By this method, it becomes possible to study the morphological analysis of collagen fibrils in the early process of bone modeling.

***Conflict of Interest:*** There is no conflict of interest.

## SS5-4　骨細胞ネットワーク：FIB-SEM による微細構造解析

○長谷川智香

北大　院歯　硬組織発生

骨組織において，骨基質に埋め込まれた骨細胞は，細胞突起を介して周囲の骨細胞や骨表面の骨芽細胞と連結している．これら骨細胞・骨細管系と呼ばれる骨細胞ネットワークは，同じ骨組織内でも存在する領域により，その走行が異なっている．骨細胞ネットワークは，力学的負荷の感知や骨基質ミネラルの維持，物質移動などに寄与すると考えられており，我々はその微細構造の解明を目指してきた．これまで，生物試料の微細構造解析には，主に走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡が用いられてきたが，近年，3 次元微細構造の観察を可能とする様々な観察器機の生物試料への応用が進んでいる．中でも，収束イオンビーム/走査型電子顕微鏡（FIB-SEM）は，透過型電子顕微鏡レベルの高い解像度で，試料の 3 次元微細構造を観察することが可能である．そこで，我々は，マウス骨組織における骨芽細胞を含めた骨細胞ネットワークの微細構造を，透過型電子顕微鏡（TEM），走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた maceration 法，収束イオンビーム/走査型電子顕微鏡（FIB-SEM）などの各種顕微解析器機を用いて 2 次元および 3 次元的に解析した．本シンポジウムでは，これらの所見について報告するとともに，今後の装置応用に関する展望を述べたい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Ultrastructural assessment of the osteocytic networks by using FIB-SEM

○Hasegawa T

Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Osteocytes embedded in the bone matrix communicate not only neighboring osteocytes but also osteoblasts or bone-lining cells through their cytoplasmic processes. We have reported that the osteocytic network, *i.e.,* osteocytic lacunar-canalicular system（OLCS）shows the different geometrical regularity in each region of long bone, enabling the molecular transports, the sensing of mechanical stimuli and the maintaining for bone mineral homeostasis. Many researchers have employed scanning electron microscope（SEM）and transmission electron microscope（TEM）for visualizing two-dimensional（2D）ultrastructures of OLCS. However, focused ion beam-scanning electron microscope（FIB-SEM）, a new technique in the field of life sciences, can display the ultrastructural three-dimensional（3D）reconstruction of the objects with the same high resolution as TEM. In order to provide a better understanding of osteocytic function, we have demonstrated the ultrastructures on the OLCS by using TEM, SEM and FIB-SEM. In this presentation, I will show our new findings and strategies using TEM, SEM and FIB-SEM.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS5-5　直交配置型 FIB-SEM による象牙質疾患の未脱灰 3 次元超微形態観察

○三浦　治郎[1]，清水　真人[1]，榎本早希子[2]，荒井　重勇[2]

[1]大阪大　院歯　総診
[2]名大　エコトピア

【目的】象牙質や骨といった石灰化硬組織は脱灰処理により構造的なアーティファクトが生じたり，観察対象となる部位が喪失したりするため，必要に応じて未脱灰による超微形態観察が必要な場合がある．未脱灰において 3 次元の超微形態情報を得る手法においては，現在では集束イオンビーム観察加工法（FIB-SEM 法）が，最も現実的な手法であると考えられる．SSSEM（Serial-Slice SEM）法の一種である FIB-SEM 法は，集束イオンビームにより連続的に試料表面を切削し反射電子組成像を取得するため，トモグラフィー法のように試料の厚さ制限もなく広範囲かつ高分解能での 3 次元再構成を行うことが可能である．この手法を脱灰処理後では観察が困難であるヒト象牙質の加齢による石灰化様相の変化および齲蝕罹患部位の病態の 3 次元形状評価に応用した．
【方法】ヒト象牙質を試料とした．試料はグルタール及び還元オスミウムで固定後，タンニン酸溶液に浸漬し，EM ステイナーにて染色を行った．その後脱水後にエポキシ樹脂に包埋した．重合後に 3×3×1 mm にて削り出しを行い，直交配置型 FIB-SEM（日立製，MI4000L）を用いた．観察は 15×15×6 μm （20 nm ピッチ，300 枚）にて行い，取得データの再構築を行った．
【結果】象牙質においても高い分解能で高齢者と若年者の象牙細管周囲の石灰化様相や細管の側枝の石灰化まで観察することが出来た．齲蝕罹患象牙質においては，表層部において基質が破壊されている様相や混在部における齲蝕関連細菌の侵入様相および基質の変化が未脱灰の状態で観察することが出来た．
【考察】FIB-SEM を用いることにより，脱灰処理化では観察の出来なかった象牙細管周囲の加齢変化や齲蝕罹患象牙質の基質蛋白の様相などが詳細に 3 次元観察をすることが出来た．
【謝辞】本研究は，文部省ナノテクノロジープラットフォーム事業および科学研究助成（基盤研究 C　25462957）による支援により実施されました．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する

## Ultrastructural morphological evaluation of non-demineralized human dentin using FIB/SEM tomography

○Miura J[1]，Shimizu M[1]，Enomoto S[2]，Arai S[2]

[1]Div Interdisci Dent Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Ecotopia research center, Nagoya Univ

It has not been possible to observe the three-dimensional（3D）structure of calcified hard tissues at high resolution using conventional electron microscopy methods. Therefore, the use of focused ion beam scanning electron microscopy（FIB-SEM）to investigate the structure of non-demineralized dentin has contributed to great advances in several areas of dental research, such as ultrastructural morphology, cariology and material sciences. The aims of this study were to present an FIB-EM method for 3D evaluation of the dentin with various staining methods; and morphologically evaluate young vs. old dentin and sound vs. caries-affected dentin using FIB/SEM. We applied FIB/SEM observation to the block surface and TEM observation for ultra-thin sections. Scanned pictures（300 slices）were reconstructed as 3D images using software for evaluation of dentinal tubules, dendrites and collagenous fibers in sound and caries-affected regions of human teeth.
In the reconstructed images, we observed the location of bacteria and decomposed collagenous fibers. The major advantages of the FIB/SEM method are the ability to visualize micro-scale 3D images and observe relatively large structures, such as dendrites or bacterial colonies. This morphological data on non-decalcified dentin should provide more useful information to those who study calcified tissue.
***Conflict of Interest***：The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS5-6　チタン／生体界面の三次元観察

○長岡　紀幸[1]，吉原久美子[2]

[1]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター
[1]岡山大病院　新医療研開センター

チタン上で骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を 24 時間培養し，チタンに接着した細胞を 3 次元観察した．
窒化シリコン薄膜を有する窓が形成されたシリコン基板の，窒化シリコン薄膜側に厚さ 20 nm のチタンを電子ビーム蒸着した．窒化シリコン薄膜は，厚さ 1 μm，薄膜窓の大きさ 2x2［mm］を用いた．チタンが蒸着された窒化シリコン薄膜窓を有するシリコン基板を，金属製の穴あき容器に接着し，細胞培養容器とした．この細胞培養容器を高圧蒸気滅菌した後，MC3T3-E1 を 24 時間培養した．固定，後固定，重金属染色し，細胞培養容器の内側のみエポキシ充填した．FIB-SEM にて，窒化シリコン薄膜側から反射電子で細胞を観察した．観察したい細胞を確認し，細胞 1 個全体をシリアルセクショニング法により，連続観察した．得られた像群から，3 次元再構築した．
厚さ 1 μm の窒化シリコン薄膜＋20 nm の蒸着チタン層を通して，細胞を観察できた．さらに，窒化シリコン薄膜側から FIB 加工することで，チタン／細胞界面の剥離なしに連続観察することができた．本手法は，他の生体材料，細胞にも応用可能であり，生体材料と細胞との接着に関して，界面近傍を詳細に形態観察できると示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## 3D observation of the titanium/cell interface

○Nagaoka N[1]，Yoshihara K[2]

[1]ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]Center Innov Clinic Med, Okayama Univ Hosp

Osteoblast-like cells（MC3T3-E1）were cultured for 24 h on titanium, the cell adhered to titanium was observed three-dimensionally.
Titanium was deposited on the silicon nitride thin film formed on the silicon substrate. The silicon substrate was bonded to a metal container to prepare a cell culture vessel. Osteoblast-like cells were cultured for 24 hours in the cell culture vessel. Cultured cells were fixed, stained, and embedded in epoxy resin. Cultured cells were observed from the silicon nitride side using a FIB-SEM. The cell was observed by serial sectioning method. 3D data was reconstructed.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS6-1　オーバービュー：骨を観る　―組織化学・微細構造学からバイオイメージングへの展開―

○網塚　憲生，長谷川智香，坪井香奈子，本郷　裕美，原口　真衣，山本知真也

北大　院歯　硬組織発生

骨の組織は，様々な分化由来を有する細胞が複雑に関連して骨の改造や石灰化を維持しており，また，石灰化骨基質骨に強度やしなやかさを与える．これまでに，骨の細胞群・石灰化基質の形態学的特徴は，組織化学や電子顕微鏡などの手法によって明らかにされてきた．ところが近年になり，様々な方法・原理による観察器機が開発され，骨の解析に応用されている．例えば，二光子励起顕微鏡などによって細胞のダイナミクスを生きた状態でイメージングする技術，蛍光イメージングにより形態と定量の両方を可能にする技術，FIB-SEM や同位体顕微鏡の発展により電子顕微鏡レベルでの三次元構造を解析する技術が進歩してきており，まさに，生体内構造をダイナミックに，また，ナノレベルで解明できる時代が訪れている．また，赤外分光法とラマン分光法により，結晶化度，コラーゲン分子や炭酸塩/リン酸塩なども画像化とともに定量解析ができるようになった．従来の組織化学・微細構造学的手法に比して，近年の形態学的解析法は，これまでに観ることができなかった骨の不思議を解明できるものと期待されている．本シンポジウムでは，骨の研究において，「骨の細胞イメージング ―a new horizon― 骨のメカニズムをどこまで観ることができるか」というタイトルで，各領域の新進気鋭の研究者にご講演をお願いした．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Overview: Bone cell biology from the view point of histochemistry, ultrastructure and bio-imaging

○Amizuka N，Hasegawa T，Tsuboi K，Hongo H，Yamamoto T

Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Many cell types derived from various developmental tissues regulate bone remodeling and bone minerals, and the mineralized bone matrix provides strength and flexibility in bone. To date, many researchers have examined morphological aspects of bone cells and mineralized matrix. Recently, however, new techniques such as multiphoton microscopy evaluating for cell dynamicity, fluorescent bio-imaging visualizing both morphology and quantification, FIB-SEM clarifying three dimensional ultrastructure, isotope microscopy mapping stable isotopes have been developed. In addition, FITR and Raman spectrograph can envision crystallinity and calcium carbonate/calcium phosphate in bone, which seems to, at least in part, represent bone quality. In this satellite symposium, four experts will present their excellent findings using newly-devised technique.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS6-2 SIM・FIB-SEM・原子間力顕微鏡・同位体顕微鏡を用いた骨組織解析への応用

○長谷川智香，坪井香奈子，本郷　裕美，山本知真也，網塚　憲生

北大　院歯　硬組織発生

骨組織の形態学は，これまで光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡による解析を主軸に発展してきた．しかし近年，技術の発達に伴い様々な観察機器が開発され，より多角的な視点で骨組織解析を行うことが可能になりつつある．我々の研究室では，超解像顕微鏡，FIB-SEM，同位体顕微鏡，そして原子間力顕微鏡といった観察原理の異なる機器を用いて，骨組織の微細構造や物質の局在，物性の解析をナノレベルで進めている．

超解像顕微鏡は構造化照明顕微鏡法(SIM)を用いることで，光学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡よりもはるかに優れた解像度で生体内の蛍光イメージングが可能な装置である．また，FIB-SEMは，試料表面の切削とSEM撮影を繰り返すことで，試料の3次元微細構造を観察することができる．つまり，超解像顕微鏡やFIB-SEMは，骨組織の3次元微細構造をより詳細に観察する手段であると言える．一方，同位体顕微鏡(isotope microscopy)は安定同位体を標識した物質の微細局在を，原子間力顕微鏡(AFM)は骨基質の硬さや弾性係数をナノスケールで測定することができる．このような各種形態学的解析法の発展に伴い，多くの新知見がもたらされることが期待される．本シンポジウムでは，これらの装置を用いて得られた知見について御紹介したい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Morphological assessment on bone tissue using SIM, FIB-SEM, atomic force microscopy and isotope microscopy

○Hasegawa T，Tsuboi K，Hongo H，Yamamoto T，Amizuka N

Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

Many researchers have examined bone histology mainly by using light microscopy and electron microscopy. Recently, we have employed several new techniques such as structured illumination microscopy（SIM）, focused ion beam-scanning electron microscope（FIB-SEM）, isotope microscope and atomic force microscope（AFM）to elucidate the morphology, elemental localization and physical properties in bone. SIM is the most powerful technique for visualizing the fluorescent imaging of living cells. FIB-SEM can display the ultrastructural three-dimensional（3D）reconstruction of the objects, removing the superficial layer of the samples by radiating ion beam and subsequent serial scanning images with the same high resolution as TEM. In addition, isotope microscope detects the targets labeled stable isotopes, and AFM can measure stiffness and elastic modulus of bone. In this symposium, I will present our recent findings by using these new techniques.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS6-3 蛍光細胞イメージングと骨形態計測で見る骨代謝におけるケモカインシグナルの役割

○李　智媛[1]，飯村　忠浩[1,2,3]

[1]愛媛大　学術支援センター
[2]愛媛大　プロテオサイエンスセンター
[3]愛媛大病院　先端医療創生センター・人工関節センター

ケモカインは，ケモタキシス活性を持つサイトカインとして同定された．私たちのグループは，CC ケモカインの骨代謝における役割を研究してきた．そのうちの一つである，CCR5 は，HIV の共受容体である．また，疫学的調査から骨吸収疾患との関連性が示唆されているが，骨代謝における CCR5 シグナルの役割は良く解明されていない．超解像顕微鏡とライブセルイメージング解析により，CCR5 ノックアウトマウス由来の破骨細胞は，ポドゾームの形成が障害されており，運動性も野生型由来のものと異なることが明らかとなった．また，RANKL 投与を投与し骨粗鬆症を誘発するモデル実験において，CCR5 ノックアウトマウスは，野生型と比べて優位に骨減少が阻害されていた．蛍光細胞イメージングと骨形態計測を組み合わせた解析により，CCR5 シグナルによる，破骨細胞のユニークな機能調節機構が明らかとなった．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Role of chemokine-mediated signal revealed by fluorescence cell imaging and bone histomorphometry

○Lee J[1]，Iimura T[1, 2, 3]

[1]Adv Res Support Center, Ehime Univ
[2]Proteoscience Center, Ehime Univ
[3]Translational Res Center, and Artificial Joint Integrated Center

C-C chemokine receptor 5（CCR5）gene encodes for the co-receptor of macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus（HIV）. However, physiological roles of CCR5 in bone metabolism have not been well documented. Super-resolution microscopy analyses showed that *Ccr5*-deficient osteoclasts showed larger in size and disorganized their specific podosome patterning. Indeed, live-cell imaging indicated that *Ccr5*-deficient osteoclasts showed abnormal locomotion, thus leading decreased bone resorbing activity. Interestingly, *Ccr5*-deficient mice were resistant to RANKL-induced bone loss, suggesting functional impairment of osteoclasts. Therefore, our combinatorial analyses of fluorescence cell imaging and histomorphometry revealed a unique regulatory mechanism of osteoclast function that involves CCR5-meditaed signal.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS6-4　生体骨イメージングで解く骨吸収抑制剤の新たな作用機序

○石井　　優[1,2]

[1]大阪大　院医／生命機能　免疫細胞生物
[2]JST・CREST

骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が協調して繰り返される，極めてダイナミックな組織である．しかしながら，固定骨組織やCTを用いた従来の骨形態学的解析では，骨において行われている現象のスナップショットを追うのみであった．本演者は特殊な顕微鏡システムを独自に改良・活用することで，骨組織内部を生きたままの状態で観察し，その中における細胞ダイナミクスをリアルタイムで解析する方法論を世界に先駆けて開発した．さらにこれを駆使して，破骨細胞の骨組織への遊走・骨破壊動態や，骨芽細胞との機能連関，免疫細胞との相互作用などを実体的に解明してきた．本講演では，これら最新の生体骨イメージングの技術を駆使した，骨制御機構に関する知見を解説するとともに，近年臨床現場に登場してきた様々な骨疾患治療薬が生体内でどのように作用しているのか，イメージングによりその薬理作用の実体に迫った最近の研究成果について紹介する．

【利益相反】著者は利益相反状態にあります．

## Intravital bone imaging dissecting the ‘real’ mode of actions of anti-bone resorptive drugs

○Ishii M[1,2]

[1]Dept Immunol Cell Biol, Grad Sch Med Frontier Biosci, Osaka Univ
[2]JST, CREST

During the last decade, multi-photon fluorescent microscopy has launched a new era in the field of biology. By using this advanced imaging technique we have established a new system for visualizing in situ behavior of a diversity of living cells within intact tissues and organs. Among them, we succeeded in visualizing the various dynamic phenomena within bones, a mysterious organ where various kinds of hematopoietic and immune cells are produced and functioning although poorly analyzed by conventional methodology such as histological analyses with decalcified bones. Especially we have focused on the behavior of osteoclast, a kind of specialized macrophage contributing to physiological bone remodeling as well as to bone destruction in arthritis and osteoporosis, and have been revealing novel mechanisms controlling migration and function of osteoclasts in situ. In this presentation, I will show in vivo cellular dynamics in bone and inflammatory systems, and also present our latest data showing the real mode of actions of anti-bone destructive drugs.

***Conflict of Interest:*** The author declares conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS6-5　赤外分光法・ラマン分光法による骨質の可視化

○木村-須田　廣美[1, 2]，伊藤　哲平[2]，兼平　裕也[2]，日高　公介[2]，金沢　恭祐[2]，植野　秀俊[2]

[1]千歳科技大　理工　応用化学生物
[2]千歳科技大　院　光科学

体の支持器官である骨は代謝を行いながら環境に適した骨強度を維持している．したがって，加齢，糖尿病，慢性腎臓病などに伴う骨・ミネラル代謝異常を発症した場合，その骨強度は著しく低下する．一般に，骨強度は70％が骨量(骨密度)に30％が骨質に依存すると考えられている．骨密度測定については，既にDXA法や超音波法が広く臨床に普及しているが，骨質については十分な計測法の開発が行われていない．骨質は骨構造，骨代謝回転，骨疲労，石灰化度，骨基質など複数の因子が複雑に絡み合って決定されるため，これら複数の因子を同時に計測できる骨質評価法の開発が期待されている．こうした背景から，石灰化度，結晶化度，コラーゲン分子の二次構造，炭酸塩/リン酸塩などの骨質因子を同時に計測できる赤外分光法とラマン分光法が注目されている．特に，イメージング機能を搭載した顕微赤外イメージングや顕微ラマンイメージングは，骨をすり潰して得られる平均的あるいは顕微鏡による局所的な骨質解析のみならず，骨質の分布を可視化することができるため，骨質を網羅的に評価できる手法として期待されている．我々のグループでは，これまでに赤外イメージングやラマンイメージングを用いてラットやマウスの骨質解析を行ってきた．本シンポジウムでは，慢性腎臓病に伴う高代謝回転骨，無形成骨症に伴う低代謝回転骨，クル病，喫煙モデルなど，様々な骨疾患の骨質について，赤外イメージングならびラマンイメージングによる可視化・解析例をご紹介させて戴きたい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Visualization of bone quality by FTIR and Raman spectroscopy

○Kimura-Suda H[1, 2]，Ito T[2]，Kanehira Y[2]，Hidaka K[2]，Kanazawa K[2]，Ueno H[2]

[1]Dept Appl Chem Biosci, Chitose Inst Sci Tech Fac Sci Tech
[2]Chitose Inst Sci Tech Grad Sch Photonics Sci

Bone strength is an indicator of fracture risk and arises from bone mass and bone quality. Fourier Transform Infrared（FTIR）and Raman spectroscopies are powerful tools to characterize chemical composition, which is an important contributor to bone quality including parameters such as the mineral-to-collagen matrix ratio, carbonate-to-phosphate ratio in the hydroxyapatite, crystallinity, and collagen secondary structure. A significant advantage of FTIR and Raman imaging for bone analysis is the ability to visualize the distribution of bone quality. In our previous works, we have characterizes bone quality in rats or mice using FTIR imaging or Raman imaging. In this work, we will show bone quality, which is characterized using FTIR imaging or Raman imaging, in rats or mice with several disease: chronic kidney disease（high or low turn over bone）, rickets, pulmonary emphysema, etc.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS7-1　歯髄幹細胞の機能解析と組織再生治療への有効性の検討

○秦　　正樹

愛院大　歯　有床義歯

間葉系幹細胞の一種である歯髄幹細胞は2000年にその存在が明らかとなり，今日に至るまでに様々な研究が進められている．歯髄幹細胞に関する論文数は年々増加し，その注目の高さを伺うことができる．大きな特徴の一つに，智歯の抜歯や矯正治療による便宜抜歯といった本来不要となった組織から採取可能なため，細胞供給源として魅力的といった点があげられる．また，凍結保存によって細胞特性を維持することが可能なため，若年時に比較的低侵襲に細胞を採取し，必要な時に解凍して使用するというストラテジーが考えられる．他にも，高い増殖能，多分化能，免疫調整能，サイトカイン産生能などの特性を持つと報告されている．
私たちは，これらの特性を持つ歯髄幹細胞が組織再生治療に有用であると考え，現在歯髄幹細胞移植療法の有効性について検討を行っている．一般的に細胞移植の際重要となる点としては，細胞数と細胞特性が挙げられる．抜去歯の歯髄組織より採取した歯髄幹細胞の数には限りがある．そのため，細胞増殖能の活性化，多分化能の維持，もしくは分化誘導などを目的とした前処理について，これまで周期的伸展刺激や磁場刺激を歯髄幹細胞に加え，その影響について機能解析を行ってきた．また，組織再生治療に関しては骨組織，神経組織再生を対象として，歯髄幹細胞の骨分化能，scaffoldと複合させた際の増殖活性，ALP活性について評価を行った．さらに，糖尿病性神経障害を発症した動物に歯髄幹細胞を移植することにより，その伝導速度，血流量の改善などが確認された．
本シンポジウムでは，私たちがこれまで行ってきた研究結果について報告する．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Functional analysis of dental pulp stem cells and their application to regenerative therapy

○Hata M

Dept Removable Prosthodont, Aichi Gakuin Univ

Dental pulp stem cells（DPSCs）are a type of mesenchymal stem cell derived from dental pulp and have been a topic of research since 2000. Papers related to DPSCs have remarkably increased. DPSCs have been focused on the promise of cell source for regenerative medicine. DPSCs can be isolated from wasted tissue such as wisdom teeth extracted for orthodontic reasons. DPSCs can maintain characteristics in cryopreservation, so they are obtained from the extracted teeth of young adults and these DPSCs are then thawed out before use. We have assessed uses of DPSC transplantation for regenerative therapy. The keys of cell transplantation are quantity and quality. The number of DPSC from extracted dental pulp is limited. So, we think preprocessing is an effective way to activate proliferation, while maintaining multiple differentiation and induction into various cells. Previous studies have shown that DPSCs were responsive to stimulations such as mechanical stress and magnetic fields. We have also evaluated bone and nerve regeneration with DPSCs. The proliferation and ALP activity of DPSCs on the scaffold were assessed and the transplantation of DPSC ameliorated the impaired nerve conduction velocity and nerve flow in diabetic animals. We will present these findings in this symposium.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript

## SS7-2　歯髄間葉細胞の由来と造血支持能を含む性状

○山崎　英俊

三重大　院医　幹細胞発生

間葉細胞は主に神経堤細胞と中胚葉に由来する．神経堤細胞は胎生期に神経管癒合部より発生する細胞集団であり，神経細胞やグリア細胞のみならず骨や軟骨等の間葉系細胞にも分化することが知られている．特に，神経堤細胞は，歯を含む頭蓋顔面の器官形成にも寄与している．歯の発生には歯上皮と歯間葉の相互作用が重要であり，最終的に歯上皮はエナメル芽細胞に，歯間葉は象牙芽細胞に分化する事が知られている．

これまで，我々は，神経堤細胞及び中胚葉由来の細胞を蛍光標識出来るマウスを用いて，歯の間葉には神経堤のみならず，中胚葉由来の細胞が胎仔期から成体まで寄与することを明らかにした．歯髄の神経堤由来細胞は，間葉系幹細胞の検出系として知られる colony forming Unit Fibroblast（CFU-F）形成能を有していることがわかった．さらに，歯髄の間葉細胞は，造血関連遺伝子を発現しており，B 細胞や破骨細胞の造血支持能を有していることもわかった．

さらに，これまで，我々は試験管内で神経堤細胞派生物がどのように発生し分化するかを調べる目的で，神経堤細胞を蛍光標識出来るマウスから胚性幹細胞を作製している．これらの蛍光標識細胞から色素細胞や神経系細胞のみならず骨芽細胞や脂肪細胞を含む間葉系細胞を分化誘導したので，簡単に紹介したい．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Origin of dental mesenchymal cells and property of these cells including supporting capacity of hematopoietic cells

○Yamazaki H

Dept Stem Cells and Developmental Biol, Inst Med Sci, Mie Univ Grad Sch Med

Mesenchyme is mainly derived from Neural crest（NC）and mesoderm. NC cells are known to be generated from the margin of neural tube at embryonic stage, and that differentiate into neuron, glial cells and mesenchymal cells. Especially, NC also contributed to the organogenesis of the cranio-face including teeth. Reciprocal interactions between dental epithelium and dental mesenchyme are important for tooth development, and the former and the latter finally differentiates into ameloblasts, and odontoblasts, respectively.

Previously, using transgenic mice that enable us to trace NC-derived or mesoderm-derived cells as YFP-expressing cells, we reported that both cells contributed to dental mesenchyme from fetus to adult. NC-derived cells in dental mesenchyme had a capacity of Colony Forming Unit-Fibroblasts（CFU-Fs）that was known as one of mesenchymal stem cell assay *in vitro*. Furthermore, dental mesenchyme expresses genes encoding critical hematopoietic factors and supports the differentiation of B lymphocytes and osteoclasts.

Furthermore, to investigate how murine NC cells develop and differentiate into their descendants, we established ES cell lines from the mice that enabled us to trace NC and NC-derived cells as YFP-positive cells. As these $YFP^+$ cells differentiated into not only melanocytes but also neurons, adipocytes, and osteoblasts, I would like to introduce briefly.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS7-3　歯髄・歯肉由来の間葉系幹細胞の特性と硬組織再生

○川島　伸之，興地　隆史

医科歯科大　院医歯　歯髄生物

歯髄組織は，神経堤由来の間葉系の組織であり，以前より未分化間葉系幹細胞の存在が報告されている．歯髄組織由来の幹細胞は，他の組織由来の間葉系幹細胞と比較して，増殖能および分化能ともに高いと報告されている．再生医療において歯髄組織由来の幹細胞を用いる場合，歯髄組織のソースとなるのは，健全な智歯が最も一般的であるが，すでに智歯を抜去してしまった場合，あるいはもともと智歯が欠損している場合には，歯髄幹細胞を得ることができない．そのために，歯髄組織に変わる間葉系幹細胞のソースとして歯肉の間葉組織に着目した．歯肉組織は，大変再生能の高い組織であり，歯肉を部分切除しても，その部に歯肉を再生させることは可能である．しかし，以前より歯肉由来の線維芽細胞は反応性に乏しい細胞として扱われてきている．今回，歯髄組織および歯肉組織由来の間葉系幹細胞の硬組織形成に関する特性を通常の二次元培養に加えて，三次元スフェロイド培養条件下においても比較した．その結果，二次元培養では，歯髄由来間葉系幹細胞により高い硬組織マーカー発現を認めたが，三次元培養を行うことで，両間葉系幹細胞の硬組織マーカー発現は増加し，さらに石灰化結節形成も誘導された．すなわち，硬組織形成細胞への分化傾向は，歯髄組織由来間葉系幹細胞がより高い傾向を示したが，歯肉由来間葉系幹細胞においても分化誘導は可能であることが明らかになった．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Mineralization capacities of the dental pulp and gingiva derived mesenchymal stem cells

○Kawashima N，Okiji T

Tokyo Med Dent Univ（TMDU）, Grad Sch Med Dent Sci, Div Oral Health Sci, Dept Pulp Biol Endodont

The dental pulp tissues, which are neural crest origin, contain undifferentiated mesenchymal stem cells, which are reported to possess relatively high growth and differentiation capacities compared to other mesenchymal stem cells. The dental pulp mesenchymal stem cells are usually obtained from extracted wisdom teeth. Therefore, it is impossible to establish the dental pulp mesenchymal stem cells from patients who have no wisdom teeth. One of other candidates of oral mesenchymal stem cells is gingival mesenchymal stem cells. However, gingival fibroblasts are thought to be “low-responsive” cells against various differential induction. We compared the mineralization capacity of dental pulp and gingival mesenchymal stem cells in two dimensional and three dimensional culture condition. The dental pulp mesenchymal stem cells showed relatively high expression of osteoblastic markers compared to gingival mesenchymal stem cells. However, both types of cells upregulated the osteoblastic marker expression and mineralized nodule formation in a three dimensional spheroid culture. These results indicated that not only dental pulp mesenchymal stem cells but also gingival mesenchymal stem cells may serve as a potent cellular source for mineralized tissue regeneration.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS7-4　歯髄幹細胞と橋渡し研究

○山座　孝義

九大　院歯　分子口腔解剖

歯髄幹細胞は，まずヒト永久歯歯髄組織に由来する歯髄幹細胞 dental pulp stem cells（DPSCs）が発見された（Gronthos et al., PNAS, 2000）．その後，脱落乳歯幹細胞 exfoliated deciduous teeth（stem cells from human exfoliated deciduous teeth（SHED）（Miura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003），根未完成の歯根根尖部幹細胞 stem cells from apical papilla（SCAP）（Sonoyama et al., PLoSOne, 2006），過剰歯幹細胞 supernumerary tooth derived stem cells（SNTSCs）（Makino et al., J Dent Res, 2013）と次々に幹細胞の存在が明らかとなり，現在では，これら歯髄幹細胞の優れた増殖能力と多分化能力に注目して，再生医療への応用が期待されている．
乳歯幹細胞 SHED は，脱落した乳歯に残存する歯髄から同定された組織幹細胞である．様々な細胞へと分化する多分化能のみならず，優れた免疫調節能を備えている事も明らかとなってきた．
本シンポジウムでは，現在までに解明されている乳歯幹細胞 SHED の有する幹細胞学的特性を紹介するとともに，我々の最新の研究成果をもとにして，乳歯幹細胞 SHED を応用した橋渡し研究について考察してゆく予定である．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Dental pulp-derived stem cells and translational research

○Yamaza T

Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci

Dental pulp-derived stem cells were firstly identified in dental pulp tissues of human impacted third molars（Gronthos et al., PNAS, 2000）. Many investigators succeeded to isolate other dental pulp-derived stem cells including exfoliated deciduous teeth stem cells from human exfoliated deciduous teeth（SHED）（Miura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003）, stem cells from apical papilla（SCAP）（Sonoyama et al., PLoSOne, 2006）, supernumerary tooth derived stem cells（SNTSCs）（Makino et al., J Dent Res, 2013）. Now many focuses have been accumulated to use these human dental pulp-derived stem cells for tissue regeneration and cell therapy. In this symposium, we would like to introduce current topics of SHED properties and will discuss regarding to SHED-based translational research.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS8-1　下歯槽神経切除モデルにおける細胞移植の効果

○本田　雅規[1,2]，鳥海　　拓[2]，岡　　篤志[2]，篠田　雅路[3]，岩田　幸一[3]，磯川桂太郎[2]

[1]愛院大　歯　口腔解剖
[2]日本大　歯　解剖Ⅱ
[3]日本大　歯　生理

抜歯やインプラント埋入時に下歯槽神経損傷とそれに伴う知覚麻痺が生じると患者のQOLは大きく損なわれる．これらは，医療が高度化されたための弊害であるともいえる．一方で，下歯槽神経損傷後の治療法においては，対症療法はあるものの根治的治療法は確立されていないのが現状である．
近年，幹細胞の機能や特性の解析から，幹細胞移植によって神経の再生が誘導される可能性が示唆され，神経損傷後の機能・感覚障害を回復させようとする実験的研究が始まっている．われわれも，口腔領域における神経損傷後の根治的治療法の開発を目指すプロジェクトを立ち上げ，下歯槽神経の神経損傷後の機能回復に細胞移植が有効であるかを検討したので報告する．
本発表の前半において，下歯槽神経損傷後の移植細胞の候補となるシュワン細胞およびシュワン細胞の由来となる神経堤細胞を移植するまでの方法を概説する．さらに，動物実験を用いて前述した細胞の神経損傷における神経再生の誘導能の評価を行った．本発表の後半においてラット下歯槽神経モデルに細胞移植を行い，組織学的に細胞移植の有効性を評価したので概説する．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Cell transplantation after inferior alveolar nerve resection in rats

○Honda M[1,2]，Toriumi T[2]，Oka A[2]，Shinoda M[3]，Iwata K[3]，Isokawa K[2]

[1]Dept Oral Anat Aichi Gakuin Univ Sch Dent
[2]Dept Anat Nihon Univ Sch Dent
[3]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Trauma nerve section is a significant clinical problem. Severe peripheral trigeminal nerve injury results in trigeminal ganglion nerve degeneration. Chronic pain often develops in the orofacial region after inferior alveolar nerve injury. In rat models, IAN injury often causes severe neuropathic pain-like behavior in the IAN-innervated. There are several approaches to surgical nerve repair, but the definitive treatment has not been established. This study aimed to examine the contributions of cell transplantation at the injury site after inferior alveolar nerve transection.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS8-2 眼窩下神経損傷における三叉神経節での alpha-2/delta-1 subunit の分布と機能

○佐藤　　匡，市川　博之

東北大　院歯　口腔器官構造

歯髄に機械的刺激を与えると，三叉神経尾側亜核表層におけるニューロンに c-fos が発現する．我々は，歯髄刺激の 1 週間前に眼窩下神経を切断することにより，c-fos 発現が過剰に認められるという結果を得た．一方，眼窩下神経を切断し，歯髄を刺激しなかった三叉神経感覚核では c-fos 陽性ニューロンは認められない．本研究では，この過剰な c-fos 発現のメカニズムを解明するために，神経細胞や筋細胞の興奮を制御すると考えられている L-type calcium channel の alpha-2/delta-1 subunit に着目し，実験を行なった．実験動物には，Wistar ラットを用いた．fluoro-gold を逆行性トレーサーとして歯髄に投与し，3 日後動物を Zamboni 固定液で潅流固定し，切片作成後，alpha-2/delta-1 subunit の免疫染色を行った．その結果，眼窩下神経を損傷しない三叉神経節では歯髄を支配するニューロンの 30.6%が alpha-2/delta-1 subunit を含んでいた．しかし，眼窩下神経切断 1 週間後では，alpha-2/delta-1 subunit を発現する歯髄ニューロンは有意に増加していた（40.5%）．さらに歯髄刺激前に alpha-2/delta subunit のアンタゴニストであるプレガバリンを投与したところ，眼窩下神経切断による c-fos の過剰発現が抑制された．以上の結果より，眼窩神経節損傷後の歯髄ニューロンにおける alpha-2/delta-1 subunit の増加が，三叉神経尾側亜核における 2 次感覚ニューロンの異常な興奮に関係することが示唆された．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Infraorbital nerve injury increases expression of alpha-2/delta-1 subunit in the rat trigeminal ganglion

○Sato T，Ichikawa H

Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Immunohistochemistry for alpha-2/delta-1 subunit of L-type calcium channel was performed on the rat trigeminal ganglion（TG）. The immunoreactivity（IR）was detected in one third of TG neurons（32.8 %）. These neurons were mostly small or medium-sized. A retrograde tracing method also demonstrated that alpha-2/delta-1 subunit-IR was common among cutaneous TG neurons（48.1 %）and relatively rare among tooth pulp TG neurons（24.4 %）. Transection of the infraorbital nerve dramatically increased the number of alpha-2/delta-1 subunit-IR neurons in the TG. After the infraorbital nerve transection, in addition, 40.5% of tooth pulp TG neurons contained alpha-2/delta-1 subunit-IR. The nerve injury may cause elevation of apha-2/delta-1 subunit expression in both injured and uninjured neurons in the TG. The subunit in TG neurons may be associated with nociceptive transmission from oro-facial regions.

***Conflict of Interest:*** The authors do not have any conflict of interest.

## SS8-3　ラット下歯槽神経切断による島皮質の局所回路の可塑的変化

○小林　真之

日本大　歯　薬理

末梢神経や脊髄の損傷は，末梢のみならず高次中枢の情報処理機構も可塑的に変化させると考えられている．その変化は末梢神経が修復された後も持続し，慢性疼痛や幻肢痛の原因になる可能性がある．歯科治療においてはしばしば下歯槽神経の損傷が生じ，口腔周囲のしびれなど様々な症状が起こるが，その治癒機転については不明な点が多い．特に，中枢神経系における変化についてはほとんど明らかにされていない．そこで本研究は，下歯槽神経切断によって生じる中枢シナプス伝達の可塑性ならびに口腔感覚を生成する皮質内局所神経回路の変化の機序を検討した．SD 系ラット（2-3 週齢）を用いて下歯槽神経切断モデル動物を作製し，上顎臼歯歯髄への電気刺激に対する島皮質の興奮応答を光学計測法によって計測した．その結果，幼弱ラットの下歯槽神経を切断すると，下歯槽神経が修復された後も歯髄刺激に対する島皮質の興奮応答が増大することが明らかになった．そこでこの可塑的変化の機序を検討するため，MNI-caged-L-glutamate（200 μM）の灌流下にて皮質スライスの表面の異なる地点に UV レーザーを照射する Laser scanning photostimulation 法を用いて興奮性入力の分布図を作成した．切断モデル群の II/III 層錐体細胞は，コントロール群と比較して IV 層から強力な興奮性入力を受けることが明らかになった．一方 II/III 層に位置する GABA 作動性 fast-spiking interneuron において，切断モデル群とコントロール群に興奮性入力の差は認められなかった．テトロドトキシン灌流下で II/III 層錐体細胞から記録される miniature IPSC の発生頻度ならびに振幅値は，切断モデル群で減少していることが明らかとなった．以上の結果は，下歯槽神経切断後に認められた島皮質における興奮性の増大は，グルタミン酸作動性の興奮性入力の増加と GABA 作動性の抑制性入力の低下によることを示唆する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Alveolar nerve injury changes topographical organization in rat insular cortex

○Kobayashi M

Dept Phramacol, Nihon Univ Sch Dent

Nociception is processed in the several regions in the cerebral cortex including the somatosensory, cingulate, and insular cortices. We have elucidated the roles of the cerebral cortex in dental pain, however, it is still an open issue how nerve injury modulates neural activities in the higher brain including the insular cortex. In the present study, we focused on the plastic changes of excitation of the insular cortex in the inferior alveolar nerve injury（IAI）model. To evaluate the spatiotemporal profiles of excitation in the insular cortex, the precise regions responding to the electrical stimulation of the maxillary and mandibular molar tooth pulps were detected by the optical imaging technique with a voltage sensitive dye. We found that excitatory propagation in the insular cortex was expanded 1-2 weeks after IAI, and the expanded excitatory propagation did not recovered in a month. *In vitro* whole-cell recording from layers II/III pyramidal neurons revealed an increment of excitatory inputs from layer IV in IAN models. These results suggest that IAI may induce unrecovered changes in the higher brain, and therefore, the treatment to repair injured nerves is necessary to suppress the neuroplastic changes in the cerebral cortex.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS8-4　三叉神経運動核アストログリアは眼窩下神経損傷による開口反射の変調に関与する

○北川　純一

松本歯大　口腔生理

神経障害性疼痛がグリア細胞を活性化させることが報告されているが，グリアの活性化が口腔運動の変調に関与しているかについては不明である．本研究は，絞扼性眼窩下神経損傷後に発症する三叉神経第二枝領域の神経障害性疼痛と開口反射の変調および三叉神経運動核のアストログリア活性化の関連性について検討した．
ラットへの絞扼性眼窩下神経損傷後，神経損傷側口ひげ部の逃避閾値を計測した結果，アロディニアが発症した．アロディニアを発症したラットにおいて，下歯槽神経の電気刺激により誘発される開口反射の顎二腹筋筋電図の振幅が増大した．この開口反射の亢進は三叉神経運動核へのグルタミン合成酵素阻害薬であるメチオニンスルホキシミン投与により抑制された．また，この抑制期間に三叉神経運動核へグルタミンを投与すると開口反射は回復した．免疫組織学的実験は，アロディニアを発症したラットの三叉神経運動核領域のアストログリアが活性化していることを示した．さらに，この活性化アストログリアの存在部位では，グルタミン合成酵素が増加していることが明らかになった．
これらの結果は，三叉神経運動核のアストログリアが神経伝達物質として放出されたグルタミン酸を取り込み，グルタミン合成酵素によってグルタミンに変換してから放出し，ニューロンが放出されたグルタミンをグルタミン酸に変換して再利用するというアストログリアのグルタミン合成サイクル（グルタミン酸－グルタミン シャトル）が，開口反射の変調に関与していることを示唆している．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Involvement of astroglial glutamate-glutamine shuttle in modulation of the jaw-opening reflex in rats with neuropathic pain due to chronic constrictive injury of the infraorbital nerve

○Kitagawa J

Dept Oral Physiol, Sch Dent, Matsumoto Dent Univ

To evaluate the mechanisms underlying orofacial motor dysfunction associated with trigeminal nerve injury, we studied immunohistochemical analysis to assess astroglial cell activation in the trigeminal motor nucleus（motV）, nocifensive behavior and the effect of glutamine synthase（GS）blocker methionine sulfoximine（MSO）on jaw-opening reflex（JOR）in rats following the chronic constriction injury of the infraorbital nerve（ION-CCI）. The immunohistochemical analysis to assess astroglial cell activation showed GFAP-IR cells expression in the motV increased significantly after following ION-CCI. In addition, the nocifensive behavior and JOR amplitude were also strongly enhanced after ION-CCI. The number of GS- and GFAP-IR cells was also significantly higher in ION-CCI. The JOR was strongly suppressed after microinjection of MSO in the motV of ION-CCI. After glutamine microinjection in the motV, the JOR amplitude was gradually return to the control level. The present findings suggest that astroglial glutamate-glutamine shuttle in the motV is involved in the modulation of excitability of the trigeminal motoneurons affecting the enhancement of various jaw reflexes associated with trigeminal nerve injury.
***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS8-5 抗炎症性組織再生型 M2 マクロファージ誘導因子による神経再生療法の開発

○山本　朗仁

名大　院医　頭頸部感覚器外科

間葉系幹細胞移植による再生医療は，様々な難治性疾患に高い治療効果を発揮することが期待されています．しかしながら，移植細胞の低生着率，腫瘍形成や免疫拒絶の危険性など，臨床応用には無視できない諸問題が山積しています．私どものグループは幹細胞の治療効果因子のみの投与による新しい再生治療法の開発を目指してきました．私どもはヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清から，新規神経再生因子を同定しました．この再生因子はケモカイン MCP-1 とシアル酸認識レクチン Siglec-9 の細胞外ドメインで構成されます．2 因子をラット脊髄損傷モデルや顔面神経部分切除モデルに投与すると，運動機能が著しく改善します．その効果は，幹細胞移植と遜色ないものでした．2 因子は相乗的に作用し，MCP-1 レセプター CCR2 を介して組織再生型 M2 マクロファージを誘導することで，神経損傷による炎症反応や神経細胞死や瘢痕形成を抑制，軸索再生を促します．即ち，2 因子は生体の自己組織再生能力を引き出すことで損傷後の中枢および末梢神経機能の改善を促したと考えられます．本研究は，幹細胞が産生する組織再生因子の実態を明らかにするとともに，細胞移植に頼らない再生因子による再生医療の開発に道を開いたと考えます．本セミナーでは，新規神経再生因子の同定とその治療効果，炎症制御と組織再生のメカニズムの接点について議論します．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Development of new neuroregenerative therapy based on the novel protein complex inducing anti-inflammatory/tissue-regenerating M2 macrophages

○Yamamoto A

Dept Head and Neck and Sensory Organ Med, Nagoya Univ Grad Sch Med

Stem cell transplantation therapy holds great promise for establishing effective treatments for various intractable diseases. However, for clinical use, there are serious problems such as poor survival, tumorigenesis and strong immune reactions of engrafted stem cells. We aim to develop a novel regenerative therapy using regenerative factors from stem cells. By secretomic analysis of a conditioned medium from deciduous dental pulp stem cells, we identified a novel set of inducers for anti-inflammatory M2-like macrophages: monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）and the secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9（ED-Siglec-9）. MCP-1 and ED-Siglec-9 administration into the injured spinal cord or transected facial nerve synergistically induced M2-like macrophages and led to a marked recovery of neurological function. M2 macrophages extended neurite and suppressed neural apoptosis and scar formation associating with nerve injury. Our data demonstrate that the unique combination of MCP-1 and ED-Siglec-9 repairs both of the injured central and peripheral neurons through anti-inflammatory M2-like macrophage induction. Our study have identified a novel tissue regenerating mechanisms driven by dental pulp stem cells and may open the avenue to develop a new regenerative therapy that do not involve stem cell transplantation.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS9-1　乾燥に“潤い”をもたらすメカニズムの解明

○黒瀬　雅之[1]，八田あずさ[1,2]，岡本圭一郎[1]，Ian D Meng[3]，山村　健介[1]

[1]新潟大　院医歯　口腔生理，[2]新潟大　病院　総合診療，[3]ニューイングランド大　医　生理

乾燥感は，涙・鼻汁・唾液の減少により誘発され，“持続的”な分泌液の減少は“潤い”を損なわせ乾燥症を誘発する．外分泌腺からの分泌には，反射性分泌に加え持続的な分泌すなわち“基礎分泌”があり，この基礎分泌が“潤い”を保つのに重要である．元来，基礎分泌の低下は，自己免疫反応に基づく炎症に起因する外分泌腺の機能不全が主たる要因とされ，そのメカニズムや治療法に焦点が当てられており，基礎分泌に関連する適切な Neuronal drive があるかについては注目されてこなかった．しかし，レーシック手術後の角膜乾燥症の多発という近年の疫学結果から，外分泌腺の炎症を伴わなくても乾燥症が発症し，その要因として背後にある分泌を司る神経回路に関心が持たれ始めている．我々は，目薬や保湿剤といった乾燥症に対する対症療法に取って代わる新たな治療のオプションとして，“基礎分泌”に着目し，痛みを伴わず基礎分泌を支配する神経系を活性化させられる手法の確立を最終目的とした．

角膜には，自由神経終末が高密度に分布し，応答特性から①Polymodal Neuron ②Mechanoreceptive Neuron ③Cold Cell に分類されてきた．その中で，Cold Cell は，non-noxious な温度の低下に対して応答し，また室温下では持続性の神経活動を有す特性から，乾燥に伴う上皮細胞表面の温度低下に対して応答することで，上皮細胞の“潤い”をモニタリングしていると仮説を立てた．そこで，①Cold Cell の特性 ②連絡する上位中枢への経路 ③TRPM8 channel の感度変化が，Cold Cell の活動性に及ぼす影響並びにその因子 ④分泌機構に及ぼす Cold Cell の役割を把握することを目的とした．実験動物にて三叉神経節から微小電極を用いて細胞外記録を行い，角膜への冷刺激に対して応答する Cold Cell の同定し，種々の作動薬や拮抗薬の投与による影響を中心に検討を行ったので，その結果の一部を報告する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The mechanisms of glandular secretions for proper lubrication

○Kurose M[1]，Hatta A[1,2]，Okamoto K[1]，Meng ID[3]，Yamamura K[1]

[1]Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent，[2]General Dent and Clinic Education Unit, Niigata Univ Hosp，[3]Div Physiol, New England Univ

Specialized structures in the orofacial region, such as the intranasal cavity, the ocular surface and the intraoral cavity, require glandular secretions for proper lubrication. Each structure is innervated by the trigeminal nerve, which represents the afferent limbs of the reflex arcs that regulate secretions. The sensory afferents that innervate the epithelium of these structures must be able to respond to drying for preventing dry syndrome.

The cornea is densely and exclusively innervated by free nerve endings. Corneal primary afferent neurons fall into three main categories based on response properties. The majority of neurons are polymodal nociceptors, second class are mechanoreceptive neuron. Lastly, neurons respond to non-noxious reduction in temperature and have been defined as “Cold Cells”. Cold Cells, in contract to polymodal neurons, have high ongoing activity. We have made the novel discovery that Cold cells are activated by drying of the ocular surface. The proposed studies were 1）characterize the properties of corneal afferents that are sensitive to drying, 2）examine the central neural circuit that is activated by these primary afferent neurons 3）determine the ability of TRPM8 activation to modify their response properties, and 4）define their role in regulating lacrimation.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS9-2　小鳥の脳から学んだこと～異分野における生理学，歯学の活用事例

○奥村　　哲

静岡理工大　総合情報　神経行動

発話や構音機能は，咀嚼や嚥下とならぶ重要な口腔機能であり，顎顔面領域は，ヒトに特有な複雑なコミュニケーションのインターフェイスとなっている．しかし，複雑な音声コミュニケーションを行う動物種は少なく，この分野の研究のブレークスルーを阻む一因となってきた．そこで新たなモデル動物として，鳥類の活用を提案する．

鳴禽類の音声行動には，短い単音節からなるコールと，雄が雌にむかって囀る歌がある．歌は複数の音素が一定順に並ぶフレーズをもつが，なかでもジュウシマツの歌は特に複雑な音素列をもつ．講演者は，その音素列の生成規則（歌文法）がどのようにつくられているのか？を動物行動学，神経科学，構成論的手法などを用いて研究してきた．行動学的には，歌を生成するのに必須な順序規則の学習や，時間感覚を，どの程度後天的に学習できるかを調べている．神経科学的には，脳内の歌神経核間の相互接続について記載した上で，聴覚情報処理に関わる NIf 核と，感覚・運動情報を連合する HVC 核間のネットワークによって歌文法が生成されることを仮定して実験を行った．具体的には HVC の上流にある NIf の神経活動を，GABA アゴニストの局所潅流によって可逆的に抑制した．その結果，NIf の抑制は，音素間遷移パターンや系列のエントロピーを変化させることと，この変化は時間経過とともに回復することを観察した．さらに実際の解剖学的接続様式を反映したニューラルネットワークモデルを作成し，本実験で得られた文法変化を再現するパラメーターが存在するかを検討することで，作成したモデルの妥当性を構成論的に検証した．

サテライトシンポジウムでもあるので，当日は少し自由な視点で，異分野融合の面白さを紹介すると共に，歯学部で学んだことが，どうように役立っているのかにも言及したい．また卒研生と行っている咬合筋の筋電位の変化を用いたスイッチや，弓道行射中の脳波計測などの研究事例を紹介する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Lessons from singing birds, physiology and dentistry

○Okumura T

Lab Neuroethol, Fac Comprehensive Informatics, Shizuoka Inst Sci Engineering

Speech and communication are essential for human being and orofacial area plays important role in executing these functions. Among them, a speech requires abilities to learn and generate temporal sequences, in addition to fine control of articulation. The production of birdsongs, a process which involves complex learned sequences, provides researchers with excellent biological models for these topics. The Bengalese finch in particular learns a highly complex song with syntactical structure. This presentation will focus on（1）the existence of specialized neuronal circuits for singing behavior in songbirds and（2）the mechanisms by which neural circuits generate complex song note sequences. Especially, the contributions of the nucleus interfacialis（NIf）, an auditory relay nucleus, are introduced based on our biological data and model studies. These findings shall be used in many studies which elucidate etiology of stuttering and other speech disorders.

Finally, a brief summary of our recent studies including applications of switching devices controlled by facial EMG signals and EEG analysis during practice of Kyudo, Japanese art of archery, will be also introduced to exhibit how physiological techniques I had learned at dental school have been contributed to our researches.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS9-3　舌癌における初期癌性疼痛抑制機構

○古川　明彦[1]，篠田　雅路[2]，久保亜抄子[2]，本田　訓也[1,2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　口腔外科
[2]日本大　歯　生理

【緒言】口腔癌発症早期では自覚症状がほとんどないことが多い．しかし，そのメカニズムは不明である．今回われわれは，初期舌癌による疼痛抑制に対する末梢エンドセリンの役割について検討した．
【材料・方法】ラット由来扁平上皮癌（SCC）細胞を舌に接種し，舌癌ラットモデルを作成した（SCC接種群）．対照群はPBSを接種した．hematoxylin-eosin染色により舌腫瘍の組織学的変化を経日的に観察した．浅麻酔下にて，腫瘍部に機械刺激および熱刺激を与え各刺激に対する逃避反射閾値を測定した．また，SCC接種群において，舌へendothelin-A（ET-A）receptor antagonistまたは$\mu$-opioid receptor antagonistの持続的投与を行い，逃避反射閾値の変化を解析した．SCC接種群および対照群の三叉神経節における$\mu$-opioid receptor発現をwestern-blot法にて定量した．さらに，舌における$\beta$-endorphin発現をELISA法にて定量した．
【結果】SCC接種後，経日的に舌腫瘍の増大を認めた．舌への熱刺激に対する逃避反射閾値はSCC接種群および対照群共に変化はみられなかったが，SCC接種群において機械刺激に対する逃避反射閾値は，SCC接種11日目以降に有意な低下を認めた．ET-A receptor antagonistまたは$\mu$-opioid receptor antagonistの持続的舌投与によりSCC接種後6日目において，逃避反射閾値が有意に低下した．SCC接種群および対照群ともに三叉神経節における$\mu$-opioid receptor発現に変化は認められなかった．
【結論】以上の結果より，舌癌の初期癌性疼痛の抑制にはET-A receptorおよび$\mu$-opioid receptorを介したシグナルの関与が示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Tongue-cancer pain relief at early stage in rats

○Furukawa A[1]，Shinoda M[2]，Kubo A[2]，Honda K[1,2]，Iwata K[2]

[1]Dept Oral and Maxillofacial Surg, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

In many clinical cases, oral cancer patients do not complain of obvious pain at early stage. Due to the lack of pain at early stage, detection of oral cancer is sometimes delayed. It is necessary to detect oral cancer at early stage in order to treat cancer patients appropriately. To evaluate the mechanisms underlying tongue-cancer pain, we studied the involvement of endothelin in tongue pain associated with tongue cancer in rats. Squamous carcinoma（SCC）cells were inoculated into the tongue. PBS was used as a control. After SCC inoculation, tumor growth progressed over time. Head-withdrawal reflex threshold（HWRT）to mechanical but not heat stimulation of the tongue was significantly decreased on day 11 after SCC inoculation. HWRT to mechanical and heat stimulation of the tongue was not changed in control group. After SCC inoculation, the amount of $\beta$-endorphin and Endothelin-1 in tongue tissue is significantly increased in SCC-inoculated rats compared with PBS-inoculated rats on day 6. We also observed Endothelin A receptor expression in SCC-158 cells *in vitro*. The decrement of HWRT is significantly recovered in SCC-inoculated rats following ET-A receptor antagonist or $\mu$-opioid receptor antagonist into the tongue.
$\beta$-endorphin released from SCC cells by Endothelin-1 signaling may be involved in depress of tongue cancer-pain at early stage.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS9-4 エンドカンナビノイドによる自己増幅的甘味増強と T1R3-非依存的甘味受容経路の存在

○岩田　周介[1]，吉田　竜介[1]，重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]

[1]九大　院歯　口腔機能解析
[2]九大　味覚・嗅覚センサ研究開発センター

2-Arachidonoylglycerol（2-AG）や anandamide などのエンドカンナビノイド（eCB）は，甘味受容細胞に発現する cannabinoid receptor 1（CB1）を介し甘味応答を増大させる．中枢の神経細胞では，G 蛋白質共役型受容体（GPCR）の活性化により産生される Diacylglycerol（DAG）が Diacylglycerol lipase（DAGL）の働きにより加水分解され，2-AG が産生される．また，甘味受容細胞にも DAGL が発現することから，GPCR である甘味受容体 T1R2/T1R3 の活性化により 2-AG が産生される可能性が考えられる．すなわち，甘味刺激を繰り返すことにより 2-AG が産生・累積され，細胞周囲の 2-AG 濃度が上昇することにより CB1 を介した甘味応答の増強が生じるのではないかと推測される．本研究では，同一味物質による繰り返し刺激に対する味覚応答をマウス鼓索神経応答解析により調べ，この仮説を検証した．その結果，甘味物質（二糖類スクロース，人工甘味料 SC45647）の繰り返し刺激により神経応答の経時的な増強が認められたが，単糖類グルコースや甘味以外の味質（塩化ナトリウム，塩化カリウム，塩化水素，塩酸キニーネ，グルタミン酸カリウム）による繰り返し刺激ではこの効果は認められなかった．甘味物質の繰り返し刺激による神経応答の経時的増強は，CB1 阻害剤である AM251 で阻害され，T1R3 ノックアウトマウスでは認められなかった．興味深いことに，甘味刺激に対する神経応答の経時的増加はアンギオテンシンⅡ（Ang Ⅱ）の投与により増強された．この Ang Ⅱの効果は，AT1 阻害薬である CV11974 投与により消失した．これらの結果から，甘味の繰り返し刺激により，甘味受容細胞において CB1 を介した自己増幅的な応答増強が生じ，Ang Ⅱがその効果を増強する可能性が示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Endocannabinoid-inducing self-amplification of sweet taste sensitivity and the possible existence of T1R3-independent sweet transduction pathway

○Iwata S[1]，Yoshida R[1]，Shigemura N[1]，Ninomiya Y[1,2]

[1]Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch Dent
[2]R&D Center for Taste and Odor Sensing

2-Arachidonoylglycerol（2-AG），one of endocannabinoids（eCBs），enhances responses of sweet-sensitive taste cells via activation of the cannabinoid receptor 1（CB1）. 2-AG is synthesized through hydrolyses of diacylglycerol by diacylglycerol lipase（DAGL）in the GPCR-phospholipase cascade. We recently found that DAGL is expressed in T1R3-positive taste cells, suggesting a possibility that T1R2/T1R3 activation by sweet compounds leads to generation of 2-AG and enhancement of sweet taste responses. To test this possibility, we investigated potential effects of repeated taste stimulations with a single taste compound on responses of the mouse chorda tympani（CT）nerve. The results indicated that CT nerve responses to sweeteners but not to other tastants were gradually increased by repeated stimulations. Such effect was not observed in T1R3 knockout mice and was inhibited by CB1 blocker AM251. Interestingly, intravenous injection with Angiotensin II（AngII）also showed such increase of sweet taste response by repeated stimulations. Blocking of AngII type1 receptor by an antagonist, CV11974, inhibited the AngII's effects. Taken together, our results suggest that the repeated T1R2/T1R3 activation leads to generation of 2-AG, which enhances sweet taste responses by acting on CB1 expressed in sweet sensitive taste cells. AngII may cooperatively act on this endocannabinoid sweet-enhancing effect.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS9-5　嚥下時における口腔感覚の変調

○酒井　翔悟，辻　　光順，真柄　　仁，辻村　恭憲，井上　　誠

新潟大　院医歯　摂食嚥下リハビリ

【背景・目的】我々の過去の研究から，低閾値誘発性の開口反射が上喉頭神経（SLN）を刺激して嚥下を誘発させた際に抑制を受けること，この抑制メカニズムが嚥下中枢に関与する可能性があることが示されてきた．今回は，開口反射誘発に関わる口腔感覚入力の嚥下時変調メカニズムについて，三叉神経核や上行する神経路に対してどのような影響をもつかについてさらに詳細に検証したので報告する．
【方法】実験にはウレタン麻酔下の雄性ウサギ(2.5-3 kg，日本白色種)を使用した．嚥下誘発のためにSLNに連続電気刺激（30 Hz，パルス時間0.2ミリ秒）を行った．SLNへの刺激は10秒間で1度嚥下が生じる強度を1Tとして，1-4Tの刺激強さを用いた．開口反射の誘発を確認するために顎二腹筋，嚥下反射記録のために顎舌骨筋にそれぞれワイヤー電極を係留し，筋活動電位を導出した．下歯槽神経（IAN）の電気刺激（単発，パルス時間0.2ミリ秒，2 Hz）に応答する三叉神経核および視床の単一ニューロンを同定後，IAN単発刺激10秒間，IANとSLNの同時刺激10秒間，再度IANの単発刺激10秒間を行って，SLN刺激前・中・後での単一ニューロン活動を比較した．三叉神経核ニューロンについては，記録部位への直接電気刺激（単発，パルス時間0.2ミリ秒）した際の顎二腹筋筋活動の有無を確認した．記録部位は記録終了後に電気凝固し，組織学的に確認した．
【結果および考察】IAN刺激に応答する三叉神経核および視床の単一ニューロン活動は，SLN 2T・4T刺激中および刺激後に消失するものが観察され，潜時は延長する傾向を認めた．単一ニューロンの記録部位は，三叉神経主感覚核および脊髄路核吻側亜核，視床後内側腹側核群に限局していたことが確認された．以上より，嚥下を誘発する強度でSLNを刺激した際には，開口反射の抑制のみならず，大脳皮質へ伝達される口腔感覚入力も抑制されることが示唆された．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The modulation of oral sensory transmission during swallowing

○Sakai S，Tsuji K，Magara J，Tsujimura T，Inoue M

Dept Dysphagia Rehab, Niigata Univ Grad Sch Med Dent

Introduction: The aim of the present study was to investigate the possible neuronal mechanisms for the modulation of oral sensory transmission during swallowing evoked by electrical stimulation of superior laryngeal nerve（SLN）in anesthetized rabbits.
Materials and Methods: Experiments were carried out on rabbits anesthetized with urethane. Single unit responses evoked by the electrical stimulation of the inferior alveolar nerve（IAN）were recorded in either the trigeminal or thalamic nucleus. To evoke the swallowing reflex, SLN was stimulated and current intensity for SLN stimulation was set between 1 and 4 times of the threshold for evoking the swallowing reflex in 10 seconds. Activation of single neurons in either investigated area was compared between with and without SLN stimulation. Recording sites in central regions were histologically identified.
Results & Conclusion: 1. Responses of most neurons recorded in both the trigeminal and thalamic nuclei were inhibited during 2 or 4 times SLN stimulation.
2. Recording sites of the neurons were identified in the main sensory trigeminal nucleus and subnucleus oralis of the spinal trigeminal tract in the trigeminal nuclei and nucleus ventralis posteromedialis in thalamus.
3. Current results suggest that the transmission of oral sensation including ascending pathway is modulated during SLN-evoked swallowing.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS10　歯の形態とその変異を考察する

○近藤信太郎[1]，真鍋　義孝[2]

[1]日大松戸歯　解剖Ⅰ
[2]長崎大　院医歯薬　顎顔面解剖

歯の形態はいろいろな手法によって表現されてきた．一般的な方法は以下の２つである．(1)シャベル型切歯やカラベリー結節などの歯冠形質を段階的な尺度によって，その発達程度を表現し，得られたデータを質的変数として分析する方法．(2)歯冠近遠心径や頬舌径などの歯冠最大径をノギスで計測し，計測値を量的変量として分析する方法．これらの方法は古典的な方法であるが，いずれも歯の形態学や歯科人類学において大きな実績を残してきた．
上顎切歯舌側面窩の深さを計測することによってシャベル型切歯を，規格写真によって咬合面の面積を計測することによってカラベリー結節を量的変量として分析する方法も考案された．つまり，一部の歯冠形質は定量的に分析することができる．一方，大臼歯サイズの順位性のように歯冠サイズを質的変量として分析した研究も見られる．咬頭面積，咬頭頂間距離，咬頭径などを計測することによって大臼歯の咬合面形態の詳細な検討も行われてきた．その後，モアレトポグラフィや光学的なセンサーによって歯冠の三次元形態が記載されるようになってきた．最近はマイクロ CT による歯の内部の形態や幾何学的形態計測による形そのものの計量化が試みられるようになってきた．
本シンポジウムでは伝統的な方法と最新の方法による歯の形態表現の比較，また，それぞれの方法によって形態変異がどのように捉えられるかを，若手・中堅の研究者によって話題を提供いただき，歯の形態とその変異について考察したい．
【利益相反】著者には利益相反はありません．

## Analytical method and its interpretation of variation in tooth morphology

○Kondo S[1]，Manabe Y[2]

[1]Dept Anat, Sch Dent at Matusdo, Nihon Univ
[2]Dept Oral Anat Dent Anthropol, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ

The tooth form has been expressed by various methods. Following two methods did the largest contribution in the fields of tooth morphology and dental anthropology.（1）The tooth crown variants, for example shoveling and Carabelli trait, are scored based on the standard plaques, and the data are analyzed as qualitative variables, i.e., non-metrical variation in tooth morphology.（2）The external diameters of tooth crown are measured by caliper, and obtained measurements are analyzed as quantitative variables. More detailed two-dimensional structure of the tooth crown is analyzed by the measurement on the standard photograph. The three-dimensional crown form is measured by moire topography and an optical sensor. Recently internal tooth structure can be analyzed by micro CT, and geometric morphometrics is new method to quantify form. In this symposium, we want to compare the expression of the tooth form and size by traditional and recent methods, and also discuss morphological variation of tooth.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS10-1　南太平洋集団における第三大臼歯のサイズと変異

○松野　昌展，近藤信太郎

日大松戸歯　解剖Ⅰ

【目的】現代人の第三大臼歯は矮小化や未萌出，欠如など変異に富む歯である．未萌出や欠如に関しては報告が見られるが，大きさの変異に関する報告は少ない．そこで日本大学松戸歯学部に所蔵されている現代南太平洋集団の上下顎 M3 のサイズを計測し，集団内，集団間の変異を調査した．
【方法】フィジー（大学生，成人），サモア，パプアニューギニアの成人の歯列石膏模型で上下顎 M1，M2，M3 をデジタルノギスにて近遠心径と頬舌径を計測した．計測値を基に性差，集団間差，他大臼歯との比較などを分析した．
【結果】ほとんどの集団の計測値で M1，M2 には有意な性差が認められたが，M3 では性差は認められなかった．集団間差では男性ではパプアニューギニアの下顎頬舌径が他集団より有意に小さかった．女性ではフィジー成人の上顎頬舌径がサモア，パプアニューギニアより有意に大きかった．他大臼歯との比較では上顎ではほとんどの集団の近遠心径で M1 との有意差が認められたが，頬舌径は M2 との有意差が認められる傾向にあった．下顎では有意性が認められる集団が少なかった．平均値の傾向として上顎の近遠心径はすべての集団で M1，M2，M3 の順に小さくなっていたが，下顎は M2 よりも M3 の方が大きくなる集団があった（フィジー成人男性，サモア男女）．上顎の頬舌径はすべての集団で M2 が最も大きかったが，下顎は M1 より M2 の方が大きい集団が半数であった（フィジー成人男女，学生女性，サモア男性）．
【考察】上顎大臼歯では近遠心径は遠心ほど小さくなり，頬舌径は M1，M2 と大きくなるが M3 で小さくなるという傾向が全集団に認められたが，下顎は一定ではなかった．歯種間における関係を個人レベルで解析し，第三大臼歯の変異についてさらに検討を進める．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Size and variation of the third molar in the South Pacific populations

○Matsuno M，Kondo S

Dept Anat I, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Third molars of modern people have a variant, such as microdont or non-eruption and lack. We have measured maxillary and mandibular the size of the third molars of modern South Pacific population plaster model that are collections in the Nihon University School of Dentistry at Matsudo. And we investigated the variation of the third molars.
Samples Fiji（college students, adult）, Samoa and Papua New Guinea（PNG）adult, ware dental plaster model. Mesiodistal diameter and buccolingual diameter were measured with a digital caliper.
Significant Sex difference was observed in the measured value in M1, M2 of most of the population. However, M3 was no significant sex difference in most of the population. The mandibular buccolingual diameter of PNG was significantly smaller than the other population in male. The maxillary buccolingual diameter of Fiji adults was significantly larger than Samoa and PNG in female. In comparison with other molars, in mesiodistal diameter of most of the population, there was a significant difference between the M1 and M3. However, buccolingual diameter tended to be observed significant difference between the M2 and M3.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS10-2 永久歯が小さい集団は乳歯も小さいのか?―永久歯と乳歯の大きさによる集団比較

○北川　賀一，真鍋　義孝，小山田常一

長崎大　院医歯薬　顎顔面解剖

人類の歯の大きさには地理的変異や時代変化が認められ，人類集団の系統関係を論ずる際にも少なからず影響を与えてきた．身近なところでは現代日本人の起源に関する論議において，縄文人の歯が現代日本人や渡来系弥生人よりはるかに小さいという Brace & Nagai（1982）の指摘は，我々が縄文人直系の子孫ではないという主張の一翼を担った．
著者は東アジアの集団を中心に，永久歯だけでなく乳歯についても調査をおこなってきた．今回，永久歯だけでなく乳歯の大きさで集団比較をすると，どのようなことがわかるのか，紹介したい．
日本の各時代の集団（縄文，在来系弥生，渡来系弥生，古墳，中世，江戸，現代）と中国新石器大汶口期北阡（山東省）と春秋戦国期新鄭（河南省）の永久歯，乳歯の大きさを比較した．
その結果，
1. 縄文系（縄文，在来系弥生）の乳歯は渡来系弥生と同じくらいで小さくない．すなわち，乳歯と永久歯の比率でいうと，縄文系は乳歯が大きい．さらに，永久歯を形成時期の早い歯（I, M1）と遅い歯（C, P, M2）に分けると，形成時期の遅い歯ほど縄文は小さい．
2. 中国の 2 集団は，新石器北阡は相対的に乳歯が大きく縄文に似るが，春秋戦国期新鄭は渡来系弥生以降の日本人に似て乳歯が小さい．
3. 中国新石器北阡は，頭蓋骨などの調査や歯の非計測的形質では縄文とは似ていない．両者の相対的に乳歯が大きいという共通点は，系統関係ではなく，生業形態や離乳時期などの類似性に由来する可能性が考えられる．
永久歯だけでなく乳歯を調査することにより，それぞれの集団の生活史（Life History）を検討に加えることが出来るのではないかと思われる．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Dental size variation observed in deciduous and permanent dentitions among prehistoric and modern Japanese

○Kitagawa Y，Manabe Y，Oyamada J

Dept Oral Anat Dent Anthropol, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ

After Brace & Nagai（1982）, many investigators paid a lot of attention for permanent tooth size of inhabitants of Japan, but little is known for deciduous tooth.
We compared deciduous and permanent tooth size among the following samples.
Japan: Neolithic Jomon, Tanegashima Yayoi, Yayoi Immigrants, Kofun, Medieval, Edo, Modern Japanese
China: Neolithic Beiqian（Shandong）, Spring-Autumn & Warring States Xinzheng（Henan）
As a result,
1. The deciduous tooth size of the Jomon and Tanegashima Yayoi is about the same as Yayoi Immigrants. Therefore, the Jomon has relatively large deciduous tooth in the ratio of permanent tooth. Moreover, they have smaller teeth in later developing permanent teeth（C, P, M2）than in earlier developing teeth（I, M1）.
2. Neolithic Beiqian has relatively large deciduous tooth just like the Jomon, but the Spring-Autumn & Warring States Xinzheng's deciduous tooth is small like the Yayoi Immigrants and modern Japanese.
3. Neolithic Beiqian does not resemble the Jomon in the osteological and dental nonmetric traits analysis. Relatively large deciduous teeth in both populations may be come from a similarity in life history, e.g., timing of weaning.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS10-3　エナメル象牙境とエナメル質外表面の形態的相関度

○森田　　航

北大　院歯　口腔機能解剖

歯は硬く，化石や古人骨試料として遺存しやすいため，観察される形態変異を元に集団の類縁関係や系統関係の復元がなされてきた．だが，エナメル質外表面（OES）の形態は咬耗などにより，系統関係の推定に有用な本来の形質が観察できないことも多い．近年，μ-CT 技術を用いることで歯の内部構造を調べることが可能となってきた．得られた断層画像を再構成することで 3 次元的な形状を視覚化し，より精度の高い形態解析を行うことができる．歯の内部構造であるエナメル象牙境（EDJ）は発生過程における基底膜の形態を表すとされ，そこから外側にエナメル質が沈着することにより OES が形成され，歯冠は完成する．EDJ の形態は祖先的な形質を多く保持し，系統関係の復元のための良い指標であるとされてきた．だが，実際に咬合時に機能する OES と，EDJ の形態がどの程度形態が相関するのかは，咬合面の複雑な形状を定量化するのが難しいために，十分な研究が行われていない．またエナメル質形成による形態の変更度合いも，エナメル質の厚さや形成スピードなどにより異なる可能性が指摘されている．本研究では，μ-CT で撮影した断層画像から歯の 3 次元モデルを再構成し，幾何学的形態測定法により 3 次元形状の定量化と視覚化を試みる．試料として，形態的に類似しているがエナメル質沈着の量，期間，スピードの異なるヒト上顎第二乳臼歯と第一大臼歯を用い，EDJ と OES の 3 次元的な形態的相関度と形状変化の程度を検討する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Morphological covariation between enamel-dentine junction and outer enamel surface

○Morita W

Dept Oral Functional Anat, Grad Sch Dent Med, Hokkaido Univ

Studies of hominoid evolution and reconstruction of phylogenetic relationships have relied heavily on fossil and archaeological tooth remains. However, dental wear makes it impossible to observe inherent characters. Recent μ-CT dental analyses have revealed that crown morphological traits of the enamel-dentine junction (EDJ) are modified or masked by the process of enamel deposition, and that the extent of modification varies, depending, in part if not totally, on the enamel thickness. So far researchers have explored to what extent enamel formation influences the crown morphology by comparing EDJ with the outer enamel surface (OES). However, these studies mainly have focused on discrete dental traits. Although a few studies have tried to evaluate general morphological differences between EDJ and OES quantitatively, their complex topography has not been clarified in detail. Thus, in the present study, three-dimensional EDJ and OES models reconstructed from unworn teeth were quantified and visualized using geometric morphometric methods. We sampled human maxillary first permanent molar and second deciduous molars that have enough data on enamel formation, such as the rate, period and initiation/cessation timing. Comparing these teeth enables us to understand the effects of pattern of enamel formation on morphological change caused by enamel formation.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS10-4　非侵襲的方法による歯の内部構造の把握と教育への応用

○加藤　彰子[1]，Alexander Ziegler[2]

[1]愛院大　歯　口腔解剖
[2]ボン大　動物

歯の解剖学は，歯科基礎教育の中でも根幹を成す重要な学問である．また，適切な歯冠修復処置や歯内治療を行なうためには，歯の正常な肉眼的形態を正確に理解しておかなければならない．そのため従来から，様々な方法を用いて歯の形態とその解剖についての研究が行われてきた．歯の表面に現れる形質を記述し，歯の大きさや形の計測を行い，抜去歯のスケッチや写真撮影，または歯の組織切片の観察などによりその細部形態の把握や変異を記録してきた．観察対象物を直接手で触れて，形態を把握するというこれらの方法は，解剖学を学ぶ上での基本をなし，決して省略されうるものではない．一方，近年のデジタル画像技術の進歩により，これまでその全体像を捉えることが容易ではなかった試料の内部構造を非侵襲的に把握することが可能となり，3 次元構造を迅速かつ直感的に理解することができるようになった．また比較的短時間でデータ収集が可能で，3 次元データの操作性の良さや形状データを配布できることから，歯科教育への活用が期待できる．本口演では，マイクロフォーカス X 線 CT（マイクロ CT）を用いたヒトの歯の 3 次元内部構造の把握と歯の解剖学教育への応用について述べる．我々はこれまでに正常な根管を有する下顎大臼歯および樋状根管を有する下顎大臼歯の 3 次元モデルを作成し，これらのモデルや動画像を埋め込んだ教材を作成した．さらに，歯髄腔形態のより実際的な把握を目的として，天然歯形状データを基に造形装置を活用した歯の模型作成について述べる．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Non-invasive imaging of internal tooth structure in humans: applications in dental education

○Kato A[1]，Ziegler A[2]

[1]Dept Oral Anat, Sch Dent, Aichi Gakuin Univ
[2]Inst Zool, Univ Bonn

Providing a comprehensive knowledge of the anatomy of the human tooth is an important component of basic dental education. Especially so, because a thorough understanding of the gross morphology of the tooth constitutes a prerequisite for successful crown restoration or root canal therapy. Over time, various non-digital techniques have been employed to study tooth morphology and anatomy. For example, these methods include the documentation of traits appearing on the surface of the tooth, measurements of tooth size and shape, drawings and photographs of extracted teeth, or observations of histological tooth sections. These methods are essential and never omissible for anatomical education. While, digital imaging and visualization techniques now allow non-invasive observation of the three-dimensional（3D）structure of the human tooth. Due to the relative ease of data acquisition, handling, and distribution, digital methods are poised to significantly influence dental education. Here, we present results derived from several micro-computed tomography（$\mu$CT）scans performed on extracted human teeth. Based on these digital data, interactive 3D models were generated that can be embedded into document. We provide several examples for and discuss the advantages of the integration of virtual 3D models into dental education.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS11-1　咬筋の発達における血管関連因子からみた筋細胞と間葉系細胞のダイナミクス

○春原　正隆，佐藤　　巌

日本歯大　生命歯　解剖 1

筋の発達と形態形成に関与すると考えられる種々マーカー間の相関や意義を解析するためにクラスター分析による同定解析法を用いて血管関連因子間の意義について解析を行った．本来，筋の発達初期や形態形成期にはいくつかの成長因子や形態形成マーカーの存在が知られている．しかし，胎生後期や生後における咬筋では，筋分化促進マーカーや阻害マーカーとの関係，さらには，神経，血管，リンパ管，腱，さらにはミオシン重鎖（MyHCs）など多数の因子間マーカーとの関連を解析することが必要となるため，生体における咬筋の研究を一層難しいものとしている．特に，食性変化や出生後のストレスなどの内的外的因子の有無も筋の機能解析を困難にしている原因の一つと考えられている．近年，免疫染色等のタンパクレベルでの評価のスコア化の必要性や，ターゲット部位の信頼度の問題（スプライシングバリアント）が指摘されることもあり，mRNA レベルでの再評価法が見直されてきている．そこで，本報告ではマウス咬筋において①胎児期②吸啜期③咀嚼期など生理的変化が著しい 3 つの時期に起こる咬筋内の変化をリアルタイム RT-PCR，ELISA 等（一部のマーカーのみ）を用いて，前述の種々マーカー間の相関を調べ，筋の血管再生促進，抑制，血管収縮因子の動態からみた筋細胞と間葉系細胞の評価を試みたいと考える．具体的には血管内皮増殖因子（VEGF）を基軸として MMP, TR$\alpha$，MSTN，FGF6，TGF-$\beta$1，コラーゲン I，オステオカルシン，コンドロモジュリン，DMP1, tenomodulin，さらには MyHCs（slow, type I, $II_a$, $II_b$, $II_x$）等の mRNA 発現状況を調べ，咬筋発達の各時期における種々のマーカー間の相関や意義から咬筋の発達における血管再生促進，抑制，血管収縮因子の動態からみた筋細胞と間葉系細胞の接点に関し提言できれば幸いである．

【利益相反】なし

## Dynamics of vessel related factors of muscle and mesenchymal tissue in the development of masseter muscle

○Sunohara M，Sato I

Dept Anat, Sch Dent, The Nippon Dent Univ

We have performed identification analysis method by cluster analysis in order to analyze various markers in muscle development and morphogenesis. During the period of early development and morphogenesis of muscle, it is well known the presence of several markers. However, there are various makers for nerves, blood vessels, lymphatic vessels, tendons and myosin heavy chain（MyHCs）in the masseter muscle development. In particular, it is the presence of internal and external factors may make difficult to functional analysis in masseter muscle during the stress after birth and feeding change. The detection of protein level for immunostaining is shunned from such reliability of the target site（splicing variant）, re-evaluation at the mRNA level have been reviewed. We analyze three stages such as ①fetal period, ②sucking period and ③masticatory period of masseter muscle of the mice. We also examined the masseter muscle by the real-time RT-PCR, ELISA, to analyze the correlation between the various markers in masseter muscle. We analysed MMP, vascular endothelial growth factor, MyHCs and other markers during the development of masseter muscle. These dynamics of vasculogenesis markers analysis may give a useful information about a contacts of the cell.

***Conflict of Interest:***none

## SS11-2 筋-骨付着部形態形成を筋特有タンパクが誘導する？～胎児標本を用いた発生・形態学的研究成果からの示唆～

○山本　将仁

東歯大　解剖

一塊の細胞群として発生した咀嚼筋は，下顎骨が形成される部位へ移動することが知られている．これまで我々は，筋-腱接合部の形成と筋移動の開始時期が一致することを見いだした．またその中で，筋特異的タンパクである desmin の集積が，筋-腱接合部形成に関与することも明らかにした．しかしながら，形成過程の下顎骨に咀嚼筋が付着するプロセスについては，不明な点が残されている．そこで今回は，集積する desmin をマーカーとして，咀嚼筋の下顎骨への付着プロセスを形態学的に検索した．

胎生 12 日において咀嚼筋群は個々の筋へと分化を開始した．胎生 13 日になると，下顎骨はメッケル軟骨を取り囲むように形成され，咬筋，内側翼突筋は付着位置に向けて伸長を開始した．また，外側翼突筋は回転し，将来の下顎頭が形成される位置へと移動していった．胎生 14 日になると，下顎頭と筋突起軟骨が形成を開始し，外側翼突筋と側頭筋の付着部が軟骨細胞に接する様子が確認できた．この時期において内側翼突筋は，メッケル軟骨と幼弱な下顎骨の両方に接触していた．胎生 15 日になると内側翼突筋はメッケル軟骨から離れ，下顎骨のみと接するようになった．また，この時期からメッケル軟骨は消失しはじめ，下顎骨がより成熟していった．

研究結果より，内側翼突筋のみ，メッケル軟骨に向けて伸長した後下顎骨に付着することが分かった．したがって，咀嚼筋は，①メッケル軟骨が足場となり，その後の付着位置を下顎骨に変化させる，②下顎骨に直接付着する，という 2 つの付着プロセスを持つことが明らかになった．

以上より，内側翼突筋がメッケル軟骨から離れることがメッケル軟骨消失のきっかけになること，さらには全ての咀嚼筋の下顎骨への付着が骨の成長を促進させる可能性が示唆された．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Formation of the muscle-bone attachment in the craniofacial region

○Yamamoto M

Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Current consensus is that the myotendinous junction first becomes detectable when the masticatory muscles first extend to the immature mandible. However, little attention has been given to the process by which these muscles become attached to the bone in the embryonic period. The purpose of this study was to determine how the immature masticatory muscles become attached to the developing mandible by examining early accumulation of desmin in the myotendinous junction. At embryonic day（ED）13, the masseter and medial pterygoid muscles（MPM）began to extend to the mandible, which was formed from the surrounding Meckel's cartilage. The lateral pterygoid muscle（LPM）revolved toward the region of the future condylar process. At ED 14, the condylar and coronoid cartilages were first detected above Meckel's cartilage. The LPM（temporalis）became attached to the condylar（coronoid）cartilage. At this point, the MPM became attached to both the mandible and Meckel's cartilage. At ED 15, all of the masticatory muscles contacted only the mandible. The results of this survey indicate that the process of attachment of masticatory muscles to the mandible has two patterns: some masticatory muscles become attached to the mandible after making contact with Meckel's cartilage, whereas others become attached directly.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest with this manuscript.

## SS11-3　癌が舌筋の形態や特性に与える影響

○崎山　浩司[1]，瀧澤　将太[2]，坂東　康彦[1]，坂下　　英[1,2]，天野　　修[1]

[1]明海大　歯　解剖
[2]明海大　歯　口外Ⅱ

口腔癌の好発部位である舌は，ほとんどが骨格筋で構成されているにもかかわらず，舌癌は組織学的には扁平上皮癌であることが多い．舌癌となった部位の切除は，咀嚼障害，構音障害，嚥下障害を引き起こす原因となり，人体に多大な影響を与える．それゆえに，癌の発生や浸潤，転移といった癌のメカニズムについての研究は盛んであるが，我々はこれまで，細胞内でDNAの立体構造維持に重要な役割をもつhigh mobility group box 1（HMGB1）に着目し，筋組織への癌浸潤や転移へのメカニズムについて検索を行った．
また，骨格筋は様々な外的因子の影響を受けることにより，性質を変えることが知られることから，舌筋が癌細胞の存在により，どのような影響を受けるのかについても解析した．舌癌モデルマウスを作成するため，マウス舌筋に扁平上皮癌であるSCC7細胞を移植した．
舌癌の周囲および舌癌から遠位にある筋組織にどのような影響があるかHMGB1およびHMGB1の受容体であるreceptor for advanced glycation endproducts（RAGE），そしてミオシン重鎖の分布について免疫組織化学的に検索した．その結果，舌癌発症部位よりも舌尖側では，筋束構造が破壊されて筋線維間隙が増大した癌周囲の筋線維で，HMGB1およびRAGEの発現を認めた．
舌癌発症部位すなわち舌中央部では，癌組織およびその周囲筋線維でHMGB1およびRAGEの発現を認めた．
これらのことから，癌細胞から放出されたHMGB1によって，癌細胞の周囲に筋線維間隙が形成されたと考えられた．また，HMGB1によって壊死を起こした筋線維によって，さらに多量のHMGB1が放出されたため，癌組織部と隣接しない部位にも影響を与えた可能性を示唆した．さらに，筋線維の性質においては，舌筋は元来速筋タイプであるが，発生時によくみられる遅筋タイプへ変化したことから，癌組織が周囲の筋組織を破壊したため，筋線維が再生を促すために変化したのではないかと示唆された．
【利益相反】著者は利益相反状態ではありません．

## The change of the form and characteristics of the tongue muscle adjacent to the tongue cancer.

○Sakiyama K[1]，Takizawa S[2]，Bando Y[1]，Sakashita H[1,2]，Amano O[1]

[1]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div Oral Surgery II, Meikai Univ Sch Dent

It is reported that predilection sites of oral cancer is the tongue. Then, the partial resection of tongue cancer causes dysmasesis, dysarthria and dysphagia.
In this study, we focused on the HMGB1（high mobility group box 1）which is important in maintenance of three-dimensional structure of DNA in cells and its receptor RAGE（a receptor for advanced glycation end products）. We analyzed the mechanism of the cancer invasion and metastasis to the muscle tissue. In addition, we analyzed the change of the characteristics of tongue muscle when the cancer cells were present, because the muscular properties are modified by external factors.
First, SCC7 cells were injected into the mouse tongue in order to create the tongue cancer model. HMGB1 and RAGE were expressed in peri-cancerous myofibers with wide gaps by destroyed bundle structure in the portions within and outside the cancer. HMGB1 that released from cancer cells was suggested to form the muscle fibers gaps around the cancer.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS11-4　口腔粘膜上皮シートをハイブリッドさせる事で得られる重層化筋芽細胞シート

○比嘉　一成[1]，山根　茂樹[2]，梅澤　貴志[2]，芹川　雅光[2]，島﨑　　潤[1]，阿部　伸一[2]

[1]東歯大市川病院　眼科／角膜セ
[2]東歯大　解剖

細胞シート工学の進歩に伴い，現在，失った筋機能を再生させるための様々な研究が進められている．重症心筋症においては，心筋細胞シートや骨格筋細胞シートを移植する臨床研究も行なわれている．口腔内には，さまざまな機能を持った多くの筋組織が存在しているが，一度その筋組織を失うと嚥下，咀嚼といった複雑な機能の回復は困難である．機能を発揮する骨格筋を再生させるためには，まず 3 次元的に組織を構築させる必要がある．骨格筋筋芽細胞は 2 次元的なシート状に培養することは可能であるが，3 次元的に構築することはかなり難しいのが現状である．我々はこれまでに角膜上皮再生における培養角膜上皮シートならびに口腔粘膜上皮シートの作成と移植の技術を構築してきた．現在我々はこの培養技術を応用して，口腔内に移植することが可能な骨格筋筋芽細胞シートの開発を行なっている．近年行なった我々の研究ではウサギ口腔粘膜の上皮，間葉，筋の 3 層構造を呈する口腔粘膜組織に類似したハイブリッドシートを作成することによって，その筋層が 3 次元的に重層化することを見いだした．そのメカニズムついては現在検討中であるが，筋芽細胞や上皮細胞を重層化や 3 次元的に構築させる過程において，共培養する間葉系細胞が極めて重要な役割を果たすと考えている．本講演では，角膜の再生で培ってきた培養上皮シート技術を踏まえ，我々が取り組んできた筋シート作成で得られた，これまでの知見についてご紹介したい．

【利益相反】なし

## Stratified myoblast sheets obtained by creating hybrid of oral mucosal epithelial sheets

○Higa K[1]，Yamane S[2]，Umezawa T[2]，Serikawa M[2]，Shimazaki J[1]，Abe S[2]

[1]Dept Ophthalmol/Cornea Center, Ichikawa General Hosp, Tokyo Dent Coll
[2]Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Due to advances in cell sheet engineering, various studies for regenerating lost muscle function are currently underway. In cases of severe cardiomyopathy, clinical studies to implant cardiomyocytes or myoblast cell sheets have been done. There are many muscle tissues with various functions in the oral cavity. Once muscle tissue is lost, the recovery of complex functions like swallowing or chewing is difficult. In order to reproduce the skeletal muscles to perform the functions, it is first necessary to construct three-dimensional tissue. Although it's possible to culture two-dimensional skeletal muscle myoblast cell sheets, construction of 3D skeletal muscle myoblast cell sheets is really difficult at the moment. We have been working on the technology, development and implantation of cultured corneal epithelial sheets and oral mucosa epithelial sheets for corneal epithelial regeneration. By applying these technologies, we are currently developing transplantable myoblast sheets which can be implanted in the oral cavity. In our recent studies, we found that myoblasts became 3D stratified by constructing hybrid sheets made up of three-layers (epithelial, mesenchymal and muscular layer) similar to oral mucosal tissues found in rabbits. This research is under development, and we believe that co-cultured mesenchymal cells have an essential role to play in the process of stratification or 3D-construction of epithelial cells or myoblasts. In this lecture we would like to show our current findings from researching myoblast sheet creation, based on cultured epithelial cell sheet technology, for corneal epithelial regeneration.

***Conflict of Interest:*** None

## SS12-1　オーバービュー：DSPP を形態と機能から考える

○山越　康雄

鶴見大　歯　分子生化

象牙質を構成する有機質は約 90%がコラーゲンで，残りを非コラーゲン性タンパク質(NCP)で占める．NCP のうち最も多く含まれるのが象牙質シアロリンタンパク質(DSPP)由来のタンパク質である．ブタ DSPP は象牙芽細胞で合成・分泌後，骨形成タンパク質 1，マトリックスメタロプロテアーゼ 2 および 20 により，象牙質シアロタンパク質(DSP)，象牙質糖タンパク質(DGP)，象牙質リンタンパク質(DPP)の 3 つのタンパク質にプロセシングされる．DSP は共有結合性の二量体を形成し，アスパラギン酸結合型(N 型)糖鎖とコンドロイチン 4 および 6 硫酸鎖を含むプロテオグリカンである．また DGP は N 型糖鎖とリン酸基を含むリン酸化糖タンパク質である．さらに DPP は約 80%がセリンとアスパラギン酸で構成され，セリンの約 70～80%がリン酸化されている強酸性タンパク質である．その偏ったアミノ酸組成のため，構造にはセリン-アスパラギン酸の繰り返し配列が多く存在し，それに依存した遺伝子多型が見られる．DSPP 遺伝子は象牙質形成不全症および象牙質異形成症を引き起こす原因遺伝子であり，それゆえにこのタンパク質の研究は象牙質形成機構を解明するための重要テーマであった．加えて近年の象牙質および歯周組織再生研究においても DSPP は不可欠なタンパク質である．本サテライトシンポジウムでは，DSPP の形態および機能を理解することで，DSPP の基礎研究から将来の臨床応用に展開するためのアイデアが得られることを期待する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Overview: Think about DSPP study through morphological and functional perspectives

○Yamakoshi Y

Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Porcine dentin sialophosphoprotein（DSPP）is the most abundant non-collagenous protein in dentin. It is processed by proteases into 3 independent proteins: dentin sialoprotein（DSP）, dentin glycoprotein（DGP）, and dentin phosphoprotein（DPP）. Porcine DSP forms covalent dimers and is a highly glycosylated proteoglycan containing both chondroitin-4- and -6-sulfate chains. The DGP has so far been characterized in pig and has a single N-glycosylation and 4 phosphoserines that are associated with the binding for hydroxyapatite. DPP is the highly phosphorylated carboxyl-terminal domain of DSPP. The coding region of DPP varies in length among different individual pigs. Genetic studies have shown that *DSPP* mutations can cause dentin dysplasia and dentinogenesis imperfecta. Therefore, the study of DSPP has been very important to understand the dentin formation. So far, some of morphological and functional studies have reported that（1）DSP regulates the initiation of dentin mineralization and DPP controls the maturation of dentin,（2）DSP has potential roles for inducing human dental periodontal ligament stem cell and mouse dental papilla mesenchymal cell differentiation and mineralization, and（3）the expression of DSP mRNA coincides with odontoblast secretory activity and dentin matrix deposition. We would like to discuss more about DSPP study in this satellite symposium.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS12-2 歯髄および象牙質中のDSPP由来タンパク質～ 遺伝子発現と機能について ～

○山本　竜司

鶴見大　歯　分子生化

ブタ象牙質シアロリンタンパク質(DSPP)は，象牙質シアロタンパク質(DSP)，象牙質糖タンパク質(DGP)，象牙質リンタンパク質(DPP)の3つのタンパク質から構成される．DSPP遺伝子は5つのエクソンから構成されるが，ブタおよびヒトにおいては少なくとも2つのmRNAバリアントが存在する．一つはDSPP全長体をコードし(DSPP mRNA)，もう一つはイントロン4に含まれるポリAシグナルの利用によりDSPのみのバリアントをコードする(DSP-only mRNA)（DGP，DPPはエクソン5からコードされる)．我々は歯髄先端部，本体部，象牙芽細胞よりtotal RNAを調製し，リアルタイムPCRでそれら2つのmRNAの発現量を調べた結果，DSP-only mRNAの遺伝子発現量は歯髄本体部，象牙芽細胞でほぼ同じであったが，DSPP mRNAは象牙芽細胞で優位に高かった．また象牙芽細胞における2つのmRNAの発現量はDSPP mRNAがDSP-only mRNAよりも優位に高かった．さらに歯髄からタンパク質を抽出・分離し，DSPP由来タンパク質について調べた結果，DSPは認められたもののDPPは検出されなかった．次に我々はそれらDSPP由来タンパク質の機能を調べるために歯髄本体部および象牙質からDSPおよびDPPを分離精製したところ，歯髄ではDSP，象牙質では両タンパク質の抽出される画分にTGF-$\beta$1活性が認められたので，象牙質試料においてさらに分離精製を試みたところ，TGF-$\beta$1と結合しているDSPおよびDPPを発見した．リコンビナントTGF-$\beta$1を用いた結合実験では，TGF-$\beta$1はDSPおよびDPPに結合することでその活性が維持されることが判明した．本サテライトシンポジウムでは，上記歯髄および象牙質におけるDSPPの遺伝子発現と機能をさらに討論したいと考えている．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in porcine pulp and dentin～Gene expression and function～

○Yamamoto R

Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Porcine dentin sialophosphoprotein（DSPP）consists of three major domains: dentin sialoprotein（DSP），dentin glycoprotein（DGP）and dentin phosphoprotein（DPP）. There are at least two mRNA variants expressed from the *Dspp* gene: one encodes the full-length DSPP protein（DSP-DGP-DPP）and the other encodes only DSP. Expression of the full-length *Dspp* mRNA by qPCR analysis was significantly higher in odontoblasts than in pulp, while expression of the DSP-only mRNA was almost equal in odontoblasts and in the body of the pulp. Expression of the full-length *Dspp* mRNA was also significantly higher than the expression of DSP-only mRNA in odontoblasts. In protein study, we fractionated DSPP-derived proteins from the dental pulp. DSP was identified, but little DPP could be detected. In dentin matrix, we detected TGF-$\beta$1 activity and purified TGF-$\beta$1-unbound or -bound DPP and DSP. The binding experiment showed that both DPP and DSP rescued the loss of TGF-$\beta$1 activity, although type I collagen hardly ever bound to TGF-$\beta$1. In this satellite symposium, I would like to discuss that（1）the alternative polyadenylation of specific mRNAs of DSPP is regulated differently in pulp and differentiated odontoblasts, and（2）both DPP and DSP help retain TGF-$\beta$1 activity in porcine dentin.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS12-3　象牙芽細胞分化過程における *Dspp* の機能的意義

○斎藤浩太郎[1]，中富　満城[2]，依田　浩子[1]，大島　勇人[1]

[1]新潟大　院医歯　硬組織形態
[2]九歯大　解剖

象牙芽細胞分化マーカーとして，象牙質リンタンパク質（Dpp），象牙質シアロタンパク質（Dsp），象牙質基質タンパク質 1（Dmp1），熱ショックタンパク質 25（Hsp25），ネスチンの組合せが利用できる．最近我々は，マウスおよびラット象牙質形成過程における象牙芽細胞分化マーカー ネスチン，Hsp25，Dsp，象牙質シアロリンタンパク質（*Dspp*）の発現パターンを免疫組織化学・*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて比較した．前象牙芽細胞は分化過程に従ってネスチンおよび Hsp25 発現を開始したが，*Dspp* 発現は認められなかった．幼若象牙芽細胞は象牙質の石灰化と同時に *Dspp* の転写を開始し，*Dspp*，ネスチン，Hsp25 は成熟象牙芽細胞で共発現した．常生歯である切歯とは対照的に，臼歯では *Dspp* は第一象牙質形成が完了する時期の休止期象牙芽細胞で下方制御された．注目すべきことには，ネスチンと Hsp25 は，歯の損傷後の歯髄治癒過程においても新たに分化した象牙芽細胞様細胞での *Dspp* 発現よりも先行して発現が見られた．以上の様に，ネスチンと Hsp25 は第一象牙質形成完了後の分化した象牙芽細胞に持続的に発現した．*Dspp* mRNA 発現は象牙質基質沈着と石灰化のための象牙芽細胞の機能活性と一致していた．さらに，最近の我々の研究により，石灰化前線のオステオポンチン（OPN）の沈着は，歯の切削後の歯髄治癒過程における修復象牙質形成のための新たに分化した象牙芽細胞様細胞による I 型コラーゲンの分泌に必須であることが明らかになっている．一方，OPN の欠如は象牙芽細胞様細胞におけるネスチンと *Dspp* の発現には影響を与えない．本シンポジウムでは，象牙芽細胞および象牙芽細胞様細胞の分化・機能活性におけるこれらのシグナル間相互作用を議論したい．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Functional significance of *Dspp* in the process of odontoblast differentiation

○Saito K[1]，Nakatomi M[2]，Ida-Yonemochi H[1]，Ohshima H[1]

[1]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Anat, Dept Oral Health Improvement, Kyushu Dent Univ

The combination of expression of dentin phosphoprotein（Dpp）, dentin sialoprotein（Dsp）, dentin matrix protein 1（Dmp1）, heat-shock protein 25（Hsp25）, and nestin may be valuable for the assessment of differentiated odontoblasts. Recently, we compared the expression patterns of nestin, Hsp25, Dsp, and *dentin sialophosphoprotein*（*Dspp*）in the process of dentinogenesis in mice and rats using immunohistochemistry and/or *in situ* hybridization technique. Preodontoblasts begun to express nestin and Hsp25 according to their progress of differentiation, although *Dspp* was undetectable. Immature odontoblasts commenced transcribing *Dspp* simultaneously with dentin calcification. *Dspp,* nestin, and Hsp25 were co-expressed in mature odontoblasts. *Dspp* was down-regulated in the resting odontoblasts in molars when primary dentin formation was completed. Remarkably, nestin and Hsp25 expression also preceded *Dspp* expression in newly differentiated odontoblast-like cells during the pulpal healing process after tooth injury. Furthermore, our recent study clarified that the deposition of osteopontin（OPN）at the calcification front is essential for the secretion of type I collagen by newly differentiated odontoblast-like cells to form reparative dentin during pulpal healing following tooth drilling. We would like to discuss the interplay of these signals for the differentiation and functional activity of odontoblasts and odontoblast-like cells in this symposium.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS12-4　幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法とそのメカニズム

○尾関　伸明[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]

[1]愛院大　歯　歯内治療
[2]愛院大　薬　生体機能化学

現在，わが国の再生医療の核となるのは，人工多能性幹細胞（iPS 細胞：Induced pluripotent stem cell）である．近年，歯科再生医療において注目を集めているヒト歯髄幹細胞は，そのソースとして抜去歯が想定されている．しかし，採取量がごく微量であり，また，抜去歯そのものが採取できない場合には，代替細胞ソースとして他の組織由来の幹細胞，あるいは，ES 細胞や iPS 細胞の使用が必須となる．

歯髄細胞群は象牙芽細胞，線維芽細胞，神経細胞などから構成されるが，特徴的な点として象牙芽細胞の存在比が高く，歯髄再生において重要な役割を果たす．その一方で，臨床応用上の問題は，象牙芽細胞の生体内での存在量は極めて微量であり，ラット KN-3 細胞を除いて，市販培養細胞も含め入手可能な培養細胞系はほとんどない．また，研究の多くが象牙芽細胞の分化あるいは性状に着目したもので，*in vitro* における象牙芽細胞の分化ならびにその再生機構に着目した研究は未だ少ない．そのため，この現状を打破する新しい技術として，幹細胞から象牙芽細胞への安全かつ効率的な分化誘導法の確立が望まれてきた．

本シンポジウムでは，我々が様々な研究アプローチにより確立した 3 種の幹細胞（マウス ES 細胞，マウス iPS 細胞およびヒト骨格筋幹細胞）を用いた象牙芽細胞分化誘導法と Dentin sialophosphoprotein（DSPP）発現の応用例，さらに，small interfering RNA（siRNA）を用いて，その分化に関与するシグナルカスケードの検討を行った最近の研究を中心に，今後の課題と展望を含めて考察したい．

【利益相反】利益相反がないことを宣言する．

## Induction method and mechanism for odontoblastic differentiation of stem cells

○Ozeki N[1]，Mogi M[2]，Nakata K[1]

[1]Dept Endod, Sch Dent, Aichi Gakuin Univ
[2]Dept Med Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ

Currently, a central aspect of regenerative medicine is induced pluripotent stem（iPS）cells in Japan. Recently, human dental pulp stem cells have attracted attention in dental regenerative medicine, which can be isolated from extracted teeth. Dental pulp stem cells are a very small cell population. In cases where a tooth cannot be extracted, an alternative cell source is essential, such as other tissue stem cells, embryonic stem cells, and iPS cells.

Dental pulp consists of fibroblasts, nerve cells, and predominantly odontoblasts that play an important role in dental pulp regeneration. Only one cultured cell line of odontoblasts is commercially available, rat KN-3. While most research has focused on the differentiation or characteristics of odontoblasts, few studies have focused on the regenerative mechanism of odontoblasts *in vitro*. For clinical applications, a safe and efficient method is desired to induce differentiation of stem cells into odontoblasts.

In this symposium, we focus on our previous findings in odontoblast differentiation using three types of stem cells including mouse ES cells, mouse iPS cells, and human skeletal muscle stem cells, and the application of dentin sialophosphoprotein（DSPP）expression. Furthermore, we discuss our recent study of the signaling cascade involved in odontoblastic differentiation using a small interfering RNA. Finally, we consider the prospects for future study of this topic.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS12-5 改変型組み換えDPPタンパク質を利用した硬組織再生における有用性

○鈴木　茂樹[1]，小武家誠司[1]，春山　直人[2]，柴　　秀樹[1]

[1]広島大　院医歯薬保　歯髄生物
[2]九大　歯　矯正

**<実験目的>** Dentin phosphoprotein（DPP）は，高度にリン酸化されたSer-Asp繰り返し配列（SDrr）を持つ細胞外基質で，高い酸性度ゆえに組み換えDPPタンパク質(rDPP)の発現・精製は困難であるとされてきた．本研究では，rDPPの硬組織再生材料としての有用性を検討するため，通常型rDPPおよびインテグリン結合配列(RGD)近傍アミノ酸を置換あるいはSDrrを様々な長さに短縮した改変型rDPPを作製し，これら組み換えタンパク質の細胞刺激活性および石灰化誘導能を評価した．**<結果>** rDPPは同一手法で作製したrDMP-1と異なり，RGD依存的な細胞接着・遊走能を示さなかった．DPP-RGDを含む合成ペプチドの前添加による細胞接着抑制実験およびRGD近傍アミノ酸を様々に置換したrDPPによる細胞接着誘導実験から，RGD下流のA-S bondがDPP-RGDの機能を抑制していることが判明した．さらに，in vitro gel diffusion systemを用いて検討した結果から，rPP-Δ63.5 SDrr（SDrrの63.5%が欠失したrDPP)はrDPPと同程度のリン酸およびカルシウムの蓄積を誘導したが，rDPP-ΔSDrr（SDrr全長が欠損したrDPP）は有意に低い蓄積量を示し，無添加群と同程度であった．ELISAで定量した培養上清中のrDPP-Δ63.5 SDrrはrDPPと比較し7.1倍量のrDPPが分泌されていた．**<結論・考察>** DPP-RGD機能を制御する近傍アミノ酸を同定した．推定DPPアミノ酸配列から，歯を持つ生物種のDPPはrDPP-Δ63.5 SDrrと比較して総じて長いSDrrを持つことから，これら生物種は細胞外基質石灰化に最低限必要なSDrrを持ち，生物種間でのSDrr長のvariationによる機能的差異は無いと推測された．また，rDPP-Δ63.5 SDrrがカルシウムおよびリン酸蓄積効果と分泌量双方の観点から，有用な石灰化誘導因子であることが明らかとなった．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The usefulness of the modified recombinant DPP proteins in the hard tissue regeneration

○Suzuki S[1]，Kobuke S[1]，Haruyama N[2]，Shiba H[1]

[1]Dept Biol Endo, Integr Health Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ
[2]Sec Ortho Dento Orthope, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

<Purposes> Dentin phosphoprotein（DPP）contains highly-phosphorylated tandem serine/asparatic acid rich repeats（SDrr）. Therefore difficulties have been associated with the generation and purification of recombinant DPP proteins（rDPP）due to its highly acidic nature. In this study, we generated normal rDPP, mutated rDPP containing the mutations next to the Arg-Gly-Asp（RGD）integrin-binding site to compare the RGD-dependent effects, and modified rDPP containing SDrr of different lengths to analyze the relation between length variations of SDrr and the precipitation of calcium phosphate. <Results> Normal rDPP did not facilitate cell adhesion and migration, whereas simultaneously purified recombinant DMP-1 did. Further analyses utilizing various peptides containing DPP-RGD and the mutated rDPP indicated that the Ala-Ser site flanking the RGD domain was a key peptide bond that allowed the DPP-RGD domain to be sequestered. rDPP-Δ63.5 SDrr, which possessed 36.5 % the length of SDrr induced the precipitation of calcium phosphate similar to that of rDPP, whereas rDPP-ΔSDrr, in which SDrr were flipped, did not. The amount of rDPP-Δ63.5 SDrr secreted from transfected cells was 7.1-fold greater than that of rDPP. <Conclusion> The generated rDPP-Δ63.5 SDrr which can be substituted for rDPP may be a candidate for a therapeutic molecule to facilitate hard tissue generation.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS13-1 Culturing 'uncultivable' oral bacteria

○Sonia R. Vartoukian

Barts and The London Sch Med Dent, Queen Mary Univ London, UK

Although the advent of next-generation sequencing has led to better appreciation of the true diversity of the human oral microbiome, it has not superseded the requirement for laboratory culture in the physiological and pathological characterisation of individual bacterial species. Yet over a third of oral bacteria are as-yet-uncultivated. Attempts to cultivate certain bacteria in isolation have been met with little success, possibly because species in biofilm communities may depend on each other for metabolic cooperation, such as, through sharing of iron-chelating siderophores.

With the aim of developing an in-vitro culture model for cultivation and isolation of previously-uncultivated oral bacteria, we have used a targeted approach focussed on the uncultivable 'cluster A' of the recently-recognised phylum, *Synergistetes*, followed by an open-ended approach for isolation of non-specific novel targets.

Microcolonies of cluster A *Synergistetes* in mixed culture on Blood Agar (BA) were targeted by rRNA-directed colony hybridisation at 14 days of anaerobic incubation. Repeated sub-culture of hybridisation-positive regions of cells, resulted in the enrichment and (after eight passages) eventual isolation of a novel taxon from this previously-uncultivated group, subsequently named *Fretibacterium fastidiosum*. Its growth was slow and significantly stimulated by other members of the original mixed bacterial community (*Parvimonas micra* and *Tannerella forsythia*) and helper strains (*Fusobacterium nucleatum* and *Staphylococcus aureus*).

On finding that a range of compounds with siderophore activity stimulated the growth of difficult-to-culture strains *F. fastidiosum* and *Prevotella* HOT 376, a culture model was developed, which incorporated 15 $\mu$g siderophore (pyoverdines-Fe-complex or desferricoprogen) or 150 $\mu$l undiluted subgingival plaque suspension into a central well on BA plates that were inoculated with heavily-diluted subgingival-plaque samples from deep periodontal pockets. After eight or more days of anaerobic incubation, microcolonies/colonies showing satellitism were passaged onto fresh plates cross-streaked with helper strains or onto cellulose-acetate membranes overlying lawn cultures of helper strains. Although several of the 77 colonies of interest did not survive passage or grew only on donor cross-streaks, four strains of previously-uncultivated taxa (1 *Bacteroidetes* HOT365 and 3 *Chloroflexi* HOT439 - the first oral taxon from this phylum to have been cultivated) were successfully isolated, as well as three strains of previously-cultivated uncharacterised taxa (2 *Bacteroidaceae* HOT272 and 1 *Capnocytophaga* HOT336). All except the latter were dependent on helper strains for growth.

In summary, colony-hybridisation-directed enrichment of cluster A *Synergistetes* resulted in the successful isolation of the first member of this previously-uncultivable group. An open-ended approach to the culture of previously-uncultivated bacteria led to the isolation of a further four novel strains. The resistance to culture of these novel taxa appears to be related to dependence on a biofilm lifestyle. Their characterisation will further our understanding of the human oral microbiome.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS13-2 A molecular epidemiology study exploring oral microbiome structure associated with human health

○Toru Takeshita, Yoshihisa Yamashita

Sec Preventive and Public Health Dent, Div Oral Health, Growth and Development, Kyushu Univ Fac Dent Sci

Ecological changes in the oral cavity are considered to drive a microbiota shift toward a health- or disease-associated community. We aimed to clarify environmental changes including oral disorders, affecting bacterial assemblages in saliva. Saliva samples were collected from 2,343 adult residents of Hisayama town in Japan, and the microbiota composition was determined by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. Of 550 identified species-level operational taxonomic units (OTUs), 71 were shared even in the participants in the lowest quintile of phylogenetic diversity (PD) and constituted the vast majority of each microbiota. Multiple regression analysis demonstrated that a higher PD strongly reflecting species richness of the other minority members including dental pathogens is significantly associated with poor oral health such as higher plaque index, presence of decayed teeth, gingival bleeding, deepen periodontal pockets, tooth loss and current smoking. In contrast, no significant difference was observed between PD of two community types classified based on relative abundance of the common dominant OTUs (CT-1 and CT-2). Multiple logistic regression analysis demonstrated that CT-1 characterized by a lower ratio of the 9 dominant OTUs such as *Neisseira flavescens* was implicated in a greater age, higher body mass index, more caries-experienced teeth along with current smoking. Our large-scale data showing the variation in salivary microbiome among Japanese adults suggest that current oral health conditions affect minor components of the microbiome, whereas the major components are adapted to the background environment.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS13-3 Molecular biological control method for oral biofilm at early stage

○Izumi Mashima[1,2], Hiroshi Miyakawa[2], Futoshi Nakazawa[2]

[1]Postdoctoral Fellow of JSPS

[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Oral biofilms consist of many kinds of oral bacterial species and have a complex 3D structure because of which they show antimicrobial and immune resistance. This property makes the cure of dental caries and periodontal diseases difficult.

At the present time, the only effective approach for preventing oral infectious diseases is tooth brushing at an appropriate frequency. However, it is very difficult for elderly and disadvantaged people to brush their teeth frequently and accurately. We now face an unprecedented situation of an aging society not only in Japan but also in other countries; therefore, it is important to develop effective alternatives to brushing in order to prevent these oral diseases.

Considering this, I focused on the concept of inhibiting biofilm formation at the early stage—rather than biofilm elimination—with unchanging oral flora. Oral biofilm formation involves the early, middle, and late stages. If formation of the biofilm is inhibited at the early stage, its maturation could be inhibited, thereby aiding in the prevention of dental caries and periodontal diseases.

*Veillonella* has been frequently isolated from the human oral cavity and is reported to play important roles in oral biofilm formation at the early stage; however, the mechanism underlying this has not been clarified. In our previous study, we identified the novel oral *Veillonella* species *Veillonella tobetsuensis*, named after Tobetsu, the town where our university is located. *V. tobetsuensis* has the remarkable ability to promote biofilm formation at the early stage.

To clarify the mechanism of biofilm formation by *V. tobetsuensis*, we focused on the quorum sensing (QS) system. Communication among bacteria is achieved via the production of, detection of, and response to chemical signaling molecules known as autoinducers (AIs). The AIs are involved in QS-mediated gene regulation, which occurs when a threshold concentration is reached. It is known that QS with AIs regulates bacterial virulence factors, antibiotic production, and biofilm formation.

Our current results showed that *V. tobetsuensis* produces 3 types of AI-like substances called AI-1, AI-2, and cyclic dipeptide. Furthermore, the effects of these AIs on biofilm formation at the early stage were examined. The results showed that the amount of biofilm formation changes according to the kind of AI. The draft genome of *V. tobetsuensis* has been sequenced. We are currently analyzing the genes encoding these AIs to confirm the actual effects on oral biofilms at the early stage.

In future, these AIs will be applied in clinical dentistry as effective regents to inhibit oral biofilm formation at the early stage with unchanging oral flora. I believe that these studies will be useful for aging societies.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS14-1　多生歯性の歯列を読み解く：“Zahnreihe”（A.G.Edmund 1960）理論の考え方．魚類の歯を題材として

○脇田　　稔

歯科基礎医学会名誉会員

歯の交換現象を論理的に解析しようとするときには，ある種の困難さを伴う．一般に，歯の交換機構あるいは歯の交換の連続性を図式化して解析するためには，Edmund（1960）によって提唱されたZahnreihen理論について理解することを避けて通れない．この理論は，Bolk（1898）ならびにWoerdemann（1912）以来の記載を復活し，吟味を加えて再構築したものである．ここで同時に，彼は，歯の発生を動機づける要素として“刺激stimulus（li）”の存在を仮定し，ひとつの“刺激stimulus”により，時間を追って順次作られる一連の歯と歯胚の列を，“Zahnreihe”と定義している．

このZahnreihe理論は，下等脊椎動物の歯列と多生歯性を理解するための説明するための方法として，一つの解を与える．しかしながら，Edmundによるこれらの解析理論は大変複雑なので，Edmundの言いたいことの理解を難しくしており，また不必要な誤解を生じ，さらに誤用によって信頼性を欠く研究を作り出している．著者らは，かつて，魚類で多生歯性の歯列を検索し，Edmundによって提唱されたZahnreihe理論を用いて，この魚の歯の交換現象を解析することを試みている．（Wakita, M. et al : Tooth replacement in the teleost fish *Prionurus microlepidotus* Lacepede, J. Morph., 153: 129-142, 1977）

今回は，一般の下等脊椎動物に見られる多生歯性を再考察する良い機会であるので，多生歯性歯列における歯の交換現象はいかに理解すべきか，またどのように用いられているかを，を紹介する．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Tooth replacement phenomenon in the teleost fish, especially concerned with the Zahnreihen theory proposed by Edmund on the dentition, dental system, in lower vertebrates

○Wakita M

Honorary member of JAOB

Tooth replacement phoenomena involves some difficulty to logical analyze. In general, analyzing tooth replacement system or tooth succession by use of illustrations of patterns, it is required to mention on understanding the “Zahnreihen” theory proposed by Edmund（1960）which was emphasized as revival theory since description of Bolk（1898）and Woerdemann（1912）. At the same time, he has hypothesized the presence of odontogenic “Stimuli”, and named one series of teeth and tooth germs initiated by one stimulus, as the Zahnreihe.

This Zahnreihen theory gave one solution as the way of explanation for understanding the dentition and polyphiodontism in lower vertebrates. However, these analytical theory by Edmund is so complicated that made difficult to understand what Edmund would say, and led to unnecessary misunderstanding on it or unreliable studies by its misuse. The author has studied the dentition in the fish, which has had polyphiodontal dentition, and tried to examine tooth replacement of this fish by use this “Zahnreihen” theory presented by Edmund.（Wakita, M. et al : Tooth replacement in the teleost fish *Prionurus microlepidotus* Lacepede, J. Morph., 153: 129-142, 1977）

As this time is good opportunity for reconsider of polyphiodontism seen common in lower vertebrate, the author will try to show how the polyphiodontal dentition should be understood and applied.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS14-2　歯の形態形成を再考する；Cope-Osborn の三結節説の再検討から

○小澤　幸重

触れて観て考える「歯と骨」の訪問教室

Cope-Osborn が三結節を提唱（1883 年）して以来 100 年以上経過するが，最先端と言われる歯の再生医学や分子生物学的な発生実験においても，そして歯の解剖学においても，多かれ少なかれ歯の形態の根拠をこの説を基本においている．果たしてそれでよいのか？というのが本発表である．そのため改めて Osborn の「哺乳類の大臼歯進化」を訳出し直し，この説の問題を抽出した．この大著は，ヒトを含む哺乳類の臼歯の咬頭名を統一し比較しうる点で歯学に画期的な貢献をした．彼らは古生物の専門家であり，古生物の種の鑑別にもっとも利用できるのが大臼歯の歯冠であった．それゆえ大臼歯歯冠の形態を主眼としたのである．この時代は C. Darwin が「種の起源」（1859 年）を，これに基づく「反復説」（1866 年）を E. Haeckel が提唱してから約半世紀で，進化のうねりが社会を厚く覆っていた．それゆえ原錐 protocone を爬虫類の円錐歯と対応させ，咬頭の名称を進化の順序＝発生の順序と一致すると考えたのである．当時から，おもに発生学者から数多くの反論があった．たとえば咬頭の発生順序や萌出順序に変異が多いことからこれが理解されよう．しかし，三結節説に代わるすべての歯の現象を説明しうる仮説がこれまでに無い．それゆえ三結節説が今なお命脈を保っていると考えられる．これを乗り越えるためには歯の形態形成を体制の観点から反省しなければならない

【利益相反】なし

## Reexamine the tooth morphology of Cope-Osborn Tritubercular Theory

○Kozawa Y

Dept Comparative Anat

Though there are many advanced reports on the tooth morphology since Cope-Osborn theory（1883）are advocated, basic ideas of them are within the major theory. The theory have various except evidences, and received many objections from the embryology. This is reflected the evolution flow at that time and paleontological features, because Darwin published “Origin of Species”（1859）and Haeckel proposed “Biogenetic law”（1866）. The author discusses these evidences from the point of view from the body design.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS14-3　イメージングから考える歯の形態形成機構の新規視点

○原田　英光，熊上　深香，大津　圭史，藤原　尚樹

岩医大　歯　発生生物・再生医学

歯の発生過程における歯胚の形態変化は，薄切された標本を用いて組織学的に観察されてきた．さらにそれらの連続切片を用いた3次元構築像は，歯胚の形態を理解する上で大いに貢献してきた．しかし，この方法では広範囲にわたる組織をより深くまで捉えた3次元構築像を作製することは極めて技術的に難しいことや歯胚発生過程での時間的な形態変化を観察することは不可能である．最近，細胞特異的に蛍光を発する遺伝子改変マウスや組織試料を透明化することによって周囲組織を破壊することなく内部構造を観察できる技術が開発された．そこで，我々はサイトケラチン14を発現する細胞がtdTomato（赤色蛍光）を発現するように遺伝子改変したCK14cre/Rosa26RtdTomatoマウスを作製して，切歯歯胚の発生過程における上皮形態を3次元的に観察した．その結果，従来までの組織標本ではわかりづらかった歯堤の形態を示すことができ，歯堤と切歯歯胚との関係がより明確に観察できた．一方で我々は，GFPマウスから摘出した切歯歯胚の器官培養を行い，切歯歯胚の連続した形態変化と細胞の動きを観察した．その結果，切歯唇側上皮の外エナメル上皮には膨らみをもった上皮塊が存在することを見いだした．この部位の細胞は細胞分裂を行わず，また異なる方向に細胞を生み出す起点になっていると考えられた．このように新しいイメージング技術の開発は，新しい知見や考えを生みだす可能性を秘めている．今回のシンポでは，切歯歯胚に加えて臼歯歯胚の発生過程での観察も含めて比較検討することで，新規イメージングから考えられる新しい歯の発生の視点について議論したい．

【利益相反】発表演題の内容に関連し，開示すべき利益相反状態はありません．

## New aspect of tooth morphogenesis using imaging system

○Harada H，Kumakami-Sakano M，Otsu K，Fujiwara N

Div Deve Biol Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ

The morphogenesis of tooth germs has been studied mainly by the histological observation. A classical 3D reconstruction using serial sections contributed to understanding of morphology of tooth germ. However, it is difficult to observe the 3D reconstruction of wide dimension and the change of tooth germ morphology time-dependently. We had developed CK14-cre/Rosa26R-tdTomato and observed 3D reconstruction of incisor tooth germ. As a result, we could understand the relationship between the tooth germ and dental lamina. It is considered that the dental lamina contributes to the morphogenesis of continuously growing mouse incisor tooth germ. Next, we observed the growth of incisor tooth germ using GFP-mouse and tooth organ culture technique and found an epithelial bulge in the outer enamel epithelium at labial side. The real-time imaging showed that the cells in the epithelial bulge did not proliferate and was a center for the two direction of growth. New imaging technique has a possibility for producing new aspect in the field of tooth development. In this symposium, we will discuss new aspect of tooth morphogenesis using new imaging, comparing with the previous results and concepts.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS14-4 Current opinion in odontology

○Han-Sung Jung

Dept Oral Biol, Yonsei Univ

The development of multicellular organisms relies on the coordinated control of cell organization leading to proper patterning of tissues. The molecular mechanisms underlying pattern formation, particularly the regulation of formative cell organization, remain poorly understood.

Using cusp-specific tooth models of mice and gerbils combined with data from tissue recombination and inhibitors experiments, that FGF4 regulates the spatial expression of specific genes involved in cell organization. Furthermore, altering the activation of these cytoskeleton regulators resulted in cusp patterning changes. The results indicate that proper pattern formation is achieved through spatial regulation of specific genes in cytoskeleton and adherens junctions in a cell-type-specific context.

Taken together, for providing evidence for a direct link between signaling molecule, specific components of the cell- and tissue-architecture machinery and organ patterning. It proposes a mechanistic framework to demonstrate the F-actin-based flexible epithelium progressively folded inward between two E-cadherin- and Fibronectin-based mechanically rigid portions to form a cusp shape.

Diversity of tooth morphology with variable shapes will be the endless question beyond the mixture of the odontology. The fundamental relevance of morphology and morphogenesis are given to illustrate potential impact of conceptual and theoretical innovations in tooth morphology.

***Conflict of Interest:*** The author declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS15-1　Hertwig 上皮鞘形成と断裂における新規仮説

○藤原　尚樹，熊上　深香，大津　圭史，原田　英光

岩医大　歯　発生生物・再生医学

臼歯歯根形成は歯冠形成の終了後，エナメル器の下端に Hertwig 上皮鞘（HERS）が形成されることにより開始する．その後，HERS の伸長・断裂が生じ，歯根象牙質形成のみならず，セメント芽細胞の分化とセメント質基質の沈着など歯周組織形成の誘導にも重要な役割を果たす．しかし，HERS の成長や断裂のメカニズムには不明な点が多く残されている．これまで我々は臼歯器官培養に epidermal growth factor を添加して培養すると内エナメル上皮の細胞増殖が優位になり，エナメル器下端のサービカルループの HERS への分化を抑制し，一方で hepatocyte growth factor や insulin-like growth factor I を投与すると外エナメル上皮（OEE）の細胞増殖が優位になり，HERS 形成と伸長を促進する事を明らかにした．これらの結果は HERS の形成と伸長には OEE の活発な増殖が必要であり，HERS を構成する細胞は OEE に由来する事を示唆する．また，HERS 細胞株の培養において transforming growth factor-$\beta$（TGF）を添加すると，ビメンチンの mRNA の発現が増加すると共に，細胞質突起を持つように形態変化した細胞がコロニーから活発に遊走するのが見られた．一方 TGF の阻害剤を添加して器官培養した臼歯では HERS の断裂が起こらず，歯根象牙質上に長く細胞が配列し続ける事が分かった．これらの結果は，HERS の断裂には上皮間葉転換が関わる事を示唆する結果であると考えている．今回の講演では，歯根形成過程における HERS 発達や細胞動態についてこれまで得られた知見を紹介しながら，HERS の歯根形成における役割について考察したい．

【利益相反】発表演題の内容に関連し，開示すべき COI 関係企業などありません．

## New hypotheses in formation and disintegration of Hertwig's epithelial root sheath

○Fujiwara F，Kumakami-Sakano M，Otsu K，Harada H

Div Deve Biol and Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ

Root formation starts after the completion of crown morphogenesis and proceeds simultaneously with the formation of the periodontal tissues. It has recently increased reports that Hertwig's epithelial root sheath（HERS）performs not only as conductor in development of root dentin, but also as trigger of cementoblast differentiation and development of periodontal tissues. However, the development of HERS during root development is not fully understood. We reported that outer enamel epithelium cells（OEE）in molars was proliferated by supplementation with hepatocyte growth factor and/or insulin-like growth factor-I, respectively, and developed HERS, but epidermal growth factor increased cell growth of inner enamel epithelium（IEE）, and inhibited HERS formation. There results suggest that HERS formation requires regulation of cell proliferation between IEE and OEE. On the other hand, transforming growth factor-$\beta$（TGF）up-regulated expression of vimentin, and increased activity of cell migration in HERS01a cell line. Furthermore, inhibition of TGF in organ culture inhibited disintegration of HERS sheet. So, we think that epithelial-mesenchymal transition plays a role in HERS development. In this paper, we introduce the role played by HERS during root formation stage in mouse molar.

***Conflict of Interest:*** I have no financial relationship to disclose.

## SS15-2　インプラント周囲組織の微細血管

○松尾　雅斗

神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態

近年，インプラントは歯科診療一部を担う重要な治療法の一つとして認識されている．しかし，インプラント周囲組織の血管構築や血流動態については解明されていない部分が多い．そこで今回，微小循環系に焦点を合わせ，歯周組織とインプラント周囲組織の形態学的比較検討を行った．
微小循環とは細動脈から毛細血管を経て細静脈に戻る微細な循環経路を指す．口腔領域へ達する動脈は顎骨内で細動脈となり，歯根膜や歯髄へと毛細血管を分岐するため，微小循環により成立している．血管鋳型法は血管内腔に低粘度の合成樹脂を注入する方法で，周囲軟組織を溶解することで歯や骨，インプラント体など硬組織と血管鋳型が同時に残存する．これを走査型電子顕微鏡で観察することで微細血管構築を立体的に観察した．
天然歯の歯肉内縁上皮においては歯肉溝上皮にループ状血管，接合上皮下に扁平な血管網が明確に観察され，結合組織層，歯根膜の血管へと続く．それに対してインプラント上皮下では接合上皮を欠き歯肉溝の下方は結合組織層の環状線維に沿った血管網となりその下方は骨組織が存在するため血管はない．
また，天然歯では固有歯槽骨から放射状に骨梁が規則的に存在し骨髄中に豊富な血管を有する．この血管は歯根膜中の血管網と交通している．インプラントはオッセオインテグレーションにより接触したインプラント周囲骨より骨梁が再生する．しかし，歯根膜は存在せず骨髄中の血管構築も疎である．
歯周組織は血管を豊富に含み，咬合圧が加わったとき歯根膜の血流は歯槽骨内に移動することにより緩衝作用の一部を行う．また，接合上皮下の血管網は炎症防御のバリアーとして働くことも知られている．
これが欠如するインプラントを天然歯と同様に機能させるためには，ブラッシングによる歯肉血管の血流維持や，咬合圧の調整によるインプラント周囲骨・血管のリモデリングが必要であると考えられる．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Microvascular structure of peri-implant tissue

○Matsuo M

Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ

Recently, advanced functional oral rehabilitation has become possible by applying dental implants. The purpose of this study is to clarify the microvasculature of peri-implant tissue.
Vascular resin cast method is a way to observe the blood vessels. With this method, a synthetic resin is injected into blood vessels and the surrounding tissue is dissolved. After which hard tissue such as bone and implant fixture, vascular resin cast remains. These specimens are observed under the scanning electron microscope.
The vascular network of the sulcular epithelium, which is observed in a hair-pin loop. The junctional epithelium made up of squamous mesh. These mechanism signifies that the gingival vascular network performs an important function for protection against the inflammation. There is no junctional epithelium around the implants a vascular network of connective tissue only run transversely to surround the implant neck.
These results suggest that it is difficult to maintain the function and structure of peri-implant tissue as in natural teeth. The most important aspect of this process is to completely control plaque to protect from inflammation, and prevent disturbance in microcirculation.
***Conflict of Interest***: The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS15-3　インプラント治療に関係する脈管の肉眼解剖

○三輪　容子，佐藤　　巌

日本歯大　生命歯　解剖 1

歯科インプラントの埋入や処置の際に重要となる骨内の解剖学的知識について多くの報告がされ，今や下顎骨に関しては情報が周知された感がある．しかし，上顎では骨質や形態に特異性があり，血管の走行や局在も部位により偏りがあるなど，未だ十分検討されているとは言えない．これは，上顎には口蓋管，歯槽管，眼窩下管，切歯管など上下左右の広い部位からの血管の侵入があり，しかもその走行はそれぞれの部位で異なっている．さらには菲薄な骨質を通過するために血管の出血や麻酔事故，治癒の遅延など多くの問題があり，合併症や術後疼痛の予後などのため，さらなる情報の提供が求められている．本発表では，日本歯科大学に提供された献体標本 60 体を用い，上顎骨口蓋管での血管分布，歯槽管，眼窩下管，切歯管内の血管動態を肉眼的観察と侵害受容線維マーカー（CGRP）の免疫組織学的評価によりこれら 4 か所の部位について解析を行った．その結果，口蓋管，歯槽管，眼窩下管，切歯管内の多くの血管は多様な側枝を出し，特に血管幹と神経との 3 次元的関係が明らかになった．さらには，CGRP の局在性が高いことが示唆された．これらの情報から，臨床的に考えられていた骨造成の部位の再検討の可能性を示唆した．さらには近年インプラント体埋入時の位置把握に CBCT 撮影が普及して使われるようになったが，CT では評価できない軟部組織評価の再検討の必要性を提示することで肉眼解剖学の重要性が示唆され，今後これらの情報は臨床へフィードバックする新しい可能性となるものと考えた．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Anatomy of the blood vessel structure related to the dental implant treatment

○Miwa Y，Sato I

Dept Anat, Sch Life Dent at Tokyo, Nippon Dental Univ

There are many reports about intraosseous anatomical bone structure for useful information in the mandibular. In contrast bone thin structure and specific bony vessel canal structures were found in maxilla. Therefore we need to observe the distribution of blood vessel in palatine canal, infraorbital canal, and posterior superior alveolar canal, incisive canal of the maxilla. However, there is a problem of most including anatomical relating bleeding and an anesthesia accident, the healing of blood vessel in bone graft. We also need to clear further information for pain in the bonny site. Using 60 cadavers（Nippon Dental University）, we analyzed blood vessel distribution, blood vessel in palatine canal, infraorbital canal, and posterior superior alveolar canal, incisive canal of the maxilla by an immunohistological methods and macroscopic observation. As a result, blood vessel gave a variety in canal structures and specific localization of the CGRP in the maxilla. From these information suggested that possibility of the reexamination of the localization of the bone thought about clinically. Besides, CBCT used for positioning of implant treatments easily, but importance of the basic anatomical information with soft tissue evaluation reexamined, and these data thought that it was new possibility to feed back to clinical practice in future.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

## SS15-4　歯周組織のリンパ管

○安藤　禎紀，藤村　　朗

岩医大　歯　機能形態

ヒトの体内には様々な臓器が存在する．血管系はその臓器の要求に見合った量の血管系を臓器特有の形態で分布している．しかも，血管系を必要としない臓器は存在しない（はずである）．一方，リンパ管系については，脈管系という意味では同じであると考えられているが，未だにその存在すら議論の対象となっている臓器もある．たとえばハムスターの頬嚢（これは調べられていないだけ？），胎盤，臍帯などがあげられる．また存在すると言われてはいるが，その構築が研究者によって異なるのが歯髄である．さらに存在しないと言われているのが骨の中である．検索は非常に難しいが少なくとも存在するという研究者はいないようである．そこで問題となるのが歯槽は骨の中か外か，である．下顎管の中は骨の外であるため，リンパ管は確認されている（藤村，水川）．歯槽は晒し骨標本にすると骨の外であるが，歯が存在すると中のような気もする．実際，歯根膜にはほとんどリンパ管が確認できなかった．歯根膜に炎症が波及した場合の痛みは激烈でいかにも排導系の存在を認めないような臨床症状を示す．実際，根尖部と歯槽縁に一部リンパ管の存在を認めるが，いわゆる歯根膜にはリンパ管は存在しない．しかしながら，歯の発生を考えると，歯はリンパ管が存在する歯肉上皮の増殖に始まり，歯胚形成までは上皮下で様々なイベントが起こっている．ある時期から歯胚自体が骨に埋め込まれるわけで，この時点でリンパ管は根尖部を除いて確認できなくなるわけである．しかしながら，最終的に萌出の過程で骨を突き破った時点で歯槽縁が形成され，そこにはリンパ管が分布することになる．いまだ答えは出ていないが，歯，特に歯根の発生と萌出（出齦）に係るリンパ管の構築変化，最初からないのか，存在したが消えたのかを考察してみたいと考えている．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Lymphatic vessel of the periodontal tissue

○Ando Y，Fujimura A

Dept Anat, Div Func Morphol, Iwate Med Univ

There are various organs in the human body. The blood vascular system forms the peculiar architecture of the organ. And the organ which does not need a blood vascular system does not exist. On the other hand, it's thought that the lymphatic system is same as a blood vascular system by the meaning as the vascular system, but the organ that even the existence of the lymphatic vessel is still discussed. The lymphatic vessel does not seem to exist in the bone. There is the lymphatic vessel in the mandibular canal, because the inside of this canal is the outside of the bone（Fujimura, Mizukawa）. Therefore, there is the problem, the alveolar fossa is the inside of the alveolar bone or not. The lymphatic vessels does not exist other than apex of the root or alveolar crest. We have no answer for this phenomenon.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

## SS15-5　異なる間葉系幹細胞の協調的作用を利用した歯周組織再生

○帖佐　直幸，石崎　　明

岩医大　歯　細胞情報科学

再生医療や細胞治療に用いる細胞ソースとして多分化能を有した幹細胞が対象とされる．間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells: MSC）は自己複製能に加え骨芽細胞，脂肪細胞，軟骨細胞といった間葉組織構成細胞への多分化能を有した体性幹細胞である．ヒト MSC は骨髄，皮下脂肪，関節軟骨ならびに滑膜などの生体組織から幅広く採取されている．歯周組織においても歯髄や歯根膜における MSC の存在が報告されている．我々は乳歯ならびに永久歯歯髄由来 MSC を比較解析した結果から，永久歯歯髄由来 MSC で細胞間接着因子 R-cadherin が特異的に発現していることを報告した．R-cadherin は網膜の血管新生，筋分化，脈管ならびに神経形成において重要な役割を担っている．我々は R-cadherin の発現増強が歯髄由来 MSC の骨芽細胞分化や脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした．加えて骨髄由来 MSC との比較検討から，R-cadherin の発現が神経細胞マーカー遺伝子の発現と相関することを見出している．一方，炎症やそれに引き続く組織修復に伴い骨髄由来 MSC がケモカインの誘導にしたがって歯周組織を含む様々な組織へとホーミングする．我々は歯周炎等において歯肉線維芽細胞から分泌される炎症性サイトカインが歯根膜由来 MSC 様細胞に作用することで，ケモカイン SDF-1 や MCP-1 を分泌することを明らかにした．興味深いことに，これらのケモカインは骨髄由来 MSC に対してのみ遊走促進効果を示した．我々の研究成果は，異なる組織由来 MSC の性状や能力が大きく異なることを示唆している．これら様々な性質や能力を有した MSC を効果的に利用することによって，より効率的な再生医療や細胞治療へと発展することが期待される．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Periodontal tissue regeneration by cooperation of distinct mesenchymal stem cells

○Chosa N，Ishisaki A

Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ

Mesenchymal stem cells（MSCs）retain the ability to self-renew and differentiate into mesenchymal cells. Therefore, MSCs are strong candidates for use in regenerative medicine and cell therapy. Our previous studies demonstrated that dental pulp in permanent teeth-derived MSCs specifically expresses R-cadherin which is an important cell adhesion molecule in retinal angiogenesis, vasculogenesis, and neurogenesis. We showed that the overexpression of R-cadherin suppresses the osteoblast and adipocyte differentiation of dental pulp-derived MSCs. In addition, our preliminary experiments suggest a correlation between the expression of neuronal markers and that of R-cadherin. On the other hand, bone marrow-derived MSCs migrated to various tissues including periodontal tissue by chemotaxis, which plays important roles in anti-inflammatory response and tissue repair. We recently demonstrated that stimulation of inflammatory cytokines to increase the production and secretion of SDF-1 and MCP-1 in periodontal ligament-derived MSC-like cells. Interestingly, these chemokines specifically increased the migration of bone marrow-derived MSCs, but did not increase that of the periodontal ligament-derived MSC-like cells. In summary, our studies suggested that efficient regenerative medicine could be implemented by effective use of distinct MSCs obtained from various tissues.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS16-1 リガンド依存性受容体 DCC 蛋白による口腔扁平上皮癌へのアポトーシス誘導

○清島　　保，和田　裕子

九大　院歯　口腔病理

口腔の悪性腫瘍のほとんどが扁平上皮癌であり，摂食・構音などの口腔機能や審美性の喪失を招き，患者の QOL が著しく低下するケースが少なくない．また，症例間で細胞増殖や浸潤・転移能，薬剤抵抗性および炎症細胞への反応性が異なり，画一的ではないことをしばしば経験する．膜蛋白は有用な診断・治療ターゲットとして様々な研究がなされている．現在，神経軸索伸長因子や細胞分化関連因子としても知られる“deleted in colorectal cancer（DCC）”は，大腸腺癌で頻繁に欠失/発現減弱する遺伝子として見出され，染色体 18q21 に位置するために当初癌抑制遺伝子と見なされた．しかし，Fearon と Cho（Nature, 2004）により，リガンドが DCC に結合しない場合，腸上皮細胞にアポトーシスを誘導するリガンド依存性膜蛋白であると報告している．また，食道，子宮頚部や口腔扁平上皮癌でも DCC の発現減弱/欠失が報告されている．
そこで，我々は，アポトーシス誘導因子として netrin-1 結合部位を欠失させた DCC（ΔDCC）を口腔扁平上皮癌細胞に発現させると，アポトーシス誘導が生じることを *in vitro/in vivo* 実験で認めた．この ΔDCC や他の候補標的因子を扁平上皮癌細胞特異的に発現させるため，サイトカインによる癌細胞の形質変化や癌の薬剤抵抗性に関する研究も進めている．こうした研究を通して患者自身の腫瘍形質をより反映させた治療法の開発への一助となれば考えている．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Analysis of mutant DCC-inducible apoptosis on oral squamous cell carcinoma

○Kiyoshima T，Wada H

Lab Oral Pathol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Deleted in colorectal cancer（DCC）expression is reduced in most of advanced colorectal carcinomas and regarded as tumor suppressor gene. DCC is a transmembrane receptor for Netrin-1 and also involved in axon guidance. Additionally, recent work has proposed that DCC has the novel property of the so-called ‘dependence receptors’. The dependence receptor induces a signaling leading to cell survival, differentiation and neural growth in the presence of its ligand. Meanwhile, it triggers an apoptosis-inducible signal in the absence of ligand. In this study, the effects of ΔDCC vector encompassing gene deleted Netrin-1 binding site from DCC cDNA on oral squamous cell carcinoma were in vitro/in vivo examined. The size of the carcinoma tissue was decreased and the number of TUNEL-positive cells was increased in ΔDCC vector transfected cells and ΔDCC vector injected mice, suggesting ΔDCC could induce apoptosis for oral squamous cell carcinoma. This will partly present how receptors such as DCC constrain tumor progression and how the dependence receptor may open up therapeutical perspectives. In addition, we would like to present some findings that were obtained in our other examinations.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS16-2　口腔扁平上皮癌細胞による死細胞貪食の分子機構とその意義

○山﨑　　学

新潟大　院医歯　口腔病理

がん細胞内に他の細胞成分が取り込まれる現象は古くから知られており，細胞診断学では悪性の指標のひとつとされている．演者は口腔扁平上皮癌(SCC)の病理診断を通じて，アポトーシスがん細胞が生活がん細胞内に存在することを見出し，本現象の病理学的意義について疑問を抱いてきた．そこで,「がん細胞は同種アポトーシス細胞を貪食することで，自身の細胞機能を変化させる」という仮説をたてて以下の実験に着手した．まず，アポトーシス細胞貪食促進分子 MFG-E8 に注目し，SCC 手術材料における MFG-E8 の発現様式を免疫組織化学的に解析したところ，アポトーシスがん細胞において MFG-E8 陽性が強調されており，その一部は生活がん細胞の細胞質内に認められた．そこでは，アポトーシスがん細胞とライソゾームマーカ LAMP-1 の局在が一致し，がん細胞自身が同種死細胞を処理していることを確認できた．また，SCC 症例の多くで MFG-E8 陽性が確認され，MFG-E8 発現レベルは腫瘍径・病理病期などの腫瘍進展に相関していた．口腔 SCC 細胞株とアポトーシス細胞死を誘導した各種がん細胞とを共培養した結果，アポトーシス細胞は生活がん細胞のライソゾーム内に取り込まれ，MFG-E8 過剰発現によってアポトーシス細胞貪食および浸潤性が亢進した．以上より，アポトーシスがん細胞は MFG-E8 を介して同種がん細胞によって貪食処理され，MFG-E8 発現が上昇した貪食がん細胞で細胞機能が亢進することが示された．近年，化学療法・放射線療法によるがん細胞死が残存がん細胞の増殖に寄与する現象が確認されている．がん細胞による同種死細胞貪食現象が新規の治療標的となる可能性がある一方で，死細胞貪食現象を抑制することによる制癌作用にも展望が開けた．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Apoptotic cell clearance by cancer cells in oral squamous cell carcinoma

○Yamazaki M

Dept Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med & Dent

Apoptotic squamous cell carcinoma（SCC）cells of the oral mucosa are engulfed by macrophages or even by neighboring SCC cells. We hypothesized that engulfment of apoptotic carcinoma cells by living carcinoma cells are promoted via MFG-E8, one of phagocytosis regulating molecules, and this phenomenon could contribute to cancer cell activities including progression. Immunohistochemistry of oral SCC samples revealed that apoptotic SCC cells were strongly positive for MFG-E8, suggesting that apoptotic SCC cells were cleared by the MFG-E8-related phagocytic pathways. The expression of MFG-E8 was also confirmed in SCC cell lines, their expression levels were positively correlated with degrees of migration, invasiveness, and engulfment of apoptotic cells. It is thus obvious that apoptotic cell clearance via MFG-E8 upregulates cancer cell functions. Although apoptotic cell clearance by cancer cells should be a potential anti-cancer target, control of autoclearance of apoptotic SCC cells itself would open up a new direction for therapeutic intervention.

***Conflict of Interest:*** The author declares no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS16-3　口腔扁平上皮癌の組織学的悪性度から上皮間葉移行の *in vitro* 研究まで

○岡田　康男[1,2]，東理　頼亮[1]，大野　淳也[2]，石黒　仁江[1]，森出美智子[1]，長谷川　仁[1]

[1]日歯新潟　病理
[2]日歯新潟　院生命歯　病態組織機構

口腔癌の転移は診断，治療，予後判定の上で非常に重要である．我々は，Anneroth 組織学的悪性度，血管新生（血管分布密度），リンパ管新生（リンパ管分布密度）と頸部リンパ節転移との関連について検討したところ，組織学的悪性度や血管分布密度の評価が頸部リンパ節転移の予測因子になりうることを報告した．そこで，腫瘍血管新生抑制が口腔癌の有効な治療となりうると考え，口腔癌細胞株（SAS, HSC-3）をヌードマウス皮下に移植し，その後，全身投与可能な可溶型 VEGF 受容体発現遺伝子を組換えアデノウイルスに組み込み（AdVEGF-ExR），腫瘍から離れた部位に投与し，VEGF を捕捉して血管新生を抑制し腫瘍増殖を制御する in vivo 実験を行った．その結果，AdVEGF-ExR を腫瘍局所に導入しなくても，また，大量に投与しなくても腫瘍の血管新生を抑制することで腫瘍増大抑制が可能であった．また，Anneroth 組織学的悪性度ののうち浸潤様式では，腫瘍胞巣がバラバラになり胞巣をなす癌細胞数が少なくなり，最後には single cells になる状態を評価している．これは上皮細胞が間葉様細胞の形質を獲得する現象であり（EMT），これにより細胞間接着が失われ細胞の運動能が亢進する．そこで口腔癌細胞株（SAS, Ca9-22, HSC-3）を TGF-ß1 と TGF-ß signaling pathway の阻害剤で処理し，増殖アッセイと浸潤アッセイを行った．また，E-cadherin, N-cadherin, snail, slug and MMP の発現を蛍光免疫染色と RT-qPCR 法で調べた．その結果，TGF-ß1 は口腔癌細胞の増殖と浸潤を促進し，TGF-ß のシグナル伝達阻害は増殖を抑制した．一方，転移巣細胞株では MET が生じたと考えられた．

【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## Histopathological malignancy grade, tumor angiogenesis, antiangiogenic gene therapy targeting VEGF, and epithelial-mesenchymal transition（EMT）in oral cancer

○Okada Y[1,2]，Kanri Y[1]，Ono J[2]，Ishiguro H[1]，Moride M[1]，Hasegawa H[1]

[1]Dept Pathol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[2]Histopathol Pathogenic Mechanisms, Grad Sch Life Dent at Niigata, The Nippon Dent Univ

Cervical lymph node（CLN）metastasis from oral cancer correlates with poor prognosis. Therefore, accurate assessment of CLN status is crucial in treatment planning. Anneroth's histological malignancy grade, blood vessel density, and lymphatic invasion were related significantly with CLN metastasis. Therefore, inhibiting angiogenesis is considered to be effective for treating oral cancer. We administered a soluble form of VEGF receptor-expressing gene incorporated into adenovirus（AdVEGF-ExR）intraperitoneally to nude mice to which oral squamous cell carcinoma（OSCC）cell lines were transplanted subcutaneously *in vivo* to inhibit angiogenesis and tumor proliferation. Compared to the controls, in the AdVEGF-ExR administration group, significant antiproliferative effects were observed and extensive tumor necrosis was found histopathologically. Immunohistochemical analysis revealed tumor angiogenesis and apoptosis induction were significantly high in the AdVEGF-ExR group. The pattern of invasion of Anneroth's classification represents epithelial-mesenchymal transition（EMT）. In our *in vitro* study, OSCC cell lines were treated with TGF-ß1 or TGF-ß signaling inhibitors, and assayed for proliferation and invasion. Expressions of EMT factors and MMPs were examined. TGF-ß1 treatment significantly enhanced proliferation and invasion. Inhibition of TGF-ß signaling significantly suppressed proliferation. TGF-ß1 upregulated Snail and N-cadherin and downregulated E-cadherin in SAS（primary OSCC）. MMPs were upregulated in both OSCC.

***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## SS16-4　口腔がんの治療戦略に対する基礎研究の必要性

○田沼　順一，金子　裕康，中尾　寿奈，江原　道子，永山　元彦

朝日大　歯　口腔病理

口腔癌は世界的に増加傾向にあり，欧米諸国では，臓器別がん頻度で第6位を占めるに至っている．その発生機序・予防・治療の基礎的な理解には適切な動物モデルが必須である．我々は化学発がん剤4NQOによるラット舌癌モデルを確立し，それらを用いて舌癌高感受性DAラットと低感受性WFラットが存在することを見いだし，これらのラット間の遺伝解析より，舌癌感受性は多くの遺伝子の多型により規定されるpolygenic traitであり，発がん過程に伴い，これらの遺伝子座で高頻度のLOHやエピジェネチックな変化がおこることを明らかにしてきた*(Cancer Res 2003, Int J Cancer 2002, Cancer Sci 2001,Pathology Int 2004)*．これらの研究により，舌がんの発生・進展・浸潤や転移等に関連する遺伝子群を同定し，舌癌の分子生物学的な理解を深めてきた．特に我々がラット舌癌モデルで見出した*FGFR4 (Oncology Rep 2010)*は，細胞周期や細胞増殖に関与するチロシンキナーゼ型の受容体で，Gly388ArgのSNPとTP53の変異が，舌がんの予後と関連すると報告しています．
また*Pthrp (Oncology Rep 2014)*は骨転移に関連があることは知られているが，新規に見出した3つSNPsの変異が，舌癌の進展と増悪に関連するmodifier geneであることを，我々が作成した舌癌のコンジェニックラットを用いて，mRNA・タンパク質発現および*in sillico*などの機能解析にて証明することができたので，我々の確立したラット舌癌モデルにおける遺伝子解析の結果は，ヒト口腔癌の解析にも有用な情報を与えると考えている．
最近は舌癌の前癌病変モデルラットを用いて，RNA結合タンパク質hnRNPKが核内でクロマチンの修飾やスプライシングを，細胞質では翻訳やmRNAの安定性を制御し，細胞のストレス応答や増殖に関与していることを明らかにした．この*hnRNPK*の発現増強がヒト前癌病変である白板症にみられる上皮異形成から腫瘍に変化する過程を同定するのに優れたマーカーであることも示すことができたので，これら一連の研究成果が，口腔がんの治療戦略に対する基礎研究の必要性であることを裏付けることになるので報告する．
【利益相反】著者は利益相反がないことを宣言する．

## The need for basic research on the treatment strategy of oral cancer

○Tanuma J，Kaneko H，Nakao J，Ehara M，Nagayama M

Dept Oral Pathol, Asahi Univ Sch Dent

Tongue cancer is the most common cancer of the head and neck, and accounts for approximately 3% of all newly diagnosed cancer cases worldwide. Despite recent advances in treatment modalities, such as surgical techniques and radiotherapy and chemotherapy protocols, the long-term survival of patients with tongue cancers remains poor. New prognostic and therapeutic markers are required to improve patient survival. Increasing evidence suggests that detection of molecular abnormalities in tongue cancers might provide important indicators of patient prognosis, and could contribute to the development of tailored treatments based on the presence of specific biomarkers. Focusing on the biological functions and interactions of candidate proteins is a good strategy for selecting potential biomarkers for validation.
We previously reported the results of our studies using molecular biological analysis of 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis. In these studies, we found that DA rats were highly susceptible to 4NQO-induced tongue cancer, whereas WF rats were resistant. These results of the studies suggest that this model of 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis simulates many aspects of human oral carcinogenesis, and may be used in the analysis of oral cancer multi-step processes.
***Conflict of Interest:*** The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.

## O1-B1 歯周病とアルツハイマー（AD）（1）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS によるマクロファジー活性化と脳髄膜を介した末梢炎症シグナルの脳内伝達とミクログリア活性化

○劉　訳聡，武　洲，中西　博

九大　院歯　口腔機能分子

## A possible role of leptomeninges for transduction of systemic inflammatory signals to microglia in response to lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*

○Liu Y，Wu Z，Nakanishi H

Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Purpose: We have attempted to clarify the pathways that transduce inflammatory signals from the periphery during periodontitis to the brain. In this study, we examined whether diffusible factors secreted by gingival macrophages during periodontitis can communicate with the brain-resident microglia through the leptomenings covering the surface of the brain parenchyma. Materials & Method: The gingival tissues were prepared from the chronic periodontitis patients. The amounts of proinflammatory cytokines secreted in the culture medium, including tumor necrosis factor（TNF）-alpha and interleukin（IL）-1beta were measured in RAW264.7 macrophages, primary leptomeningal cells and MG6 microglia cells. Results: The expression of Toll-like receptor 2（TLR2）, TLR4, TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase were mainly detected in the gingival macrophages of the chronic periodontitis patients. To examine the roles of diffusible factors secreted by macrophages can stimulate leptomeningeal cells, primary cultured leptomeningeal cells were incubated with the conditioned medium from lipopolyssacharide from Porphyromonas gingivalis（LPS-PG）-stimulated RAW264.7 macrophages. The conditioned medium from LPS-PG-stimulated RAW264.7 macrophages induced secretion of proinflammatory cytokines by the primary cultured leptomeningeal cells, including TNF-alpha and IL-1beta. Furthermore, the conditioned medium from LPS-PG-stimulated leptomeningeal cells in turn induced the secretion of proinflammatory cytokines by MG6 microglia, including TNF-alpha. Conclusion: These observations suggest that leptomeningeal cells serve the redundant pathway that transduce inflammatory signals from the peripheral macrophages to the brain-resident microglia, provoking neuroinflammation during periodontitis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B2 歯周病とアルツハイマー病（AD）（2）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS の慢性的末梢投与によって誘発される AD 様フェノタイプにおけるカテプシン B の役割

○倪　軍軍，武　洲，中西　博

九大　院歯　口腔機能分子

## Critical roles of cathepsin B in AD-like phenotypes following chronic systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*

○Ni J，Wu Z，Nakanishi H

Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Purpose: We have attempted to clarify the exacerbating effects of periodontitis on AD pathologies. In this study, we examined effects of systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*（LPS-PG）on AD-like phenotypes, including amyoid beta（Abeta）accumulation, microglial activation and cognitive impairment. Furthermore, critical roles of cathepsin B（CatB）, a typical lysosomal cysteine protease, in LPS-PG-induced AD-like phenotypes, because CatB can work as a key enzyme necessary for the IL-1beta production by microglia and a beta-secretase for production of Abeta in the regulated secretory pathway of neurons. Materials & Methods: Young（2 month-old）and middle-aged（12 month-old）female wild-type and CatB-/- mice were subjected to a consecutive systemic treatment with LPS-PG for five weeks. Results: Systemic treatment with LPS-PG for five consecutive weeks induced Abeta accumulation and microglial activation evidenced by increased interleukin（IL）-1beta expression in the hippocampus of middle-aged wild-type mice, but not in middle-aged CatB-/- mice. Furthermore, chronic systemic treatment with LPS-PG significantly impaired learning and memory ability evaluated using a step-through passive avoidance test in middle-aged wild-type mice, but not in either young wild-type or middle-aged CatB-/- mice. Next, a possible connection between the Abeta accumulation and microglial activation was examined in in vitro studies. The mean expression levels of amyloid precursor protein and CatB were significantly increased in primary cultured hippocampal neurons in a CatB-dependent manner after treatment with the conditioned medium from LPS-PG-stimulated microglia, but not by LPS-PG. Conclusion: Chronic systemic treatment with LPS-PG can induce AD-like phenotypes, including Abeta accumulation, microglial activation and cognitive impairment in middle-aged mice in a CatB-dependent manner.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B3 ケモカイン CXCL14 の発現がセツキシマブ（抗上皮増殖因子受容体抗体）の腫瘍抑制活性を決定する

○生駒　丈晴[1,2]，小澤　重幸[1,2]，鈴木　健司[1]，岩渕　博史[1]，陽　　暁艶[2,3]，宮本　千央[2,3]，前畑洋次郎[2,3]，畑　隆一郎[2,3]

[1]神奈川歯科大　顎顔面外科
[2]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター
[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学

［背景］上皮増殖因子受容体（EGFR）を標的分子とするセツキシマブ（ヒト-マウスキメラ化モノクローナル抗体）は，現在，大腸癌や頭頸部癌の治療に用いられており，良好な結果を得ている．しかし，セツキシマブが治療効果を示す機構は明らかではない．今回我々は，抗腫瘍性ケモカインである CXCL14 の発現の有無がセツキシマブの抗腫瘍効果に関与するかどうかを検討するため，セツキシマブが抗腫瘍効果を示す HSC-3 細胞と，効果を示さない YCU-H891 細胞を用いて実験を行った．［方法と結果］HSC-3 細胞ではセツキシマブによって CXCL14 の遺伝子発現の上昇が確認されたが，YCU-H891 細胞においては CXCL14 の発現は検出できなかった．YCU-H891 細胞の CXCL14 の発現消失の原因として，CXCL14 のプロモーター領域のメチル化が考えられたため，パイロシークエンスやメチル化特異的 PCR で検討したところ，HSC-3 細胞ではプロモーターはメチル化していなかったが，YCU-H891 細胞ではメチル化していることが確認された．さらに，in vivo の実験系を用いて YCU-H891 細胞に脱メチル化剤であるアザデオキシシチジン（デシタビン）をセツキシマブと併用投与し，セツキシマブの抗腫瘍効果を確認したところ，CXCL14 の遺伝子発現の回復に伴い，セツキシマブは抗腫瘍効果を示すようになった．また，CXCL14 の発現ベクターを導入した YCU-H891 細胞を用いて，CXCL14 が YCU-H891 細胞に対して抗腫瘍効果を示すかどうか確認したところ，CXCL14 を YCU-H891 細胞に強制発現させると，YCU-H891 細胞の腫瘍増殖能は抑制された．［結論］本研究結果から，CXCL14 の発現の有無がセツキシマブの腫瘍抑制効果を決めており，CXCL14 のプロモーターがメチル化している腫瘍では，セツキシマブと脱メチル化剤の併用療法が有用であると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression

○Ikoma T[1,2], Ozawa S[1,2], Suzuki K[1], Iwabuchi H[1], Yang X[2,3], Miyamoto C[2,3], Maehata Y[2,3], Hata R[2,3]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ
[2]Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ
[3]Dept Oral Sci, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ

［Purpose］Cetuximab, a monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, has been successfully applied in some patients with colorectal cancer and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). For effective treatment, it is essential to first identify Cetuximab-responsive patients.［Methods and Results］When we compared the expression of chemokine CXCL14 in HNSCC cells, both Cetuximab responsive HSC-3 and non-responsive YCU-H891 cells, we found expression of this chemokine only in the responsive HSC-3 cells. We also found that the promoter region of YCU-H891 cells were hyper methylated, and demethylation of this promoter recovered CXCL14 mRNA expression together with in vivo tumour-growth suppression by Cetuximab. Additionally, YCU-H891 cells were engineered to express CXCL14 in the presence of doxycycline in mice. Cetuximab-dependent tumour suppression was observed in vivo by doxycycline administration in the drinking water of the mice.［Conclusion］These results indicate that CXCL14 expression would be a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B4 オピオイド受容体による無顆粒島皮質におけるシナプス伝達修飾作用の解明

○横田　英子[1]，越川　憲明[2]，小林　真之[2]

[1]日本大　歯　麻酔
[2]日本大　歯　薬理

【目的】代表的な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネは，高次痛覚中枢である無顆粒島皮質（AI）において，オピオイド受容体を介して下行性抑制を賦活化し，鎮痛作用を発揮することが報告されている．しかし，そのシナプスレベルでのメカニズムは不明である．本研究は，AI から同時ホールセル記録を行い，オピオイド受容体サブタイプ別によるシナプス伝達修飾作用について検討した．さらに光学計測法を用いて AI の応答性について *in vivo* 標本で検討した．
【方法】ラット脳スライス標本を作製し，AI の錐体細胞（Pyr）および抑制性介在ニューロンである fast-spiking 細胞（FS）から同時ホールセル記録を行った．単一抑制性シナプス後電流（uIPSC）に対するオピオイド受容体サブタイプの作用を FS → Pyr と FS → FS シナプスで検討した．また，歯髄刺激によって誘発される AI の神経活動に対する上記受容体の作用を光学的に記録した．
【結果と考察】同時ホールセル記録では，μ受容体アゴニストである DAMGO（1 μM）灌流投与により，FS → FS で uIPSC の振幅が減少し，FS → Pyr では有意な変化は見られなかった．一方，δ受容体アゴニストである DPDPE（1 μM）により，uIPSC の振幅は FS → Pyr および FS → FS いずれにおいても減少した．κ受容体アゴニストである U50488（1 μM）は，uIPSC の振幅を変化させなかった．次に，光学計測法では，DAMGO は興奮伝播を抑制し，DPDPE は興奮伝播を増大させた．以上の結果からオピオイド受容体は，受容体サブタイプおよびシナプスを形成する細胞の種類により抑制性シナプス伝達修飾作用が異なることが明らかとなった．さらにμ受容体は，抑制性シナプス伝達において，Pyr よりも FS に対する uIPSC を選択的に抑制する事で脱抑制を抑制し，AI からの出力を抑制して下行性抑制を賦活化している可能性が示唆された．
共同研究者；小柳　裕子，大井　良之（日本大学歯学部歯科麻酔学講座）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Opioidergic effects on synaptic transmission in rat insular cortex

○Yokota E[1]，Koshikawa N[2]，Kobayashi M[2]

[1]Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

The insular cortex（IC）plays a key role in modulation of nociception, and the major analgesics such as morphine are thought to produce analgesic effects through opioid receptors in IC. There are three major subtypes of opioid receptors: mu, delta, and kappa receptors, however, it is still unknown how these receptor subtypes modulate synaptic transmission in IC. We performed paired whole-cell patch-clamp recordings from fast-spiking interneurons（FS）and pyramidal cells（Pyr）of rat IC, and examined the effects of selective agonists of opioid receptors on unitary inhibitory postsynaptic currents（uIPSCs）. In addition, we performed in vivo optical imaging, and measured the amplitude and area of cortical excitation responding to electrical stimulation of the dental pulps in rats. DAMGO, a selective mu opioid receptor agonist, suppressed the amplitude of uIPSCs in FS-FS synaptic connection but not in FS-Pyr, whereas DPDPE, a selective delta opioid receptor agonist, suppressed uIPSCs in both connections. Optical imaging study revealed that DAMGO suppressed dental pulp stimulation-induced excitatory propagation in IC, but DPDPE facilitated the excitation. These results suggest that opioid receptors differentially regulate synaptic transmission in IC depending on their subtypes. Mu opioid receptor may activate the descending inhibition by suppressing disinhibition in IC.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B5 α7 ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が骨代謝に及ぼす影響

○盛林　昭仁[1]，萱島　浩輝[1]，佐伯万騎男[3]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]

[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ
[2]東北大　院歯　分子・再生補綴
[3]新潟大　院医歯　歯科薬理

【目的】近年，骨代謝制御へのα7 ニコチン性アセチルコリン受容体（α7-nAChR）の関与が報告されている．本研究の目的は，α7-nAChR の特異的拮抗薬である Methyllycaconitine（MLA）が破骨細胞分化および骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討し，α7-nAChR を標的とした骨代謝制御の可能性を探索することである．【方法】破骨前駆細胞株（RAW264.7）を RANKL 依存性に分化誘導する過程で MLA を添加し，5〜6 日後に TRAP 染色から陽性の多核細胞数を計測した．また，ラット骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を MLA 含有骨芽細胞分化誘導培地中で 21 日間培養し，リアルタイム RT-PCR 解析から骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現を検討し，Alizalin Red 染色を行った．ラット頭蓋骨欠損実験モデルに MLA を投与し，21 日後の骨組織再生を HE 染色による組織学的観察およびマイクロ CT 撮影を用いた画像解析により評価した．【結果】RAW264.7 の TRAP 陽性多核細胞数は 10 nM の MLA の添加により有意に減少した．また，100 nM の MLA は分化誘導 14 日目の MSC の Runx2 および osteocalcin 遺伝子の発現を有意に促進した．Alizalin Red 染色の結果，MLA は MSC の細胞外基質の石灰化を有意に促進した．組織切片標本では MLA 投与群および非投与群ともに頭蓋骨欠損部位に新生骨の形成を認めたが，MLA 投与群により多くの新生骨の形成を認めた．また，MLA 投与群における頭蓋骨欠損部の骨体積および骨塩量は非投与群と比較して濃度依存的に増加した．【結論】MLA は破骨細胞の分化を抑制する一方で，骨芽細胞分化を促進し，局所的骨欠損部位における骨形成を促進させる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist on bone metabolism

○Moribayashi A[1]，Kayashima H[1]，Saeki M[3]，Yatani H[1]，Egusa H[1,2]

[1]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[3]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Objectives: Recently, alpha7 nicotinic acetylcholine receptor（α7nAChR）has been reported to be involved in regulation of bone remodeling. Methyllycaconitine（MLA）is a specific antagonist of α7nAChR. The objective of this study was to investigate the effects of MLA on osteoclastogenesis and osteogenesis. Methods: RAW264.7 osteoclast progenitor cells were cultured with RANKL and MLA. Osteoclast formation was determined by TRAP staining. Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells（MSCs）were maintained in osteogenic induction medium containing MLA. The expression of osteogenic marker genes and the mineralized matrix formation of the MSCs were evaluated by real-time RT-PCR analysis and Alizarin red staining. Collagen graft material containing MLA was transplanted into the rat calvarial bone defects. After 21 days, bone formation was assessed by HE staining and microCT analysis. Results: The number of TRAP-positive multinucleated osteoclasts significantly decreased by the addition of MLA. MLA enhanced the expression of osteogenic marker genes and matrix mineralization of MSCs. At the 3rd week, MLA enhanced the mineral content and volume of the new bone in the calvarial defect in a concentration-dependent manner. Conclusion: MLA inhibits osteoclastogenesis, while it accelerates osteogenesis, which may enhance the bone regeneration at the bone defect site.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B6 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットへの新規ビスホスホネート投与による骨量改善と作用機序について

○滝澤　愛子[1,2]，千葉　美麗[2,4]，太田　　岳[2]，安田　真弓[1,2]，鈴木　恵子[3]，篠田　　壽[4]，五十嵐　薫[1]

[1]東北大　院歯　口腔障害科学，[2]東北大　院歯　口腔生理，[3]奥羽大　歯　歯科薬理，[4]東北大　院歯　環境歯

【目的】新規ビスホスホネート［4-(methylthio) phenylthio］methanebisphosphonate（MPMBP）は，側鎖にNを含まず，Sを含有するメチルチオフェニルチオ基を持ち，ビスホスホネート共通の骨吸収抑制作用に加えて，抗炎症作用を持つことが示唆されている．本研究は，卵巣摘出術により骨量が減少したラットを用いてMPMBPを全身投与した場合の効果を検討した．【方法】12週齢雌性Sprague-Dawleyラットに卵巣摘出術（OVX）と擬似手術（Sham）を施行し，12週間の飼育後に骨粗鬆症モデルの確立を確認した．その後，OVX群は週1回，合計12 回，12 週間にわたって，各濃度のMPMBP（0.2，1.0，5.0 mgP/kg）もしくは0.9% NaClを各群10匹のラットに皮下注射し，テトラサイクリンおよびカルセインによる硬組織時刻描記を施した．屠殺後摘出した骨はmicro-CTにて解析するとともに，非脱灰切片および脱灰切片を作製し，組織学的に評価した．【結果】MPMBPの全身投与により，OVX群において骨量，骨密度の増加だけでなく，骨梁の機械的強度が増加した．MPMBPはOVXによるカテプシンK陽性破骨細胞の増加を抑制し，さらに，骨髄の脂肪細胞の数と大きさを減少させた．MPMBPの投与により一次海綿骨の長軸方向の骨形成幅の増加は抑制されたが，骨幹端部の骨量と骨密度は増加した．さらに，骨幹部皮質骨横断面においては内骨膜性骨形成幅が増加し，一次海綿骨でのタイプIコラーゲンの蓄積も増加した．【結論と考察】MPMBPは，エストロゲン欠乏性骨粗鬆症モデルラットにおいて，骨吸収を抑制するだけでなく骨形成を促進し，骨髄における脂肪細胞増加を抑制する作用を有することが示唆された．炎症性サイトカインの関与が示唆されている閉経後骨粗鬆症の骨量改善に対して，抗炎症作用を持つMPMBPが有効であると考えられた．【会員外共同研究者】昭和大　薬　薬化学　伊藤　喬，金光卓也　**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanism of action of a novel bisphosphonate that increases bone mass in OVX rats

○Takizawa A[1,2], Chiba M[2,4], Ota T[2], Yasuda M[1,2], Suzuki K[3], Shinoda H[4], Igarashi K[1]

[1]Div Oral Dysfunction Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, [4]Ctr for Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

The novel bisphosphonate（BP）disodium dihydrogen-4-［(methylthio) phenylthio］methanebisphosphonate（MPMBP）is a non-nitrogen-containing compound, possessing a sulfur moiety within one of the side-chains, which confers anti-inflammatory properties upon it. The aim of this study was to investigate the systemic effects of MPMBP on the bone loss induced by ovariectomy（OVX）in rats. Micro-computed tomography revealed that administration of MPMBP to OVX model rats increased bone mass and density both in the metaphysis and the diaphysis of the examined tibiae compared with control treated animals. In addition, improved structural properties of bone mechanical strength were noted in MPMBP-treated animals. Bone labeling with tetracycline and calcein indicated that MPMBP treatment of OVX osteoporotic models decreased the longitudinal growth of the primary spongiosa, yet stimulated cortical bone formation in the diaphysis compared with controls. The administration of MPMBP increased type I collagen accumulation in the primary spongiosa and decreased both the number of bone marrow adipocytes and cathepsin K-positive osteoclasts in OVX rats. In conclusion, we suggest that MPMBP may act to stimulate bone formation and inhibit both bone resorption and bone marrow adipogenesis to provide a net increase in bone mass in cases of estrogen-deficiency induced bone loss.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B7　ミエロペルオキシダーゼ系によるコリンエステラーゼの傷害

○尾西みほ子[1]，小田島武志[2]

[1]北医療大　歯　生化
[2]札幌基礎医学教育学研究所

コリンエステラーゼはアセチルコリンをコリンと酢酸に加水分解する酵素である．我々はコリンエステラーゼに対するミエロペルオキシダーゼの関与を調べる目的で本研究を行った．その結果，コリンエステラーゼがミエロペルオキシダーゼ系，すなわちミエロペルオキシダーゼ，過酸化水素およびクロライドからなる系によって不活性化されることを *in vitro* 実験で確認した．コリンエステラーゼ活性は Ellman らの方法で測定した．アセチルチオコリンから遊離するチオコリンを 5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）によって検出するという方法である．pH 5.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液にコリンエステラーゼ，塩化ナトリウム水溶液，過酸化水素およびミエロペルオキシダーゼを順に加えて 25℃で 5 分間インキュベートし，反応停止のためにミエロペルオキシダーゼの阻害剤であるアジ化ナトリウム溶液を加えた．このミエロペルオキシダーゼ系とインキュベートしたコリンエステラーゼはコリンエステラーゼ活性を示さなかった．コリンエステラーゼとインキュベートするミエロペルオキシダーゼ系のうち，塩化ナトリウム，過酸化水素あるいはミエロペルオキシダーゼのいずれかを欠くとコリンエステラーゼはその活性を示した．この結果はコリンエステラーゼに対してミエロペルオキシダーゼ系が関与する可能性を示唆した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Injury of cholinesterase by the myeloperoxidase, hydrogen peroxide and chloride system in vitro

○Onishi M[1]，Odajima T[2]

[1]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido
[2]Sapporo Research Institute Basic Medicine Pedagogy

Cholinesterase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of acetylcholine into choline and acetic acid. We reported the fact that myeloperoxidase, hydrogen peroxide and chloride system inactivated the eel cholinesterase *in vitro*. The activity of cholinesterase was determined by the method of Ellman *et al.* in which thiocholine, released from acetylthiocholine by acetylcholinesterase, reacts with 5, 5'-dithiobis（2-nitrobenzoic acid）to form a yellow product. Cholinesterase, chloride, hydrogen peroxide and myeloperoxidase were added in turn in an acetate buffer of pH 5.5 and incubated 5 min at 25C and then sodium azide was added. This solution exhibited no activity of cholinesterase. When any one of components of myeloperoxidase system, hydrogen peroxide, chloride and myeloperoxidase, was omitted, cholinesterase activity was observed. This fact suggests the possibility of the participation to the cholinesterase activity by the myeloperoxidase system.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B8　マーモセットの NK 関連分子のクローニング

○小笠原康悦

東北大　院歯　難治　口腔免疫

【目的】実験動物を用いた介入実験は創薬において必須である．これまで，実験動物として，マウス，ラットなどげっ歯類が多く用いられてきた．特にマウスは遺伝子改変のしやすさや飼育のしやすさなどの理由で，現在でも広く用いられている実験動物である．しかし，薬剤による介入実験では，マウスで効果があるとしても，ヒトで効果が見られるとは限らない．薬剤の効果は，ヒトとマウスとでは異なっている．そのため，よりヒトに近い種，霊長類を用いた介入実験が必要であると考えられている．マーモセットは，新世界サルであり，個体も比較的小さく，おとなしい性格から扱いやすいため，医学生物学的実験や前臨床試験において実験動物として利用されている．しかし，免疫学的解析を行うためには，そのツールが整っておらず，特に NK 細胞については全くない．NKG2D は，ヒトにおいて全ての NK 細胞で発現しており，最も重要な NK 活性化受容体である．我々は，マーモセットで NK 細胞を解析できるようにするために，マーモセット NK 関連分子のクローニングを試みた．【方法】マーモセットの各臓器より，total RNA を抽出し，逆転写酵素を用いて cDNA ライブラリーを作成した．このライブラリーを用いて，分子生物学的手法を用いてマーモセット NKG2D, およびそのリガンドのクローニングを行った．【結果と考察】マーモセット NKG2D のクローニングに成功し，マーモセット NKG2D はヒトと類似した塩基配列であることが明らかになった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Cloning of NK-related molecules in marmoset

○Ogasawara K

Dept Immunobiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Experimental animals have been used for intervention experiments, which is essential in drug discovery. So far, many rodents, such as mice and rats have been used as experimental animals for preclinical research. If a medicine is effective in mice, the medicine is not always effective in humans. The drug effect of rodents is different from that of humans. Therefore, it is necessary to use primates as experimental animals for preclinical research. Since marmoset is a New World monkey used for biomedical and preclinical research due to its size, availability, ease of handling and maintenance as experimental animals. However, immunological tools, especially NK cells, are not equipped in marmoset. NKG2D is expressed on all NK cells in humans and NKG2D is a most important activating receptor on NK cells. Thus, we performed to identify and characterize marmoset NKG2D gene.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B9　反復抗原塗布後における舌下粘膜樹状細胞の特徴

○大野　建州，Kang Siwen，東　みゆき

医科歯科大　院医歯　分子免疫

舌下粘膜は，花粉症などのアレルギー治療のための舌下免疫療法の抗原塗布部位として使用されている．しかしながら，舌下粘膜樹状細胞（SLM-DC）の関与については明らかになっていない．我々は，定常状態で存在するSLM-DCの密度は，頬粘膜および舌背粘膜と比較し明らかに少なく，抗原塗布により，粘膜下樹状細胞が早期にリクルートするが，24時間後にはほとんど消失していることを報告してきた．本発表では，抗原の舌下粘膜への反復塗布により誘導される特殊なマクロファージ様細胞の出現とT細胞寛容について報告する．舌下粘膜への反復抗原塗布は，SLM-DCsの枯渇と樹状突起の少ない円形の$CD11b^{high}CD206^{high}CD11c^{low}$細胞優位状態へのフェノタイプ変化を誘導した．反復抗原塗布がT細胞免疫寛容を誘導するかどうかを確かめるために，免疫不全RAG2KOマウスに第1抗原としてFITC反復塗布を行いその後，エフェクターT細胞ソースとして蛍光色素で標識したDO11.10TCR/RAG2KOマウス由来$CD4^{+}$T細胞を移入し，第2抗原として舌下粘膜にOVAを塗布した．3日後の所属リンパ節におけるDO11.10 T細胞の増殖とサイトカイン発現を解析したところ，OVA特異的T細胞の分裂とIFN-γ産生はFITC反復抗原塗布により明らかに抑制されていた．また，$Foxp3^{+}$制御性T細胞は逆に増加していた．実際に，スギ花粉症マウスにスギ花粉エキスの舌下免疫療法を行うと，舌下粘膜に$CD11b^{high}$マクロファージ様細胞が誘導され，花粉抗原に対するT細胞応答の低下と抗原提示細胞の共刺激分子低下が確認できた．本結果から，安全な抗原の舌下粘膜への反復塗布により，舌下粘膜の寛容状態を前もって誘導しておくことで，より安全な舌下免疫療法が可能となる可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of sublingual dendritic cell after antigen painting

○Ohno T，Kang S，Azuma M

Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

The sublingual mucosa（SLM）is utilized as the site for sublingual immunotherapy（SLIT）to induce tolerance against allergens. The contribution of SLM-dendritic cells（SLM-DCs）has not been clarified. We found that repeated antigen（Ag）-painting onto SLM induced unique $CD206^{high}CD11c^{low}$ round-type cells and induced inhibition of antigen-specific T cell responses assessed by lower proliferation and IFN-g expression and higher generation of $Foxp3^{+}$ regulatory T cells. In the Japanese cedar pollinosis murine model, SLIT inhibited antigen specific T cell activity and clinical symptoms, and decreased the expression levels of co-stimulatory molecules on antigen presenting cells. Our results suggest that repeated safe-Ag painting before the SLIT using specific allergens induce tolerogenic status in the SLM.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B10　制御性 T 細胞を誘導する口腔樹状細胞の同定

○田中　志典[1,2]，福本　　敏[1]，菅原　俊二[2]

[1]東北大　院歯　小児歯
[2]東北大　院歯　口腔分子制御

【目的】舌下免疫療法は抗原（アレルゲン）を舌下粘膜から吸収させ，全身に免疫寛容を誘導し症状の改善を図る減感作療法であり，花粉症治療に有効である．一般に，花粉などのアレルゲンに対する免疫寛容の成立にはアレルゲン特異的な制御性 T 細胞の誘導が重要であると考えられている．しかし，舌下免疫療法における制御性 T 細胞誘導機構の詳細，例えばそれに関与する抗原提示細胞サブセット，は明らかでない．本研究は，制御性 T 細胞誘導能を有する口腔抗原提示細胞サブセットの同定を目的とした．【方法】マウス口腔粘膜（舌および舌下組織）を採取し，酵素処理により浮遊細胞に分散し，フローサイトメトリー解析を行った．細胞のレチノイン酸産生能は ALDEFLUOR 試薬を用いて測定した．In vitro 制御性 T 細胞誘導実験では，卵白アルブミンペプチドの存在下，卵白アルブミン特異的 OT-II ナイーブ CD4 陽性 T 細胞と抗原提示細胞を共培養した．【結果】フローサイトメトリー解析により，マウス口腔抗原提示細胞をランゲルハンス細胞，樹状細胞，マクロファージに分類することができた．レチノイン酸は制御性 T 細胞の誘導を促進する因子として知られているため，これら抗原提示細胞のレチノイン酸産生能を解析したところ，特定の樹状細胞サブセットが高いレチノイン酸産生能を示した．さらに，レチノイン酸産生性口腔樹状細胞は in vitro で効率的に制御性 T 細胞を誘導した．【考察】以上の結果から，レチノイン酸産生性口腔樹状細胞が舌下免疫療法における制御性 T 細胞誘導を担っていると考えらえる．本研究は，これらの樹状細胞による抗原取り込みを促進できれば舌下免疫療法の治療効果を高められる可能性があることを示唆している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Induction of regulatory T cells by oral dendritic cells

○Tanaka Y[1,2]，Fukumoto S[1]，Sugawara S[2]

[1]Div Pediat Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

**Purpose:** Sublingual immunotherapy（SLIT）is safe and efficient for the treatment of type 1 allergies, but the underlying immunological mechanisms, particularly the induction of regulatory T（Treg）cells, are still unclear. In this study, we tried to identify the subset of oral antigen-presenting cells with capacity to induce Treg cells. **Methods:** Cells were isolated by enzymatic digestion of murine lingual and sublingual tissues and analyzed by flow cytometry. Retinoic acid（RA）-producing activity in cells was assessed using the ALDEFLUOR reagent. For in vitro Treg cell induction, sorted antigen-presenting cells were co-cultured with ovalbumin-specific OT-II naive $CD4^+$ T cells in the presence of ovalbumin peptide. **Results:** Oral antigen-presenting cells could be classified into Langerhans cells, dendritic cells, and macrophages by flow cytometry. Because RA promotes the induction of Treg cells, we assessed the RA-producing activity in these cells. The expression of RA-producing activity was restricted to a subset of oral dendritic cells, which efficiently induced Treg cells in vitro. **Conclusion:** Our results suggest that RA-producing oral dendritic cells are responsible for the Treg cell induction in SLIT. Therefore, it is possible that targeting these dendritic cells may enhance the therapeutic effect of SLIT.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-B11 FcεRI 活性化は肥満細胞株 RBL2H3 におけるトリプトファン水酸化酵素の発現を促進する

○大橋　晶子，内藤　昌子，高橋　富久

日本大　歯　解剖Ⅰ

中枢神経系と末梢神経系における重要な神経伝達物質の 1 つであるセロトニンは，接触性アレルギー反応やアトピー性皮膚炎，さらに慢性消化管疼痛等の様々なアレルギー疾患の発症と進行に深い関わりを持つと考えられている．肥満細胞はアレルギーの発症にとって重要な働きをしている．すなわち，抗原-IgE 複合体が肥満細胞の細胞膜上に存在する IgE 親和性レセプターの FcεRI と結合することで，肥満細胞が活性化され，セロトニンやヒスタミンを含む炎症性物質を放出する．すでに，我々はヒトとマウスの肥満細胞がセロトニン合成に必須なトリプトファン水酸化酵素（TPH-1）を産生し，また肥満細胞株 RBL2H3 においても，FcεRI の活性化がセロトニン放出を促進し，それに追随し TPH-1 タンパクの発現を増加させることを報告している．肥満細胞における FcεRI の活性化は，カルシウムイオノフォア A23187（30 nM）によって代替できることから，本研究では RBL2H3 を A23187 で刺激し，TPH-1 タンパクと mRNA の発現パターンの相関について検討した．その結果，対照群では TPH-1 の異なる大きさの 4.0 kb と 1.8 kb の mRNA が検出された．一方，A23187 投与群では，TPH-1 タンパクの増加と相関して，1.8 kb mRNA のみの発現が誘導されたことから，1.8 kb の mRNA が TPH-1 の機能的な転写産物であることが明らかになった．本研究によって，FcεRI 刺激が大量のセロトニン放出を引き起こすと同時に，TPH-1 を介したセロトニンの新規合成の開始シグナルでもあることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Stimulation of FcεRI induces THP-1 expression in a Rat mast cell-like cell line, RBL2H3

○Ohashi A，Naito M，Takahashi T

Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent

Serotonin, an important neurotransmitter in the central and peripheral nervous systems, functions as inflammatory mediators containing histamine released from mast cells, when the immune complex of IgE and antigens binds to FcεRI. Activation of mast cells via stimulated FceRI causes a variety of allergic diseases such as atopic dermatitis or chronic abdominal pain. Our previous study demonstrated that rat mast-cell line, RBL2H3 expressed tryptophan hydroxylase-1（TPH-1）, an essential enzyme of serotonin biosynthesis and stimulation of FcεRI strongly increased the level of serotonin release, and subsequent induction of TPH-1 activity. TPH-1 has unique splicing variants consisted of 4.0-kb and 1.8-kb mRNAs, but the relationship between the expression levels of TPH-1 mRNA and protein is not well examined. Calcium ionophore, A23187, is able to induce activation of mast cells in a similar situation when FceRI is stimulated with the immune complex. Administration of A23187 in RBL2H3 showed progressive increase in 1.8-kb mRNA expression of TPH-1 in parallel with the induction of protein level derived from 1.8-kb mRNA but not 4.0-kb mRNA. These results suggest that the 1.8-kb mRNA of TPH-1 is the functional mRNA, and stimulation of FcεRI not only serotonin releases but also needs serotonin biosynthesis in mast cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C1 ラット咬筋神経損傷後の三叉神経運動核におけるミクログリアとアストロサイトの動態

○小倉　秀[1,2]，本間　志保[1,3]，脇坂　聡[1]，古郷　幹彦[2]

[1]大阪大　院歯　口腔解剖 1
[2]大阪大　院歯　口腔外科 1
[3]梅花女大　看護保健　口腔保健

末梢神経損傷が様々な感覚・運動障害を引き起こすことは知られている．末梢神経損傷はニューロンだけでなく周囲のグリア細胞にも影響を及ぼすことは近年の研究でも立証され，ニューロンとグリア細胞間，グリア細胞間同士の相互作用が損傷後の機能障害に重要な役割を担っているのではないかと考えられている．本研究では，ラット咬筋神経切断後の三叉神経運動核（Vmo）におけるグリア細胞（ミクログリア，アストロサイト）の動態について検討した．生後 6 週令の SD 系ラットに対し，片側の咬筋神経切断術を施行し，ミクログリアのマーカーとして Iba1，アストロサイトのマーカーとして GFAP を免疫組織化学的に検索した．Iba1 陽性細胞は正常動物では Vmo に均一に認められるが，神経切断後は損傷ニューロンの近くに集積した．損傷後の Iba1 陽性細胞は枝分かれした形状からアメーバ様の形状に変化し，数も増加し，損傷後 3～5 日で最高値に達し，損傷 28 日にはほぼ正常な状態まで回復した．一方，GFAP 陽性細胞は正常動物の Vmo ではまばらに存在し，神経切断後から数が増加し損傷 5～7 日で最大に達した．損傷ニューロン周囲の GFAP 陽性細胞は，正常と比較して細胞突起が長くなっていた．損傷後の Vmo での GFAP 陽性細胞の変化は，損傷 28 日でも認められた．以上の結果より，神経損傷によりミクログリアとアストロサイトは共に形態的変化を引き起こし，それぞれの形態変化には時間差が存在することが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Behavior of microglia and astrocyte in trigeminal motor nucleus following masseteric nerve injury in the rat

○Ogura H[1,2]，Honma S[1,3]，Wakisaka S[1]，Kogo M[2]

[1]Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]First Dept Oral Maxillofacial Surgery, Osaka Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Oral Health Sci, Fac Nursing and Health Care, Baika Women's Univ

It is known that peripheral nerve injury causes various sensory and motor dysfunctions. Evidences are accumulating that peripheral nerve injury damages not only neurons but also surrounding glial cells, indicating neuronal-glial and glial-glial interactions may play important roles for injury-evoked dysfunctions. In the present study, we examined the behavior of glial cells in the trigeminal motor nucleus following transection the masseteric nerve（MassNx）in the rat. Unilateral MassNx was applied to 6-week-old Sprague-Dawley rats, and immunohistochemistry for Iba1, a marker for microglia, and GFAP, a marker for astrocyte, was performed. Iba1-immunoreactive（-IR）microglia were evenly distributed in the normal animals, and accumulated near the injured neurons following MassNx. They changed their morphology from ramified type to ameboid type, and increased in number, reaching the maximal level at 3-5 days following injury, and returned almost normal at 28 days post-injury. GFAP-IR astrocytes were found sparsely in the normal animals, and their number increased after transection with a maximal level around 5-7 days. GFAP-IR astrocytes around the injured neurons extended their processes. These changes were observed even 28 days after MassNx. The present results indicate that peripheral injury evoked the morphological changes in both microglia and astrocytes under different time course.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C2　ラット口腔顔面領域における TRPM8 陽性神経線維の分布

○矢島　健大[1]，佐藤　　匡[2]，市川　博之[2]

[1]東北大　院歯　歯科保存
[2]東北大　院歯　口腔器官構造

【目的】Transient receptor potential melastatin-8（TRPM8）は感覚神経節の小型ニューロンに存在し，8～25℃の冷刺激やメントール刺激で活性化し，冷覚や痛覚をもたらす．舌や咽頭などに分布していることが知られているが，その他口腔顔面領域での分布は詳しく知られていない．本研究では，口腔顔面領域における TRPM8 の分布について分析した．
【材料と方法】歯肉，口蓋，切歯乳頭，口唇，歯根膜，顎関節，大唾液腺，咀嚼筋について TRPM8 の免疫染色を行った．痛覚の伝達に関与する calcitonin gene-related peptide（CGRP）の免疫染色も行い比較すると共に，TRPM8 と CGRP との蛍光二重免疫染色を行った．また TRPM8 陽性神経線維の由来を知るため，逆行性トレーサーである Fluorogold（FG）を歯肉と切歯乳頭に注入し，三叉神経節における TRPM8 と CGRP の関係を調べた．
【結果】歯肉，切歯乳頭，口蓋粘膜，口唇では TRPM8 陽性神経線維が認められた．歯肉では外縁上皮や歯肉稜で豊富に認められた．一方，CGRP 陽性神経線維は付着上皮で豊富に観察された．切歯乳頭では上皮や味蕾に TRPM8 や CGRP を含む神経線維が存在していた．歯根膜，顎関節，大唾液腺，咀嚼筋においては CGRP 陽性神経線維のみ観察された．分析した全ての組織において TRPM8 と CGRP との共存は認められなかった．FG を用いた実験により，歯肉や切歯乳頭で TRPM8 陽性神経線維は，三叉神経節の小型ニューロン由来であることが明らかとなった．
【考察】TRPM8 陽性神経線維は歯肉・口蓋・口唇に認められ，これらは三叉神経節由来であることが示唆された．三叉神経系において，CGRP は外部受容器と内部受容器に発現し，TRPM8 は外部受容器にのみ発現すると考えられる．さらに TRPM8 は口腔粘膜や顔面皮膚からの冷刺激・侵害刺激・化学的刺激の伝達に関与することが推測された．
【会員外共同研究者】齋藤正寛・島内英俊（東北大）細川浩（京都大）近藤照義（九州保健福祉大）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures

○Yajima T[1]，Sato T[2]，Ichikawa H[2]

[1]Div Operative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Transient receptor potential melastatin-8（TRPM8）is a cold and menthol receptor which is located in the sensory ganglia. In the trigeminal ganglion, many small neurons contain TRPM8. In this study, immunohistochemistry for TRPM8 was performed on oral and craniofacial structures to know distribution and function of TRPM8 in the trigeminal sensory system. TRPM8-immunoreactive（-IR）nerve fibers were abundant in the gingiva and incisive papilla. In the gingiva, TRPM8-IR nerve endings were detected beneath and within crestal and outer epithelia. However, only a few TRPM8-IR nerve fibers were detected in junctional or sulcular epithelia. In the incisive papilla, TRPM8-IR nerve fibers were located beneath and within taste buds. TRPM8-immunoreactivity was also expressed by some taste bud cells in the papilla. Lips, periodontal ligaments and salivary glands as well as masticatory muscles and temporomandibular joints were mostly devoid of TRPM8-IR nerve fibers. Double immunofluorescence study indicated different distribution patterns of nerve fibers containing TRPM8 and calcitonin gene-related peptide in all the examined tissues. In addition, retrograde tracing method indicated that TRPM8-IR nerve fibers in the gingiva and incisive papilla originate from small sensory neurons in the trigeminal ganglion. TRPM8 may be correlated to cold, nociceptive and chemoreceptive transmission in the oral mucosa.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C3 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤

○吉本　怜子[1]，合島怜央奈[2]，吉住　潤子[3]，木附　智子[3]，檀上　　敦[4]，山下　佳雄[4]，城戸　瑞穂[5]

[1]九大　院歯　歯周病，[2]佐賀大　医　組織　神経解剖，[3]九大　院歯　顔面口腔外科，[4]佐賀大　医　歯科口腔外科，[5]九大　院歯　分子口腔解剖

【目的】シェーグレン症候群(SS)患者は，眼球および口腔乾燥症状を主訴とするが，中には，臨床的に唾液減少が認められないにも拘わらず，口腔内の痛覚過敏を訴える者が存在する．これまでSSについては，唾液腺の障害についての研究が多いが，粘膜上皮に着目し組織学的な検討を行った研究は見当たらない．私たちは，SS患者の生検病理組織検査において粘膜上皮内に水腫性変性が散在することに着目し，唾液腺の障害のみならず，粘膜上皮組織における障害が病態に影響を与えている可能性を考え，免疫系細胞浸潤と唾液腺病変の関連および他の臨床的データとの関係を解析した．【方法】九州大学の倫理委員会の承認の下，SS患者の口唇腺生検の余剰組織のHE染色を行った．さらに上皮細胞の細胞間接着や細胞骨格制御に関わる事が知られているカルシウムイオンチャネルTransient Receptor Potential Vanilloid 4（TRPV4）およびマクロファージなどの炎症性細胞について免疫染色を行った．対照群として粘液嚢胞患者の組織を用いた．【結果と考察】SSと診断された患者の口唇粘膜上皮には水腫性変性が散在し，上皮内および上皮下結合組織には多数のマクロファージ浸潤が認められた．マクロファージの上皮層内への浸潤数は口腔内乾燥感や灼熱感のある群で有意に多かった．サクソンテストによる刺激唾液の量と水腫性変性の頻度とは相関が認められなかったことから，粘膜の乾燥に起因する現象ではないことが示唆された．また，マクロファージは口唇腺組織にも浸潤を認めたことから，粘膜上皮の変性は唾液腺病変と関連している可能性がある．さらに，TRPV4発現は粘膜上皮全層に認められたが，特に正常粘膜上皮の有棘細胞層に顕著であった．さらに，口唇腺にもTRPV4発現が認められた．TRPV4発現は変性部位においては減少していた．TRPV4は細胞間接着の調節や水分子の移動に関与しているとの報告があり，水腫性変性との関連も疑われる．**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Degeneration and macrophage infiltration of labial mucosal epithelium in xerostomia patients

○Yoshimoto RU[1]，Aijima R[2]，Yoshizumi J[3]，Kitsuki T[3]，Danjo A[4]，Yamashita Y[4]，Kido MA[5]

[1]Dept Periodontol, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ，[2]Dept Anat Physiol, Saga Med Sch，[3]Dept Oral Maxillofacial Surg, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ，[4]Dept Oral Maxillofacial Surg, Saga Med Sch，[5]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ

［Purpose］One of the main features of Sjogren's syndrome is decreased secretion of saliva. However, burning sensation complained by SS patients may not always be associated with reduced saliva. Although there have been accumulating evidences about glandular lesion of SS, reports concerning histological mucosal changes are few. Since we found hydropic degeneration among oral epithelia in biopsy samples from SS patients, we hypothesized that changes in oral mucosa may also affect SS's pathophysiology. ［Materials & Methods］Under the approval of the Kyushu University Institutional Review Board for Clinical Trials and for Human Genome/Gene Research, we obtained labial mucosa from SS and mucocele patients. We analyzed histopathological changes and clinical findings. ［Results & Conclusions］Mucosal epithelium of SS patients showed scattered hydropic degeneration and infiltration of substantial number of macrophages. Intraepithelial macrophage infiltration was prominent in the group of patients complained burning sensation. The increased number of intraepithelial macrophages did not correlate statistically with decreased saliva flow, suggesting that it does not result from oral dryness. Furthermore, mucosal epithelia and labial glands expressed TRPV4, but hydropic degenerated epithelia expressed little. Since TRPV4 is reported to associate with cell-cell adhesion and water efflux, decreased TRPV4 may play a part in epithelial degeneration. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C4 機械的荷重によるインプラント周囲骨のオステオネットワークと生体アパタイトの優先配向の変化

○佐々木宗輝[1]，黒嶋伸一郎[1]，中野　貴由[2]，澤瀬　　隆[1]

[1]長崎大　院医歯薬　口腔インプラント
[2]阪大　院工　生体材料

［緒言］骨細胞は骨基質中で骨細胞同士や骨芽細胞と細胞性ネットワークを形成し，機械的負荷に対する骨組織の反応をコントロールしている．近年，骨基質中の生体アパタイト結晶の配向性が骨に加わる応力により変化する事が報告された．しかしながら，インプラントを介した応力が骨細胞・骨細管系や生体アパタイト結晶の配向性に与える影響は明らかになっていない．そこで我々はインプラントを介した機械的応力が骨基質に与える影響を明らかにすることを目的に，骨細胞・骨細管系の超微細構造と生体アパタイト結晶の配向性を検索した．［材料と方法］日本白色家兎の脛骨近心端に，陽極酸化された Ti-6Al-4V 合金歯科用インプラントを埋入し，埋入後 12 週から 50N，3 Hz，1800 サイクルの負荷を週に 2 日，8 週間与えた．屠殺後，一塊として摘出されたインプラントと脛骨を浸漬固定後，通法に従いレジン包埋を行った．レジン包埋試料は，走査型電子顕微鏡と微小領域 X 線回折装置による観察を行った．［結果と考察］荷重群では骨細胞数と骨細胞当たりの細胞突起数の増加が認められ，また，インプラント長軸に対する生体アパタイト結晶の優先配向角度が優位に変化した．一方，生体アパタイト結晶の配向性は，非荷重群では骨細胞の長軸と配向性がほぼ一致しているのに対して，荷重群では骨細胞の長軸と配向性が一致していなかった．以上から機械的荷重によって骨細胞・骨細管系が発達する事が認められた．一方，非荷重群で認められた生体アパタイト結晶の配向性と骨細胞との規則性は認められなかったことから，荷重群ではインプラント周囲骨組織が機械的荷重によって活発なリモデリングが行われているものと考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Altered osteocyte network and preferential alignment of biological apatite c-axis around loaded implants in rabbits

○Sasaki M[1]，Kuroshima S[1]，Nakano T[2]，Sawase T[1]

[1]Dept Appl Prosthdont, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Div Mater and Manu Sci, Grad Sch Eng, Osaka Univ

［Introduction］Osteocyte network plays an important role in responding to mechanical loading. It has been demonstrated that crystallographic orientation of biological apatite（BAp）in bone matrix is associated with mechanical strength of bone. However, the effect of mechanical loading on bone around implant is unclear. The aim of this study was to investigate ultrastructural osteocyte morphology and BAp via loaded implants. ［Materials and Methods］Anodized Ti-6Al-4V alloy dental implants were placed in the proximal tibia metaphysic of rabbits. Twelve weeks after surgery, mechanical loading was applied along the long axis of the implant（50 N, 3 Hz, 1,800 cycles, 2 days/week）. Eight weeks after the initiation of load, bone including implants were dissected. Scanning electron microscopy and microbeam X-ray diffractometer were used to perform the quantitative analyses for osteocyte morphology and crystallographic orientation of BAp. ［Results and Conclusions］In loading group, osteocyte numbers and cell processes were significantly increased. Angle of preferential alignment of BAp to implant long axis was significantly changed. The long axis of osteocyte was consistent with preferential alignment of BAp in control group. Therefore, the lacuno-canalicular system developed by mechanical loading, suggesting that continuous bone remodeling would occur in bone around loaded implants.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C5　口腔 *Rothia* 属細菌における硝酸還元活性の株間差異についての検討

○真下　千穂，南部　隆之

大阪歯大　細菌

【背景】近年急速に発展したメタゲノム解析の実験研究により，口腔アクチノバクテリアである *Actinomyces* 属や *Rothia* 属細菌は，歯周組織健常者の口腔常在細菌叢のコアメンバーであることが明らかになってきた．我々は，この現象の原因のひとつが，口腔アクチノバクテリアがもつ高い硝酸還元活性であると考え，*Porphyromonas gingivalis* に対する殺菌効果を明らかにしてきた．口腔内では *Rothia* 属が最も高い硝酸還元活性を有しているので，本研究では口腔より分離した *Rothia mucilaginosa* を対象に硝酸還元活性の差異を検討した．【方法】 *R. mucilaginosa* 選択培地（RMSM）および *R. mucilaginosa* 特異的プライマーを用いた PCR 法で舌背より分離した株および ATCC25296 株を対象とした．硝酸還元活性は以下の 2 つの方法により測定した．1．固型培地に発育したコロニー上に，硝酸カリウム（$KNO_3$）を含む寒天培地，Griess 試薬を含む寒天培地を重層し，硝酸還元酵素により生成した亜硝酸イオン（$NO_2^-$）を呈色することにより視覚化した．2．静置で一晩培養した菌液を希釈後，嫌気条件下で硝酸ナトリウム（$NaNO_3$）を添加し，消費された $NO_3^-$ と生成した $NO_2^-$ の経時的な変動を $NO_x$ アナライザー（ENO-20，エイコム社）にて計測した．【結果と考察】口腔より分離した *R. mucilaginosa* の硝酸還元活性には株間による差異が認められた．この差異は硝酸還元遺伝子自身の差であるのか，もしくは発現調節の差であるのか今後明らかにしていく必要がある．さらに，口腔に存在するアクチノバクテリアにおける詳細な硝酸還元活性を調べていくことも重要である．本研究は口腔アクチノバクテリアが口腔健康に寄与するメカニズムを明らかにするための一端を担うと考える．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Nitrate-reducing activity variations in oral *Rothia* spp.

○Mashimo C，Nambu T

Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ

Recent metagenomics studies have shown a strong correlation between the presence of oral Actinobacteria（*Rothia* spp. and *Actinomyces* spp.） within oral subgingival bacterial communities and the periodontal health. We hypothesize that this correlation is partially resulted from the microbicidal efficacy of nitrate-reducing system in Actinobacteria and demonstrated that *Actinomyces oris* kills *Porphyromonas gingivalis* in a nitrate-dependent manner. In this study, we isolated three *Rothia* spp. from dorsal surface of the tongue and tested Griess reaction assay on them. We interestingly found that they exhibited different nitrate-reducing activity. It is now on-going to investigate whether this different activity is caused by gene expression levels or genes themselves.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C6　形質転換可能な Rothia 属菌株の分離とゲノム解読

○南部　隆之，真下　千穂

大阪歯大　細菌

口腔や咽頭に常在する *Rothia* 属細菌は，まれに難治性根尖性歯周炎，菌血症，心内膜炎，髄膜炎を引き起こす日和見感染症の病原体として知られている．また，緑膿菌と並び嚢胞性線維症（cystic fibrosis）患者における肺炎の起因菌としても注目されている．一方，このような病原菌としての側面と対称的に，硝酸代謝依存的に歯周病原菌を殺菌したり，血圧コントロールに関与するなどの善玉菌としての側面も持ち合わせていることが明らかになってきた．このような二面性を詳細に解析するため，我々は *Rothia* 属細菌の遺伝子改変系の構築を試みている．まず，以前我々が *Rothia* 属細菌として初めてゲノム解読に成功した *R. mucilaginosa* DY-18 株の遺伝子改変を試みたが，本株は遺伝子導入効率が非常に低く，系の構築には不適と判断した．そこで，口腔より *R. mucilaginosa* 選択培地を用いて新規に菌株を分離し，スクリーニングにより広宿主域プラスミド pJRD215 やトランスポゾン Ez-Tn5 を高効率で導入可能な NUM-Rm6536 を分離した．本菌株は，非常に高い硝酸還元活性を有しており，*Rothia* 属細菌解析のモデル株として適切と考え，ゲノム解読を試みた．精製した染色体 DNA から一分子リアルタイムシークエンサー PacBio RS II（Pacific Biosciences）を用いて完全長ゲノム配列を取得し（平均 222 カバレッジ），RAST システムでアノテーションを行った．現在，遺伝子改変系の構築といくつかの遺伝子の欠失株の作成を試みている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Genome sequencing of *Rothia mucilaginosa* NUM-Rm6536, a strain with high transformation efficiency

○Nambu T，Mashimo C

Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ

*Rothia* is known as a member of commensal bacterial flora in the oral cavity and the upper respiratory tract. Although several studies have suggested that this organism is a member of healthy microbiota, there have been an increasing number of reports on infections caused by *Rothia*, especially among immunocompromised patients. On the other hand, it has been reported that this organism keeps our cardiovascular system in good condition and kills periodontal pathogens by supplying nitrite by their nitrate reducing activity. In this study, we isolated *R. mucilaginosa* NUM-Rm6536, a strain with high transformation efficiency, and sequenced by third-generation sequencing technology. Genomic DNA of NUM-Rm6536 was extracted from an overnight culture and the genome was sequenced using a PacBio RS II system（Pacific Biosciences）on a single-molecule real-time（SMRT）cell using PacBio P6-C4 chemistry, resulting in a single contig of 2,292,716-bp in size with an average coverage of 222.27. This genome was then annotated by RAST（Rapid Annotation using Subsystem Technology）version 2.0, which successfully identified 1,762 coding sequences, as well as 59 RNA sequences. Of these, 45% of the annotated coding sequences fell within 280 subsystems available in the RAST database.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C7 Fructanase による *Streptococcus mutans* の Quorum sensing 阻害メカニズムの解析

○鈴木　雄祐[1,2]，荒井　俊明[2,3]，小倉　直美[1]，近藤　壽郎[1]，泉福　英信[2]

[1]日大松戸歯　顎顔面外科
[2]感染症研 細菌一
[3]鶴見大　歯　口腔顎顔面外科

【目的】*Streptococcus mutans* はう蝕の主な原因菌であり，口腔バイオフィルム形成に密接に関係している．バイオフィルム形成において，Quorum sensing（QS）は重要な因子の一つである．*S. mutans* の com 依存 QS は，ストレス環境下で発動され，competence-stimulating peptide（CSP）により制御され，グルカンに依存しない細菌の生存に関与している．近年，*Streptococcus salivarius* の培養上清から Fructanase が同定され，スクロースを分解することで *S. mutans* のバイオフィルム形成を阻害することが報告された．しかし，スクロース以外の糖源によるバイオフィルム形成も阻害した．そこで，本研究では，com 依存 QS における Fructanase の効果を検討した．【方法】TSB 培地，0.25%スクロース添加，0.25%グルコース添加，0.25%フルクトース添加 TSB 培地に，Fructanase を加え，*S. mutans* を接種し，ヒト唾液コート 96 穴マイクロタイタープレートを用いた静止系バイオフィルム形成実験を行った．また，*S. mutans* における Fructanase の CSP 依存的な阻害効果をバクテリオシン産生と遺伝子形質転換にて検討した．【結果】Fructanase は，全ての培地で *S. mutans* のバイオフィルム形成を阻害した．また，CSP 依存的なバクテリオシン産生を濃度依存的に阻害した．CSP に Fructanase を直接作用させても形質転換を阻害しなかったが，菌表層に作用させると形質転換を阻害した．【考察】Fructanase は，スクロースを分解すること以外にバイオフィルム形成阻害のメカニズムの存在が示唆された．そのメカニズムの一つに，菌表層に作用し QS を阻害することで，ストレス環境下における CSP 依存的なバイオフィルム形成を阻害することが示唆された．【結論】Fructanase は，菌表層に作用することで，com 依存 QS を阻害する．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effects of fructanase on the competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*

○Suzuki Y[1,2], Arai T[2,3], Ogura N[1], Kondoh T[1], Senpuku H[2]

[1]Dept Maxillofacial Surgery, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
[2]Dept Bacteriol 1, Natl Inst Infect Dis
[3]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Aims: *Streptococcus mutans* is an etiological agent for development of dental caries and plays an important role in oral biofilm formation. Quorum sensing（QS）system is one of important factors for biofilm formation and survival in severe condition. Com-dependent QS system is controlled by competence-stimulating peptide（CSP）, and associated with bacteriocin production and genetic transformation. Recently, we found an enzyme, fructanase from *Streptococcus salivarius*, which inhibited biofilm formation of *S. mutans*. In this study, we investigated new effects of fructanase on the Com-dependent QS system and biofilm formation. Materials and Methods: *S. mutans* was cultivated in tryptic soy broth without dextrose（TSB）, supplemented with 0.25% sucrose（TSBs）and 0.25% glucose（TSBg）and 0.25% fructose（TSBf）for the biofilm formation assay using human saliva-coated 96 well microtiter plate. Effects of fructanase mixture on the CSP-dependent bacteriocin production and genetic transformation were also examined. Results: Biofilm formation of *S. mutans* was inhibited by fructanase mixture in all media. Fructanase mixture inhibited CSP-dependent bacteriocin production, and genetic transformation in dose-dependent manner. Discussion: It was considered that fructanase inhibited sucrose-independent biofilm formation and CSP-dependent QS. Conclusion: Fructanase may have multiple effects on the QS system and biofilm formation to inhibit *S. mutans* survival.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C8 アシルオリゴペプチジルペプチダーゼ活性を有する歯周病原性細菌の新規ペプチダーゼ

○根本　孝幸，根本　優子

長崎大　院医歯薬　口腔生化

**【目的】**歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* はアミノ酸をジ-およびトリペプチドとして取り込み，炭素とエネルギー原とする．これまで 4 種類のジペプチジルペプチダーゼ(DPP)がジペプチドを産生し，さらに S9 セリンペプチダーゼ PGN_1349 も寄与していることを報告した．PGN_1349 はアミノ酸配列の相同性から酵母 dpf-6 ファミリーに分類されているが，その活性の実体は未知であった．今回，PGN_1349 が新規の基質特異性を持つことを明らかにした．**【方法】**PGN_1349 組換え分子を大腸菌で発現し，種々の合成基質を用いて酵素活性等を測定した．**【結果】**PGN_1349 は DPP ではなく，P1 位置に疎水性アミノ酸残基を要求するオリゴペプチダーゼであった．N 末端非修飾基質よりもアシル化基質に対して 10 倍以上高い活性を呈した．遊離するアシルオリゴペプチドはジペプチドが最もよく，次いでトリペプチド，テトラペプチドの順であったが，アシルアミノ酸を遊離する活性は極めて低かった．これらの結果から，同じ S9 ファミリーに属し，同様に P1 位置に疎水性アミノ酸を好むヒトおよび古細菌 *Aeropyrum* アシルアミノアシルペプチダーゼ(AAP)とは別酵素であると推定された．PGN_1349 と *A. pernix* AAP の相同性は 13.9%であるが，同菌の dpf-6 オルソログとの相同性は若干高い 15.6%であることからも，PGN_1349 が AAP とは異なる新規ペプチダーゼであると結論した．本遺伝子破壊 *P. gingivalis* 株は Z-KM-MCA や Z-LLL-MCA 分解活性を喪失した．**【結論】***P. gingivalis* には疎水性アミノ酸を P1 部位とし，ジペプチドやトリペプチドを遊離するアシルオリゴペプチジルペプチダーゼ(AOP)が存在する．AOP は細菌，古細菌，真核生物にも広く分布することが明らかになった．基質となる血漿タンパク質の多くは N 末ブロックされており，DPP がそれらを分解できないことを考慮すると，AOP の発現は本菌の歯周ポケットへの定着と増殖に深く関与するものと推察される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Novel peptidase from *Porphyromonas gingivalis* exerting acyloligopeptidyl peptidase activity

○Nemoto T，Ohara-Nemoto Y

Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

A periodontopathic asaccharolytic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*, incorporates amino acids mainly as di- and tri-peptides after trimming of oligopeptides by 4 dipeptidyl-peptidases (DPPs) and a tripeptidyl-peptidase. In the 2014 meeting, we reported that an oligopeptidase in *P. gingivalis*, encoded by PGN_1349, which belongs to the dpf-6 family uncharacterizedpeptidase, additionally contributes to this process. Here we report that PGN_1349 has a novel exo-oligopeptidase activity. PGN_1349 most potently released dipeptides followed by tripeptides with hydrophobic P1 residues from oligopeptides with blocked N-terminus more than 10-fold efficiently than un-blocked ones. This finding indicated that PGN_1349 was distinct from human and *Aeropyrum* acylaminoacyl peptidases, which release N-acylamino acids from N-terminally modified oligopeptides. Expression of this peptidase, designated acyl-oligopeptidyl peptidase (AOP), should be advantageous for colonization and growth of *P. gingivalis*, as of DPPs and tripeptidyl peptidase can deal with N-terminally blocked oligopeptides and most plasma proteins utilized by the bacterium are N-terminally blocked. Taken together, it was concluded that *P. gingivalis* is able to utilize most, if not all, extracellular oligopeptides as energy and carbon sources through the expression of AOP together with other exopeptidases. Dpf-6 family members are widely distributed in bacteria, archaea, and eukaryotes.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C9 クルクミンが *Porphyromonas gingivalis* ベシクルのヒト歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響

○泉井　秀介，永田　英樹，天野　敦雄

大阪大　院歯　予防歯科

【目的】歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の有力な病原因子である外膜ベシクルは宿主細胞のエンドサイトーシス経路を利用し，細胞に侵入する．天然生薬ウコンに含まれるポリフェノールの一種であるクルクミンは，歯周病菌に対する抗菌作用や抗炎症作用を有することが報告されているが，*P. gingivalis* ベシクルの細胞侵入に及ぼす影響については不明である．本研究は，クルクミンが *P. gingivalis* ベシクルのヒト歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした．また，熱ショックタンパク質 HSP72 は，細菌感染などのストレスから細胞を防御しアポトーシスを抑制する機能があることが明らかになってきている．そこで，クルクミンが歯肉上皮細胞における HSP72 の遺伝子発現に与える影響についても検討を加えた．【方法】8 穴プレートに培養したヒト歯肉上皮細胞（Ca9-22）に *P. gingivalis* OMZ314 株から精製したベシクルとクルクミンを加え，1 時間インキュベートした．線毛抗体を用いてベシクルを，オレゴングリーンを用いて細胞骨格を染色し，共焦点レーザー顕微鏡を用いてクルクミンがベシクルの Ca9-22 への侵入に及ぼす影響を調べた．また，Ca9-22 にクルクミンを添加することによる HSP72 の遺伝子発現量の変化をリアルタイム PCR で測定した．【結果】クルクミンは *P. gingivalis* ベシクルの Ca9-22 への侵入を濃度依存的に阻害した．また，クルクミンを添加することにより，Ca9-22 の HSP72 遺伝子発現量が増加した．【結論】クルクミンを歯周病予防素材として応用できる可能性が示された．【会員外共同研究者】阪大・院歯：関根伸一

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effect of curcumin on invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* outermembrane vesicles

○Izui S，Nagata H，Amano A

Dept Prev Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

**Objective:** Outermembrane vesicles, one of major virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*, invade host cells via endocytic pathway. Purpose of this study is to clarify the effect of curcumin, a polyphenol extracted from turmeric, on invasion of human cells by *P. gingivalis* vesicles. Moreover, heat shock protein HSP72 is known to be a stress marker under such circumstances as bacterial infection and inflammation. It becomes evident that HSP72 defends a cell against stress and to restrain apoptosis. Therefore, we also examined the influence of curcumin on the gene expression of HSP72 in human gingival epithelial cells. **Methods:** Ca9-22 were cultured in 8-well culture plates. Vesicles purified from *P. gingivalis* OMZ314 and curcumin were added to the culture and incubated for 1 hours. Vesicles were stained with anti-fimbriae antibodies and cytoskeleton was stained with Oregon Green. Effect of curcumin on the vesicle invasion of Ca9-22 was examined by confocal laser scanning microscopy. Expression of HSP72 mRNA in Ca9-22 with/without curcumin was measured with real-time RT-PCR. **Results:** Curcumin inhibited the cellular invasion by *P. gingivalis* vesicles in a dose-dependent manner, while expression of HSP72 mRNA in Ca9-22 was increased by curcumin. **Conclusion:** Curcumin may be a potent preventive agent for periodontal diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-C10 ETB 産生黄色ブドウ球菌が産生するバクテリオシンに対する自己耐性機構の解明

○松尾　美樹[1]，菅井　基行[2]，小松澤　均[1]

[1]鹿児島大　院医歯　口腔微生物
[2]広島大　院医歯薬保　細菌

【目的】黄色ブドウ球菌の産生する表皮剥脱毒素（ET）は，その血清型により ETA, ETB および ETD の 3 種類に分類される．ETB 産生株の持つプラスミド pETB 上には，表皮剥脱毒素をコードする遺伝子と，乳酸菌が産生するバクテリオシン関連遺伝子と相同性の高い遺伝子領域が存在しており，過去の報告から ETB 産生株ではバクテリオシン（C55）産生が認められている．本研究では，黄色ブドウ球菌 ETB 産生株の産生する C55 に対する自己耐性機構についての検証を行った．【方法】C55 に対する黄色ブドウ球菌株（ETB 産生株，非産生株，ETB 産生株由来 pETB 脱落株）の感受性検証は，direct 法を用いた．pETB 脱落 ETB 産生株に，シャトルベクターにて自己耐性に関与すると推測される遺伝子発現株を作製し，感受性試験を行った．さらに，ETB 産生株と非産生株および耐性遺伝子保有株を用いた共培養試験を行った．【結果と考察】C55 は pETB 非保有株にのみ抗菌活性を有したことから，pETB 上に C55 産生因子ならびに耐性因子が存在することが示唆された．そこで，pETB 上の遺伝子について検証した結果，*sac* オペロンが C55 産生性に，ABC トランスポーターをコードしている遺伝子（*orf46-47*）と機能未知の遺伝子（*orf48*）が耐性に関与していることが各々明らかになった．また，共培養試験の結果，pETB を持たない黄色ブドウ球菌は，耐性遺伝子を保有した株に比較し，ETB 株との共存時に優位に占有率が低下した．今回の結果から，ETB 産生株は pETB 上に C55 合成遺伝子と耐性遺伝子を保有していること，C55 バクテリオシンは pETB 非保有株との共培養時にその占有率に影響を与えることが明らかになった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## C55 bacteriocin produced by ETB-positive *Staphylococcus aureus* strains is a key factor for competition with ETB-negative *S. aureus* strains

○Kawada-Matsuo M[1]，Sugai M[2]，Komatsuzawa H[1]

[1]Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Dept Bacteriol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Exfoliative toxin（ET）produced by *Staphylococcus aureus* is associated with the onset of bullous impetigo. To date, three ETs（ETA, ETB and ETD）have been identified. The gene coding for ETB is located on the plasmid designated pETB. Previous reports have indicated that pETB-positive strains produce the C55 bacteriocin. In this study, we investigated the antibacterial activity of the bacteriocin produced by the pETB-positive strain TY4 against *S. aureus* strains. This bacteriocin demonstrated antibacterial activity against all pETB-negative strains but not pETB-positive strains. Additionally, the TY4- strain, from which the pETB plasmid was deleted in TY4, showed susceptibility to the bacteriocin. Further experiments revealed that two factors（*orf46-47* and *orf 48*）downstream of the bacteriocin synthesis genes in the pETB plasmid were associated with immunity against the C55 bacteriocin. TY4- with *orf46-47* showed complete resistance to bacteriocin, and TY4- with *orf48* showed partial resistance. We then investigated whether bacteriocin affected the proportion of each strain present when *S. aureus* strains were co-cultured. As the result, C55 bacteriocin produced by pETB-positive strains affects the proportion of pETB-negative strains.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D1　Galectin-9 による破骨細胞形成抑制機構：MafB 制御系関与の可能性

○久本由香里[1]，上原　範久[1]，久木田明子[2]，久木田敏夫[1]

[1]九大　院歯　分子口腔解剖
[2]佐賀大　医　微生物

【目的】Galectin-9 は，ガラクトースに対する結合特異性を有するタンデムリピートタイプのレクチンであり，好酸球や好中球，NK 細胞に対する走化性因子として作用することにより免疫応答や炎症を制御する．我々はこれまでに，培養破骨細胞において Galectin-9 が TRAP 陽性多核細胞の形成を阻害すること，さらにアジュバント誘導性関節炎ラットにおける骨破壊を顕著に抑制することを報告してきた．本研究では，Galectin-9 による破骨細胞分化抑制の詳細なメカニズムを解析した．【方法】マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系において，RANKL および Galectin-9 存在下で培養した細胞を回収し，リアルタイム PCR 法により破骨細胞分化マーカーの発現を比較した．また，破骨細胞分化に重要な転写因子の発現と核内移行に対する Galectin-9 の影響をウエスタンブロッティング法により解析した．【結果】マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系において，Galectin-9 曝露により *Trap* や *Cathepsin K* 等の破骨細胞分化マーカーの発現は有意に低下した．RANKL 刺激 24 時間で著明に上昇する NFATc1 のタンパク発現は，Galectin-9 を同時に曝露することにより顕著に減少したが，c-Fos，c-Jun および NF-$\kappa$B の発現と核内移行に変化は認められなかった．そこで，NFATc1 の発現を阻害する転写因子である MafB の発現を検討した．RANKL 刺激 24 時間では MafB の発現が顕著に抑制されたが，Galectin-9 を同時曝露するとその発現抑制が有意に軽減した．【考察】以上の結果から，Galectin-9 は AP-1 や NF-$\kappa$B 経路には影響を与えず，MafB の発現維持を介して NFATc1 の発現を制御することにより，破骨細胞分化を抑制する可能性が強く示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Galectin-9 negatively regulates osteoclast differentiation through control of MafB expression

○Kyumoto Y[1]，Uehara N[1]，Kukita A[2]，Kukita T[1]

[1]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Microbiol, Fac Med, Saga Univ

Galectins consist a unique family of lectins that have the ability to bind molecules with $\beta$-galactoside-containing carbohydrates. Galectin-9, a tandem repeat type of galectin, was originally identified as a chemotactic factor for eosinophils and natural killer cells, and is also involved in the regulatory process of immune response and inflammation. We have reported that galectin-9 markedly inhibits the formation of TRAP positive multinuclear osteoclasts in primary bone marrow cells of mice (mBMMs), and that injection of galectin-9 into rats with adjuvant-induced arthritis significantly suppressed bone destruction. Here, we examined the mechanism of negative regulation of osteoclastgenesis by galectin-9. mRNA expression of marker molecules associated with osteoclast differentiation, such as *Trap* and *Cathepsin K*, was remarkably reduced by galectin-9 exposure during osteoclastgenesis in mBMMs. Galectin-9 markedly attenuated RANKL-induced NFATc1 expression, but it did not affect expression and nuclear translocation of c-Fos, c-Jun and NF-$\kappa$B. Expression of MafB, a suppressive transcription factor of NFATc1, was significantly inhibited by RANKL in mBMMs, however, treatment of galectin-9 recovered MafB level. These results suggest that galectin-9 negatively regulates osteoclastgenesis through down-regulating NFATc1 by inducing MafB, without affecting AP-1 and NF-$\kappa$B pathway.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D2 転写因子 Foxc1 は Ihh-Gli2 シグナルを促進し内軟骨性骨形成を制御する

○波多　賢二[1]，吉田　倫子[1,2]，中村恵理子[1]，高畑　佳史[1]，村上　智彦[1]，井関　祥子[3]，
山本　照子[2]，西村　理行[1]

[1]大阪大　院歯　生化，[2]東北大　院歯　顎口腔矯正，[3]医科歯科大　院医歯　顎顔面機構制御

【目的】内軟骨性骨形成は顎顔面領域を含む骨格形成に重要であり，緻密にプログラムされた連続的な軟骨細胞分化を経て遂行される．この分化プログラムは，様々な転写因子が相互作用し構築する転写ネットワークにより時空間的に制御されている．本研究では内軟骨性骨形成の分子メカニズム解明を目的に，軟骨細胞分化を制御する転写因子を同定しその機能的役割を検討した．【方法・結果】II 型コラーゲン遺伝子プロモーターの制御下に Venus 遺伝子を組み込んだ軟骨特異的レポーターマウスを作製した．胎生 13.5 日齢の同マウス肢芽から Venus 陽性細胞を FACSAria により分離し Microarray 解析を行った．その結果，軟骨細胞に高発現する転写因子として，骨格形成異常を示す Axenfeld-Rieger 症候群の責任遺伝子である Foxc1 を同定した．*Foxc1* 遺伝子自然発症変異マウス（*ch* マウス）は四肢の短縮ならびに胸骨の石灰化不全を含む骨格形成異常を示し，内軟骨性骨形成の遅延を呈した．初代培養軟骨細胞に Foxc1 を過剰発現すると，*PTHrP* および *Col10a1* などの Ihh 標的遺伝子の発現が促進された．生化学的解析の結果，Foxc1 は Ihh シグナル伝達分子 Gli2 と物理的に結合し，Gli2 の DNA 結合能を増強し，Ihh 標的遺伝子の発現を協調的に促進していることが明らかとなった．この結果に一致して *ch* マウス由来初代培養軟骨細胞では，野生型マウス由来軟骨細胞に比較して Ihh 標的遺伝子の発現低下と Gli2 の DNA 結合能も減弱を認めた．また，ヒト *FOXC1* 遺伝子変異の一つである F112S 変異体は DNA 結合能を保持するが Gli2 との結合能を有さないため，Ihh/Gli2 シグナルと Foxc1 の機能的相互作用が減弱していることが判明した．【考察】 Foxc1 は Ihh/Gli2 シグナルを調節することにより内軟骨性骨形成を制御すること，さらに Foxc1 遺伝子異常による相互作用の破綻は，Axenfeld-Rieger 症候群でみられる骨格形成異常の原因の一つとなっている可能性が考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A functional collaboration between Foxc1 and Ihh-Gli2 is critical for endochondral ossification

○Hata K[1]，Yoshida M[1,2]，Nakamura E[1]，Takahata Y[1]，Murakami T[1]，Iseki S[3]，
Yamamoto-Takano T[2]，Nishimura R[1]

[1]Dept Biochem, Osaka Univ Grad Sch Dent，[2]Orthodont Dentofacial Orthopedics, Tohoku Univ Grad Sch Dent，[3]Mol Craniofacial Embryol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Dent

Endochondral ossification is requisite for mammalian skeletal development including craniofacial bones. It is strictly regulated by transcriptional networks organized by various transcription factors. Here, we performed FACS-assisted microarray using reporter mice, in which chondrocytes are fluorescently labelled with Venus driven by Col2a1-gene promoter, and identified Forkhead box c1（Foxc1）as a transcription factor selectively expressed in chondrocytes. Mutations of *FOXC1* cause Axenfeld-Rieger syndrome（ARS）characterized by skeletal malformations. ISH analysis demonstrated that Foxc1 is expressed in proliferating and hypertrophic chondrocytes. Notably, Foxc1 inactivated mice（*ch* mice）showed multiple abnormal skeletal development including short limbs and absence of hypertrophic chondrocytes and no ossification in the sternum. Overexpression of Foxc1 in primary chondrocytes promoted Ihh target gene expression, including *PTHrP* and *Col10a1* through its physical and functional collaboration with Gli2. Mechanistically, Foxc1 increased the binding of Gli2 to the Gli binding element located in the promoter region of Ihh target genes. It should be noted that the pathological Foxc1 missense mutation（F112S）observed in ARS inhibited the *PTHrP* gene expression and the functional interaction between Foxc1-F112S and Gli2 was significantly impaired. In conclusion, our findings suggest a novel molecular mechanism underlying endochondral ossification that has clinical relevance during skeletal development.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D3 ヒストン3リジン9メチル化酵素G9aは正常な歯牙形成に必要である

○上運天太一[1]，出野　尚[2]，中村　芳樹[1]，中島　和久[2]，島田　明美[2]，二藤　彰[2]

[1]鶴見大　歯　歯科矯正
[2]鶴見大　歯　薬理

我々はこれまで，歯の発生において複数のヒストン3リジン9（H3K9）メチル化酵素（MTases）ならびにこれらの基質であるH3K9モノ（me1），ジ（me2），トリメチル化（me3）の局在が歯胚上皮よりも間葉に多く，それらの酵素が間葉において何らかの機能を果たしている可能性を見いだした．これら酵素の中でも特にG9aの発現が間葉に高いことも観察したことから，今回，我々はG9a conditional KO miceを作成し歯の発生過程における間葉でのG9aの機能を調べた．転写因子Sox9が頭部神経提由来の間葉に高い発現を示すので，Soc9-Cre miceと$G9a^{fl/fl}$ miceを交配させることでG9a conditional KO miceを作成した．免疫組織化学ならびにin situ hybridizationを行い，間葉におけるG9aの発現を$Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/+}$ miceと$Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/fl}$（G9a cKO）miceで比較したところ，後者で著しく減少していた．G9aの基質であるH3K9me2のタンパクレベルも間葉で減少していることを確認した．HE染色ではG9a cKO miceの歯胚はE16.5とE17.5で著しく小さいことが観察された．またBrdUラベリングでは間葉の増殖能が低下しており，さらに興味深いことに内・外エナメル上皮層の細胞も同様に増殖能が抑えられていた．G9a cKO miceの歯胚におけるTUNEL陽性細胞数は間葉と上皮のどちらも変化が見られなかった．したがって，歯胚間葉に発現するG9aは少なくとも間葉と上皮の増殖能を調節することによって歯の形成を制御していることが示唆された．（会員外共同研究者；木村宏 東工大 院　生命理工学研究科，立花誠 徳島大学　疾患酵素学研究センター）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## H3K9MTase G9a is required for proper tooth formation

○Kamiunten T[1]，Ideno H[2]，Nakamura Y[1]，Nakashima K[2]，Shimada A[2]，Nifuji A[2]

[1]Dept Orthodont, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

We previously reported that histone 3 lysin 9（H3K9）methyltransferases（MTases）and their substrates H3K9 mono-（me1）, di-（me2）, tri-（me3） methylation were enriched in the tooth mesenchyme more than in the epithelium during mouse development. We also observed that G9a is significantly expressed in the tooth mesenchyme among the H3K9MTases. In this study, we investigated the functions of G9a in the tooth development using G9a conditional KO mice. We used Sox9-Cre mice to delete G9a in tooth mesenchyme, since Sox9 is highly expressed in the mesenchyme derived from cranial neural crest. Immunohistochemical and in situ hybridization analyses revealed that G9a expression was significantly decreased in the mesenchyme of $Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/fl}$（G9a cKO）mice compared with $Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/+}$ mice. Protein level of H3K9me2 was also decreased in the tooth mesenchyme. G9a cKO mice showed smaller tooth germs at E16.5 and E17.5. BrdU labeling revealed that proliferation rates decreased in the mesenchyme in G9a cKO mice. Interestingly proliferation rates also decreased in tooth epithelium. Numbers of TUNEL positive cells were unchanged both in the mesenchyme and epithelium in G9a cKO mice. Thus G9a expressed in the tooth mesenchyme regulates tooth formation, at least partly through regulation of proliferation of the mesenchyme and epithelium.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D4 副甲状腺ホルモン投与ならびに授乳期にカルシウム欠乏食投与によって誘導される骨細胞周囲の骨基質変化について

○本郷　裕美[1]，佐々木宗輝[2]，斎藤　雅美[3]，宇田川信之[4]，網塚　憲生[1]

[1]北大　院歯　硬組織発生
[2]長崎大　院医歯薬　インプラント
[3]ブルカー AXS（株）
[4]松本歯大　口腔生化

【目的】1960 年代に Bélanger によって提唱された PTH 投与による骨細胞性骨溶解，および授乳期において母乳への Ca 排出量が過剰となった際に見られる骨細胞周囲の骨基質溶解について組織化学的に検索を行った．【材料と方法】生後 11 週齢の雄性 ICR マウスおよび *RANKL*$^{-/-}$マウスに hPTH（1-34; 80 μg/kg）を外頸静脈から投与した．さらに生後 12 週前後の妊娠マウスに 10 日間アレンドロネートを投与する群としない群に分け，出産直後から Ca 欠乏食（Ca:0.018%）を給餌した．それぞれ数時間後に固定し，血中 Ca 濃度測定，骨細胞周囲の骨基質を原子間力顕微鏡（AFM）によるナノインデンテーション，透過型電子顕微鏡（TEM）観察，カルセイン標識による蛍光顕微鏡観察，共焦点レーザー顕微鏡観察，von Kossa 染色を行った．【結果と考察】野生型マウスおよび *RANKL*$^{-/-}$マウスともに PTH 投与 1 時間後で血中 Ca 濃度は上昇し，授乳期マウスではアレンドロネート投与の有無に関わらず，Ca 欠乏食給餌 48h 後で血中 Ca 濃度は低下した．PTH 投与 6 時間後あるいは Ca 欠乏食給餌 48h 後で皮質骨の骨小腔が拡大し，その周囲には von Kossa 陰性を示す未石灰化骨基質が見られた．TEM 観察すると骨小腔壁は著しい凹凸を示し，拡大した骨小腔内部にはコラーゲン線維と思われる不定形構造物や断片的な石灰化基質が認められた．AFM 観察では，形状変化を認めない骨細胞周囲の骨基質が弾性率の低下を示した．さらに骨小腔周囲にカルセイン標識を認めたことから，骨細胞は骨小腔壁を溶解するだけでなく，その後石灰化沈着すると推測された．以上より骨細胞は，血中 Ca 濃度の変化によって，一過性に周囲の骨基質を溶解または石灰化沈着することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histological alterations of bone matrix surrounding osteocytes in mice with PTH administration and in lactating mice fed with calcium insufficient diet

○Hongo H[1]，Sasaki M[2]，Saito M[3]，Udagawa N[4]，Amizuka N[1]

[1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Dept Appl Pros, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[3]Bruker AXS K K
[4]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ

**Introduction:** In this study, we have attempted to histologically verify osteocytic osteolysis proposed by Bélanger in 1960's., using two mice models - PTH administered mice and lactating mice fed with calcium (Ca) insufficient diet. **Materials and Methods:** Wild-type *(wt)* ICR and *Rankl*$^{-/-}$ male mice were injected with hPTH (80 μg; 1-34), and then, bone matrix surrounding the osteocytes was examined under TEM, nanoindentation of AFM, fluorescence microscopy and confocal laser microscopy. Furthermore, we investigated osteocytic lacunae in lactating mice fed with Ca insufficient diet with or without administration of alendronate for 10 days. **Results and Discussion:** At six hours after PTH administration, enlarged osteocytic lacunae were observed in the cortical bone, and von Kossa staining demonstrated demineralized bone matrix surrounding the osteocytes. Under TEM observation, there are some fragmented collagen fibrils and pieces of mineralized matrices in enlarged osteocytic lacunae which showed irregularly-shaped walls. Calcein labeling was seen on the walls of some osteocytic lacunae. In lactating mice fed with Ca insufficient diet with alendronate administration, consistently, the osteocytic lacunae were enlarged, and sometimes labeled with calcein. It seems likely, therefore, that osteocytes enable to erode the surrounding bone matrix and deposit minerals on their lacunae.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D5　軟骨内骨化における血管内皮細胞の微細構造学的検索

○土屋恵李佳[1,2]，本郷　裕美[1]，山本知真也[1]，長谷川智香[1]，網塚　憲生[1]

[1]北大　院歯　硬組織発生
[2]北大　院歯　口腔診断内科

【目的】 軟骨内骨化における血管侵入の知見は未だ不明な点が多いが，過去において，ドリコスマメレクチン（DBA）陽性 perivascular cell の存在が報告されている（Nakamura and Ozawa 1996）．我々は，さらに検討を進める目的で，成獣期マウスの長管骨の成長板軟骨において，血管内皮細胞の侵入様式，および，その周囲に存在する細胞について微細構造学的に検索した．
【方法】 8 週齢雄性マウスを左心室からアルデヒド液で灌流固定した後，脛骨を摘出後，同固定液で 1 日間，4℃にて浸漬固定した．脛骨サンプルは 5% EDTA で脱灰し，パラフィンまたはエポキシ樹脂へ包埋した．これらの切片上で DBA，MMP-9 と CD31 の免疫組織化学を行うと共に，透過型電子顕微鏡観察を行った．
【結果と考察】 骨・軟骨移行部では，DBA 陽性細胞は，血管内皮細胞に密接して局在したが，血管内皮細胞よりも軟骨側に位置する傾向は認められなかった．従って，血管内皮細胞が肥大化軟骨細胞層への先端側に位置しており，血管内皮細胞の周囲の細胞が様々な残渣の処理を行う可能性が考えられた．肥大化軟骨細胞の小腔に，血管内皮細胞の突起と思われる構造が不連続に挿入されており，また，赤血球が細胞突起で囲まれずに軟骨小腔内に存在していたことから，血管内皮細胞の侵入先端は開放型になっていると推察された．更に，侵入した血管の内腔やその周囲に肥大軟骨細胞の残渣と思われる構造が観察された．また，血管内皮細胞と骨芽細胞が密接に接触する部位も観察された．このように，血管内皮細胞を中心として DBA 陽性細胞や骨芽細胞が局在しており，これら細胞の連携プレーが軟骨内骨化において重要な役割を果たすと考えられる．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Ultrastructural assessment for biological function of vascular endothelial cells at chondro-osseous junction

○Tsuchiya E[1,2]，Hongo H[1]，Yamamoto T[1]，Hasegawa T[1]，Amizuka N[1]

[1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Oral Diagnosis Medicine, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

**Purpose**: Chondro-osseous junction is the site of vascular invasion in the process of endochondral ossification, which replaces epiphyseal cartilage with bone. Previously, DBA-positive perivascular cell was reported to play an important role in endochondral ossification. We have histologically examined vascular invasion of endothelial cells at the chondro-osseous junction of adult mice.
**Materials & Methods**: ICR mice at eight weeks of age were perfused with aldehyde solution, and tibiae were extracted and immersed in the same fixatives. The specimens were decalcified with 5% EDTA and embedded into paraffin and epoxy resin for histochemistry of DBA lectin, CD31 and MMP-9.
**Results & discussion**: At the tibial chondro-osseous junction, DBA-positive perivascular cells were localized in the close proximity of the invading vascular endothelial cells, but did not precede vascular invasion. Cytoplasmic processes of vascular endothelial cells were shown to extend into the transverse partitions of columns of hypertrophic chondrocytes. Hypertrophic chondrocytes adjacent to such vascular invasion seemed to be intact featuring normal cell organelles and enlarged cell bodies. Some vascular endothelial cells made cell-to-cell contact with osteoblasts. The cellular interplay between the endothelial cells and the surrounding cells seems to be essential for vascular invasion during endochondral ossification.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D6 糖尿病が骨細胞に与える組織化学的影響について　―SDT fatty ラットを用いた解析―

○坪井香奈子，本郷　裕美，長谷川智香，網塚　憲生

北大　院歯　硬組織発生

【緒言】 糖尿病は，骨質劣化や骨密度低下により糖尿病性骨粗鬆症を発症することが注目されているが，その組織化学的解析は未だに少ない．そこで今回我々は，SDT（Spontaneously Diabetic Torii）fatty ラットを用いて糖尿病が骨の細胞群，特に骨細胞に与える影響について組織化学的に検索した．【材料と方法】 生後 42 週齢 SDT fatty ラット，および，コントロール群として同週齢・同系列の SD ラットを用いた．脛骨を通法にて固定しパラフィン切片を作製した．ALP，DMP-1，chondroitin-4-sulfate，オステオカルシン，$\alpha$-SMA の組織化学および鍍銀染色を行った．【結果と考察】 SDT fatty ラットではコントロール群と比較し，骨幹端骨梁の幅が減少し，骨梁の連続性が途絶える傾向を認めた．コントロール群では ALP 陽性を示す活性型骨芽細胞が観察されたが，SDT fatty ラットの骨芽細胞は扁平化し，ALP 強陽性を示す活性型骨芽細胞はほとんど認めなかった．鍍銀染色を行うと，SDT fatty rat の骨梁および皮質骨における骨細胞・骨細管系は規則的な走行を示した．しかし，コントロール群とは異なり，SDT fatty ラットの骨梁における骨細管では chondroitin-4-sulfate や DMP-1 の陽性反応が減弱していた．さらに，近年，インスリンの分泌に関与していると言われているオステオカルシンを検索すると，SDT fatty ラットの骨細胞はオステオカルシン陽性を示した．また，SDT fatty ラットの骨幹部骨髄において多数の-SMA 陽性細胞を認め，血管平滑筋細胞が増加していることが示唆された．【結語】 糖尿病は骨細胞・骨細管系に何らかの影響を与えることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histochemical examination on bone cells in obese type 2 diabetic SDT fatty rats

○Tsuboi K，Hongo H，Hasegawa T，Amizuka N

Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

Introduction: It is known that diabetes mellitus is associated with increased risk of fracture, i.e., diabetic osteoporosis. However, it is still veiled what happens on bone cells in a state of diabetes mellitus. In this study, we have examined histological properties of bone cells, especially osteocytes, in the spontaneously diabetic Sprague-Dawley Torii（SDT）fatty rat, a new model of type 2 diabetes. Materials and Methods: Forty two male SDT-fa/fa（fatty）rats and age-matched SD rats were fixed, and their tibiae were embedded into paraffin for histochemical detection of ALP, DMP-1, chondroitin-4-sulfate, osteocalcin, Alpha-SMA and silver impregnation. Results and Discussion: Unlike the control group, tibial metaphyses of SDT fatty rats developed thin and fragmented trabecules, in which there seemed no active form of osteoblasts bearing an intense ALP-positivity. Silver impregnation revealed well-arranged osteocytic lacunae and their canaliculi in both control and diabetic rats. However, the SDT fatty rats demonstrated a markedly-reduced immunoreactivity of chondroitin-4-sulfate and DMP-1 in the canaliculi. Osteocalcin immunoreactivity was observed in osteocytes of SDT fatty rats. Alpha-SMA positive vascular smooth muscle cells were increased in number in bone marrow of SDT fatty rats. Taken all together, diabetes mellitus may affect osteocytes and their lacunae and canaliculi system.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D7　胎生期マウス蝶形骨翼状突起の骨化における免疫組織化学的研究

○北村　　啓，山本　将仁，梅澤　貴志，芹川　雅光，阿部　伸一

東歯大　院歯　解剖

蝶形骨は骨体部，大翼，小翼，翼状突起から構成される．これらの骨化は軟骨内骨化と膜性骨化が複合して起こり，中でも翼状突起の軟骨細胞は蝶形骨体部の軟骨細胞よりも遅れて発生することが知られている．近年，翼状突起の骨化過程においては，骨体部より早期に石灰化が開始することが分かってきた．しかしながら，翼状突起の骨化過程において発現するタンパクについての報告はなく不明な点が残されている．そこで今回我々は，胎生期マウス翼状突起軟骨におけるタンパクを観察する為に Col2，10 について検索を行った．また，翼状突起の先端で走行方向を変える口蓋帆張筋に，筋特異的マーカーであるデスミンを用いて同時に検索した．さらに RT-PCR を用い，これらタンパクを転写レベルにて検索した．また骨化の過程を観察する為，破骨細胞を TRAP 染色にて観察し，その細胞数を計測した．Col2 は胎生 14.5 日に初めて発現し，胎生 16 日には全体に広がっていた．胎生 17 日以降では，翼状突起下部にのみ発現を認めた．Col10 は胎生 14.5 日においては認められなかった．しかし，胎生 16 日では軟骨肥大細胞にのみ発現が確認でき，その後も傾向は変わらなかった．また，RT-PCR の結果は，免疫組織学的染色における結果を裏付けるものとなった．TRAP 染色により破骨細胞は，胎生 15 日に初めて認められ，胎生 17 日には軟骨細胞を貪食していた．細胞数の計測においては胎生 17 日以降に優位に増加傾向を認めた．一方，デスミンの強い集積は胎生 16 日に蝶形骨舟状窩で認められた．以上の結果より，デスミンの集積は将来口蓋帆張筋が舟状窩に付着する為の筋腱接合部になると考えられる．また翼状突起における軟骨細胞は，軟組織のみで構成される口蓋の貴重な足場になるために早期に成長し，骨化しなければならない．そのため，一次軟骨性の骨化と異なり細胞層を作らず急速に骨化したと考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunohistochemical analysis of ossification of pterygoid in embryonic mice

○Kitamura K，Yamamoto M，Umezawa T，Serikawa M，Abe S

Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent

Recent research has shown that calcification of cartilage in the pterygoid processes starts earlier than in the sphenoid body, even when the cartilaginous cells of the former are slower to develop. However, uncertainties persist due to the lack of published literature on the osteoclasts that develop in the embryonic pterygoid process along with collagen（Col）and calcium（Ca）. With this in mind, we evaluated bone tissue development in the pterygoid processes by searching for Col and osteoclast expression within these processes in embryonic mice. We also investigated tensor veli palatini using desmin which accumulates in the muscle-tendon junction. In addition, we performed a transcription-level search for Col and desmin using RT-PCR. Col II was first expressed when the embryo was 14.5 days old, and had spread throughout the pterygoid processes by Day 16. Col X was seen in hypertrophic chondrocytes from Day 16. Our study findings showed that cartilaginous cells in the pterygoid processes must develop and ossify early in order to form the scaffold for the palate, which is composed exclusively of soft tissue. This ossification is therefore believed to occur rapidly without the formation of cell layers, unlike those seen during primary cartilaginous ossification.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D8 Isolation and characterization of dental epithelial cells derived from amelogenesis imperfecta rat as an *in vitro* disease model

○Arya Adiningrat[1]，谷村　綾子[2]，三好　圭子[2]，堀口　大吾[2]，野間　隆文[2]

[1]徳島大　院医歯薬　口腔科学教育
[2]徳島大　院医歯薬　医化学

## Isolation and characterization of dental epithelial cells derived from amelogenesis imperfecta rat as an *in vitro* disease model

○Arya Adiningrat[1]，Tanimura A[2]，Miyoshi K[2]，Horiguchi T[2]，Noma T[2]

[1]Grad Sch Oral Sci, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci
[2]Dept Mol Biol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

**Purpose:** SP6 is a zinc-finger type transcription factor which is expressed in the developing ectodermal tissues, including tooth. We previously reported that disruption of the third zinc finger domain in the C-terminus of SP6 protein exhibits tooth-specific defect in amelogenesis imperfecta（AI）rat（AMI）, which shows no systemic defects as shown in the *Sp6* knockout mouse. In order to further elucidate the molecular basis of AI induced by *Sp6* mutation, we isolated and characterized AMI-derived epithelial cells（ARE）.
**Material & Methods:** Microarray analysis was performed using total RNA isolated from rat molars of wild-type rat and AMI. To investigate the effects of *Sp6* mutation in AI phenotype, dental epithelial clones were isolated from incisors of AMI. Each clone was grouped according to their morphological similarity and gene expression profile of SP6-target genes, whereby we selected of two ARE clones. Nuclear localization of both wild-type（Sp6WT）and mutant-type Sp6（Sp6AMI）was analyzed by immunocytochemistry using transfectants with both *Sp6* expression plasmids. The transcriptional activity mediated by both Sp6WT and Sp6AMI was examined by *luc*-reporter assay using *Rock1* gene promoter which is a downstream target gene of SP6 in dental epithelial cell clone（G5）isolated from incisors of wild-type rat as we previously reported（J Biosci Bioeng, Abe *et al*., 2007）, ARE and COS-7 cells. DNA-binding activity of both Sp6WT and Sp6AMI was analyzed by chromatin immuno-precipitation（ChIP）assay using G5, ARE, and COS-7 cells.
**Results & Conclusion:** We observed the differential genes expression pattern and morphological variety between wild-type and ARE cells. The nuclear localization of Sp6WT and Sp6AMI was confirmed in both G5 and COS-7. The analysis of *Rock1* promoter activity revealed that both Sp6WT and Sp6AMI could enhance the *Rock1* promoter activity, but Sp6AMI exhibited weaker transcriptional enhancement compared to Sp6WT. In contrast, any enhancement of *Rock1* promoter activity with co-transfection of either Sp6WT or Sp6AMI was not detected in ARE and COS-7 cells. However, we observed that both Sp6WT and Sp6AMI could bind to the *Rock1* promoter in any cells. Disruption of third zinc-finger domain of SP6 affected SP6-mediated transcriptional activity regardless of its DNA binding activity. In conclusion, we propose AMI-derived cells（ARE clones）as an *in vitro* disease model.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D9　象牙質コラーゲンの糖化と加齢変化

○清水　真人，三浦　治郎

大阪大　院歯　総診

糖化反応は加齢変化の一つとして考えられている．糖化の一連の反応はメイラード反応とよばれ，酵素が関与せずに不可逆的に反応が進行する．生体内に取り込まれた糖はタンパク質のリジン，アルギニン残基の側鎖と結合し，シッフ塩基を形成する．その後，アマドリ転位，酸化反応等を経て不可逆的に糖化最終産物（AGEs）形成する．AGEs の代謝排泄が間に合わずに，組織に蓄積，沈着すると，血管の場合はアテローム性の動脈硬化，毛細血管の破壊がおこり，神経系の不調の原因ともなる．象牙質は糖化ストレスに常に受ける環境にあり，ほとんど代謝しない．象牙質コラーゲンの糖化について，これまで，歯髄周囲における糖化の増加といった分布状態の差があることが報告されているが，年齢による差はほとんどないとされてきた．本研究では免疫組織化学的手法，western blot 法などの生化学的手法，コラーゲンの蛍光寿命測定といった物理化学的手法を用いて若年者，高齢者の象牙質を解析した．生化学的手法では付加型 AGEs の一つである CML と架橋型 AGEs である pentosidine が高齢者では若年者に比べて多いことを認めた．免疫組織学的方法でも高齢者において CML が増加していることが確認できた．蛍光寿命は蛍光色素分子の密度が高まると短縮することが知られている．架橋型 AGEs は蛍光色素分子であることが多く，象牙質コラーゲンの蛍光寿命が高齢者では短縮することから，コラーゲン間の非生理的な架橋が増加していることが示唆された．加齢によって糖化による非生理的な架橋が増加することが高齢者における象牙質の力学的強度の減少や，う蝕進行特性の変化にも相関している可能性がある．また本研究における実験手法は，硬組織の加齢変化だけではなく糖尿病における糖代謝異常に関する研究にも有効であると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Glycation of dentinal collagen with human aging

○Shimizu M，Miura J

Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent

The purpose of this study was to determine the Maillard reaction in dentin. We focused on the crosslinking of collagen; namely, Advanced Glycation End-products（AGEs）formed by non-enzymatic glycosylation. Time-resolved fluorometry and western blotting can be used as probes for this research. In this study, we examined the relationship between fluorescence characteristics and immunochemical analysis of type I collagen from decalcified human dentin with respect to glycation, and considered the possible influence of crosslinking on dentinal physiology. Fluorescence lifetime of the aged dentin was shorter than that of young dentin. There were also differences between young and aged dentinal collagen in western blotting. AGEs levels in aged dentin were higher than that in young dentin for collagen extracted with 3N HCl. Immunohistochemical analyses also showed that concentration of AGEs is higher in aged dentin than in young dentin. These findings suggest that the accumulation of AGEs with aging may be responsible for the changes in fluorescence lifetime and immunochemical properties. Fluorescence microscopy and electrophoresis can provide useful crosslinking information on the aging phenomenon in human dentin. These results suggest that dentinal aging might be affected by reducing sugars in the blood.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D10　頭部エックス線照射マウスの臼歯根尖部の形態的異常

○井出　吉昭[1]，中原　　貴[1]，那須　優則[2]，石川　　博[3]

[1]日本歯大　生命歯　発生　再生
[2]日本歯大　生命歯　共同研
[3]日本歯大　生命歯

【目的】小児期の放射線治療による副次的な影響として，歯根の発育障害が挙げられる．歯根形成期に被曝することで歯根の短縮化と同時に，根尖部の形態異常が生じる．正常な歯根発生のメカニズムは，ヘルトヴィッヒ上皮鞘（HERS）が，その周囲の間葉細胞と上皮－間葉相互作用によって歯乳頭細胞を象牙芽細胞へと分化を促し，歯根が形成されることが知られている．本研究では，頭部照射を行ったマウスの下顎第 1 臼歯（M1）遠心根の根尖部に焦点を当て，歯根発生のメカニズムを踏まえた根尖部の放射線の影響について検討を行った．
【方法】本研究では，M1 の歯根形成開始時期である生後 5 日齢（P5）のマウスを使用した．頭部エックス線照射モデルとして，マウスに鉛板を使用して頭部照射（10，20 Gy）を行った．歯根形成期にあたる P7，9，11，13，15 の下顎のサンプリングを行い，歯根の伸長を確認するためにマイクロ CT 撮影，根尖部の組織学的な観察をするために HE 染色と nestin（象牙芽細胞マーカー），サイトケラチン（CK, HERS マーカー）による免疫染色を行った．
【結果と考察】10 Gy，20 Gy 照射マウスで共に歯根の伸長障害による短縮化が確認された．根尖部の組織像では，HERS を取り囲みながら歯冠方向に反転する異常な石灰化組織が観察された．この石灰化組織に近接する細胞が nestin 陽性を示したことから，歯根形成期の放射線被曝は，歯根象牙質の形態異常が起こり，歯の短縮化を引き起こすと考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Malformation of the apical region on molars in mice irradiated to the head

○Ide Y[1]，Nakahara T[1]，Nasu M[2]，Ishikawa H[3]

[1]Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[2]Res Cent for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[3]Dept NDU Life Sci, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Purpose: It is known that reduction of dental roots is caused by radiotherapy during root formation. In the root development, Hertwig's epithelial root sheath（HERS）initiates odontoblast differentiation from the dental papilla cells through epithelial-mesenchymal interaction. We focused on apical region of roots in mice irradiated to the head, and the malformation of the apical region was investigated.
Methods: Mice at postnatal day 5（P5）（it is considered to be the initiation stage of dental roots）were irradiated（10 and 20 Gy）to the heads. To analyze the roots, the mice were killed at P7, 9, 11, 13, and 15. Micro-CT analysis was performed for the measurement of the root length. HE staining and immunohistochemistry for nestin（odontoblast marker）and cytokeratin（CK, HERS marker）were also performed.
Results and Discussion: The dental roots of the irradiated mice were significantly shorter than in the non-irradiated mice. The calcified tissue in the apical region was abnormally inverted to the coronal direction. Nestin positive cells were located at the surface of the inverted calcified tissue and the CK positive HERS cells were surrounded by the abnormal tissue. These data suggest that the irradiation causes malformation of the root dentin, resulting in short roots.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D11　歯根形態の研究に仮説がない

○小澤　幸重

比較解剖学と「歯と骨の訪問教室」

背景：歯の形態には歯根＝象牙質形成が重要である．しかし，最先端と言われる再生実験をみても，歯根形態の根拠と仮説が殆ど考慮されていないことに戸惑いを感じる．これは，教科書を紐解いても，歯根形態の記載はあるが発生に関する記述がほとんどないことが原因であろう．これは勢い歯の形態＝歯冠形態という図式に影響を与えている．この原因を検討した．検討：現在の歯冠形態の理論は Cope-Osborn による三結節説に基本的に依存する．これは臼歯の理論であり，他の歯種，歯根や歯髄についてはあまり触れてない．それは彼らが古生物学者であり，種の同定が目的であり基本的には化石の歯の形態に基づくためである．化石はエナメル質で出来ている歯冠が多く，臼歯形態が使いやすい．当初から Bolk，Woodward，Rose 等々の発生学的事実による異論があったが，時代の趨勢にかき消された．当時は Darwin による「種の起源」(1859)，Haeckel による「Biogenetic law」(1866)，つまり個体発生＝系統発生＝進化の図式がつよい影響を与えたためである．結論：いま分子生物学が凄じい勢いで歯学に反映しているが，記載的研究との関係を十分に考慮して研究を進めるべきであろう．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Why we do not have a hypothesis for the tooth root morphogenesis

○Kozawa Y

Comp Anat Odont

Background: The tooth root as dentine is important to the tooth morphology. We could find no descriptions of the root form development. This affects the tooth morphology, only the crown. It is examined those cause. Discussion: The theory of the tooth morphology basically depends on Tritubercular theory by Cope-Osborn (1907). This theory explained only the molar, and the theory does not refer to other kinds of tooth, tooth roots and pulps. They are paleontologists, and the main purpose is to identification of species feature, and it is to be based on the molar crowns forming by the enamel, which is easily fossilization. In many cases other parts of tooth, such as the root = dentine is broken and the pulp could not be observed on the fossil form. There were many arguments in that days from embryological and biological facts by Bolk, Woodward, and Rose etc. but these rival ideas were lost by the trend of the times. In that time Ontogeny = Phylogeny = Evolution had a strong influence to every things because 'The Origin of Species (1859)' is published by Darwin, 'Biogenetic law (1866)' is presented by Haeckel. We should progress on the relationships between the molecular biology and the descriptive studies.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-D12 エナメル芽細胞分化過程におけるナトリウム依存性グルコース輸送体の局在と機能

○依田　浩子，大島　勇人

新潟大　院医歯　硬組織形態

【目的】歯胚発育過程において，歯胚細胞の増殖および分化調節にグルコース代謝が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた．本研究ではエナメル芽細胞分化過程におけるナトリウム依存性グルコース輸送体の発現様式を明らかにするとともに，グルコース取り込み調節とエナメル芽細胞分化との関連性を in vitro 系にて検証した．【方法】生後 3 週齢の ICR マウス上顎切歯を用いて，ナトリウム依存性グルコース輸送体（SGLT1/2）について免疫組織化学ならびに免疫電顕法にて観察した．さらに，胎生期下顎臼歯，生後 1 日齢下顎切歯の器官培養系にて，SGLT 阻害剤添加によるエナメル芽細胞の分化，エナメル基質形成および石灰化への影響について検討した．【結果と考察】グルコース親和性の高い SGLT1 は基質形成期エナメル芽細胞への分化直後に発現し始め，成熟期では ruffle-ended ameloblast に発現が認められた．一方，グルコース輸送量の大きい SGLT2 は中間層細胞，乳頭層細胞および成熟期エナメル芽細胞に局在し，グルコース受動輸送を担うナトリウム非依存性グルコース輸送体（GLUT2）陽性細胞とほぼ一致していた．また，ナトリウム濃度勾配の調節に重要な $Na^+/K^+$-ATPase は成熟期の乳頭層細胞に強発現していた．SGLT1/2 阻害剤である phlorezin を用いた歯胚器官培養では，形成期エナメル芽細胞への分化およびエナメル基質形成が抑制された．また，グルコース不含有培地でも同様な結果が得られた．以上より，エナメル質形成ならびに成熟過程において，エナメル芽細胞はグルコースの受動輸送のみならず，$Na^+/K^+$-ATPase による細胞内外のナトリウム濃度勾配を利用したグルコース能動輸送も同時に行うことにより，エナメル質の形成および成熟過程を制御していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Functional significance of sodium-dependent glucose transporters in the process of ameloblast differentiation

○Ida-Yonemochi H，Ohshima H

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

Glucose metabolism plays an important role in odontogenesis. This study aims to clarify the functional significance of sodium-dependent glucose transporters（SGLTs）in the process of ameloblast differentiation using immunohistochemistry and an in vitro organ culture experiment with an inhibitor of SGLT1/2. An intense SGLT1-immunoreaction was localized in the early secretory ameloblasts and ruffle-ended ameloblasts of maturation stage. On the other hand, SGLT2-immunoreactivity was observed in the stratum intermedium, papillary layer and maturation ameloblasts. SGLT2 was colocalized with sodium-independent glucose transporter（GLUT2）and $Na^+/K^+$-ATPase. The inhibition of SGLT1/2 by phlorezin in organ culture experiments induced the disturbance of secretory ameloblast differentiation, resulting in enamel hypoplasia. In the glucose free medium, the explants showed the similar phenotype with that of SGLTs inhibitor. These findings suggest that the expression of SGLT1 and SGLT 2 in the ameloblast-lineage cells seems to be precisely and spatiotemporally controlled, and the glucose uptake mediated by active glucose transporters, SGLTs, plays a crucial role in the enamel matrix formation and maturation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E1　口腔扁平上皮癌細胞における圧受容による増殖制御機構

○吉本　尚平[1]，森田　浩光[3]，中村　誠司[2]，平田　雅人[1]

[1]九大　院歯　口腔細胞工学
[2]九大　院歯　顎顔面腫瘍制御
[3]福歯大　総合歯

口腔扁平上皮癌細胞では上皮成長因子受容体（EGFR）が過剰に発現しており，細胞増殖に重要な働きをしていると考えられている．そのため，口腔扁平上皮癌治療の標的分子として臨床応用されている．一方，腫瘍組織内では，癌細胞の高い細胞増殖能により持続的な組織内圧の上昇が起こっており，細胞増殖への圧の関与も無視できない．そこで，口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-3）用いて圧受容に関する実験を行い，高浸透圧により活性化された nuclear factor of activated T-cells 5（NFAT5，転写因子）が EGFR の細胞膜移行とそれによる細胞増殖の亢進に関わっているという結果を得た．10％の血清を含む 5.5 mM グルコース含有の培地（浸透圧：300 mOsM）にマンニトールを添加し，高浸透圧刺激（350 mOsM）を行うと，HSC-3 において NFAT5 の発現亢進とともに EGFR の細胞内から細胞膜への移行が観察された．また高浸透圧刺激により約 2 倍の BrdU の取り込み亢進が認められ，細胞増殖速度が上昇している事が示唆された．この細胞増殖速度の亢進は，EGFR 阻害剤である CP380736（10 μM）およびチロシンキナーゼ阻害剤である genistein（10 μM）の添加により抑制された．さらに shRNA を用いた NFAT5 のノックダウン実験を行うと，ノックダウン細胞では，上記の高浸透圧刺激に伴う EGFR の細胞膜移行・細胞増殖速度の亢進はともに抑制された．上記の結果から，口腔扁平癌細胞では，腫瘍内圧亢進による NFAT5 の発現亢進を介して EGFR の細胞膜移行が促進され，細胞増殖を促進していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Possible mechanism of positive pressure-induced cell proliferation in oral squamous cell carcinoma

○Yoshimoto S[1]，Morita H[3]，Nakamura S[2]，Hirata M[1]

[1]Lab Mol Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Sec Oral and Maxillac Oncol, Div Maxillac Diag Surg Sci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[3]Sect General Dent, Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll

Epidermal growth factor receptor（EGFR）is highly expressed in oral squamous cell carcinoma（SCC）and plays a critical role for cell proliferation. Therefore, EGFR is clinically recognized as a molecular target of oral cancer therapy. On the other hand, it could be possible that an intra-tumoral pressure, constitutively increase due to high proliferative ability of SCC, is involved in cancer growth. Here we report that hyper-osmotic challenge to human tongue squamous carcinoma cells（HSC-3）triggered upregulation of nuclear factor of activated T-cells 5（NFAT5）, and thus translocation of EGFR from cytosol to plasma membrane, followed by cell proliferation. EGFR were translocated to the plasma membrane accompanied with NFAT5 up-regulation by changing medium from normal（300 mOsM）to hyper-osmotic condition（350 mOsM）, as assessed by fluorescent immunocytochemistory and Western blot. BrdU assay revealed that cell proliferation was accelerated twice by hyper-osmotic challenge. The acceleration of BrdU intake activity was suppressed by CP380736（10 μM）, an EGFR inhibitor, or genistein（10 μM）. Furthermore, NFAT5-knocked down HSC-3 cells by shRNA showed that the events triggered by hyper-osmotic challenge were significantly suppressed. These results suggest that NFAT5 regulates oral SCC proliferation through plasma membrane translocation of EGFR by intra-tumoral positive pressure.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E2　TPD52 ファミリータンパクの遺伝子発現制御の検索

○本橋　宏美，椋代　義樹

昭和大　歯　口腔外科

【目的】Tumor Protein D（TPD）ファミリータンパクは TPD52，53，54，55 の 4 つより成る新規のタンパクファミリーである．特に TPD52 の mRNA は長い 3'-UTR（非翻訳領域）を持ち，AU リッチ配列（ARE:AUUUA）を多く含む．この特徴的な構造に着目し TPD ファミリー 52，53，54 遺伝子の 3'-UTR の転写後制御機構の役割について検索した．【材料および方法】扁平上皮癌細胞および正常細胞を用いて核 Run on assay，RT-qPCR 法，RNA degradation assay を行い TPD52，53，54 の総 RNA 量，mRNA の転写活性および半減期の測定を行った．さらに増殖因子（TGF-b，EGF）又は miR34a，miR122 mimic を導入し，同様の実験を行った．次に CMV プロモーター下流の GFP 遺伝子の 3' 末端に TPD52 ファミリーの 3'-UTR を繋いだキメラ遺伝子を作成し，SAS 細胞にトランスフェクションし GFP の発現を FACS を用いたレポーターアッセイにて測定した．【結果】TPD52，53，54 遺伝子の総 RNA 量と mRNA の転写活性は，発現量と活性が同じ傾向を示したが，TPD52 の半減期は細胞依存的に異なった．増殖因子により TPD52 の転写活性は著しく上昇したが逆に半減期は短くなった．miR34 mimic を導入すると同様の結果がみられたが，miR122 mimic 添加では TPD52 の半減期に影響を与えなかった．FACS では GFP-TPD52，53，54 の 3'-UTR キメラ遺伝子の発現量は各々の 3'-UTR の依存性に変化を示し，TPD52 が特に GFP の発現を強めた．RNA degradation assay より RNA の安定性に TPD ファミリーの 3'-UTR は寄与していることが明らかとなった．【結論】TPD ファミリー遺伝子の mRNA の安定性において 3'-UTR が関与し，GFP-TPD52，53，54 の 3'-UTR キメラ遺伝子の発現量の違いは各々の 3'-UTR の構造の違いによるものだと考えられる．以上より TPD ファミリー遺伝子の 3'-UTR が転写後遺伝子発現制御を受けていることが明らかになった．会員外演者：代田達夫，近藤誠二（昭和大学歯学部口腔外科学講座）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The 3'-UTR of TPD family mRNA is post-transcriptional regulation on its gene expression

○Motohashi H，Mukudai Y

Dept Oral Surg, Sch Dent, Showa Univ

Objectives: Tumor Protein D（TPD）family includes TPD52, 53, 54 and 55. Three prime untranslated regions（3'-UTR）of TPD family mRNAs are relatively longer compared to coding ones. That of TPD52 quite long lapping tag 3.5 kbs, thereby the roles of the 3'-UTR on post transcriptional gene expression, was investigated. Methods: Several cancer and normal cells were subjected to total RNA qPCR, nuclear run on assay, and RNA degradation assay, for TPD52, 53, 54 genes. 3'-UTR cDNAs of TPD family mRNA were ligated to the 3'-end of GFP gene at the downstream. Each vector was transfected into cells and GFP measured by Flowcytometry（FACS）. In addition, half-lives of the chimeric genes were measured by qPCR. Result: Total RNA qPCR, nuclear run on assay and RNA degradation assay showed that total RNA and transcriptional activity of TPD family gene almost accord with the total gene expression. However, the half-life of TPD52 mRNA depended on stimulations of growth factors more than TPD53 and 54 did. FACS analysis provided that those alternation of the expression of reporter genes were related to the RNA stability. Conclusions: 3'-UTR of TPD family genes are suggested to play an important role in post-transcriptional regulation of the gene expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E3　iPS 細胞由来骨補填材料の開発

○山本　治毅[1]，萱島　浩輝[1]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]

[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ
[2]東北大　院歯　分子・再生補綴

【目的】我々は iPS 細胞が有する“無限の増殖能”および“骨基質の産生能”という性質に着目し，iPS 細胞を骨補填材に有効な成分を産生するツールとして用いる技術を着想した．本研究の目的は，iPS 細胞に骨基質成分を大量に産生させる培養方法を検討し，凍結乾燥により不活化した iPS 細胞由来骨補填材（iPS 骨補填材）を評価することである．【材料および方法】マウス iPS 細胞の胚様体を振盪しながら骨芽細胞分化誘導培地中で培養し，得られた iPS 細胞凝集体の乾燥質量，カルシウム量の測定，および FT-IR を用いた成分解析を行った．iPS 細胞凝集体における骨芽細胞特異的遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析し，培養上清中の骨形成蛋白質（BMP）2 を ELISA 法で定量した．また，iPS 骨補填材の抽出液が，マウス間葉系幹細胞（MSC）の骨芽細胞分化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色で検討した．さらに，ラット頭蓋骨に形成した欠損部に iPS 骨補填材を填入し，術後経過を組織切片観察（HE 染色）および $\mu$CT 画像解析により評価した．【結果】分化誘導過程における振盪培養は，iPS 細胞凝集体の乾燥質量，カルシウム量，骨芽細胞特異的遺伝子の発現および BMP2 の産生を有意に促進した．FT-IR の結果，iPS 細胞凝集体の成分を表すスペクトルは骨組織に特徴的なピークを示した．Alizalin Red 染色の結果，iPS 骨補填材は MSC の骨芽細胞分化を著明に促進した．iPS 骨補填材を頭蓋骨欠損部に移植した 10 週間後には，垂直的な厚みをもった皮質骨様の骨組織の形成を認めた．また，填入部位に形成された新生骨の骨密度は経時的に増加した．【結論】iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導することで，骨組織に近い成分を有する細胞凝集体を得る事ができ，これを不活化した材料は骨補填材として有用である可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Fabrication of bone graft materials using iPS cells

○Yamamoto H[1]，Kayashima H[1]，Yatani H[1]，Egusa H[1,2]

[1]Dept Fixed, Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objectives: iPS cells（iPSCs）can be infinitely expanded and guided to differentiate into osteogenic cells. The objective of this study is to fabricate iPSC-derived bone graft materials（iPSC-BGM）. Methods: Mouse iPSCs were cultured in osteogenic induction medium with shaking culture followed by inactivation by freeze-drying. The dry weight, calcium deposition, expression of osteogenic marker genes（real-time RT-PCR）and production of bone morphogenetic protein（BMP）-2（ELISA）in the iPSC constructs before inactivation were evaluated. The elemental composition of the iPSC constructs were investigated by FT-IR analysis. Mineralization of mouse mesenchymal stem cells（MSCs）in the medium containing elution from the iPSC-BGM was assessed by Alizarin Red staining. The new bone formed in rat calvarial defects filled with the iPSC-BGM was histologically assessed. Results: The dry weight, calcium deposition, expression of osteogenic marker genes and BMP2 of the iPSC constructs were increased by the shaking culture. FT-IR spectra of the iPSC constructs were similar to that of bone. Calcification of MSCs was enhanced by the elution from the iPSC-BGM. The defect was vertically regenerated with the cortical bone at the 10th week. Conclusion: These results suggest that iPSC-BGM would be suitable for vertical bone regeneration.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E4 Vc 侵害受容ニューロンにおける AMPA 受容体のリン酸化は舌乾燥に起因する舌痛に関与する

○中谷　有香[1]，坪井　美行[2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　口腔診断
[2]日本大　歯　生理

口腔乾燥症の患者は原因不明の舌痛を訴えることが多いが，その発症機序は不明である．そこで，口腔乾燥により引き起こされる舌痛の発症メカニズムを解明することを目的とした．イソフルラン吸入による浅麻酔下にて Sprague Dawley 系雄性ラットの舌を乾燥状態にさせ(2 時間/日)，舌乾燥モデルラット(dry 群)を作製した．同様の吸入麻酔を与えたラットを sham 群とした．乾燥開始 7 日目，dry 群において，舌の侵害機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値(HWT)は有意に低下した．さらに，舌の侵害的機械刺激 5 分後に三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)において pERK 陽性細胞数が有意に増加した．さらに舌の侵害的機械刺激に対する Vc 侵害受容ニューロンの発火頻度は有意に増加した．また，髄腔内への ERK リン酸化阻害薬である MEK1 inhibitor(PD98059)の持続投与により，舌の侵害的機械刺激に対する HWT の低下および Vc の pERK 陽性細胞数の増加が有意に抑制された．また，舌の侵害的機械刺激に対する Vc 侵害受容ニューロン応答が有意に抑制された．さらに，舌乾燥 7 日目において，Vc の pAMPA 陽性細胞数が有意に増加し，PD98059 の投与によりこの増加は抑制された．以上のことから，口腔乾燥に起因する舌の機械痛覚過敏発症には Vc の侵害受容ニューロンにおける ERK のリン酸化亢進，これにより AMPA 受容体のリン酸化が進み，その結果として Vc 侵害受容ニューロンの興奮性が増加して舌痛が発症する可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## AMPA receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons is involved in dry tongue pain

○Nakaya Y[1]，Tsuboi Y[2]，Shinoda M[2]，Iwata K[2]

[1]Dept Oral Diagnostic, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Although dry mouth patients suffer from tongue pain, underlying mechanisms are still unknown. We intended to elucidate the mechanisms underlying tongue pain associated with dry mouth to develop the appropriate treatment for tongue pain patients. Head-withdrawal threshold（HWT）to mechanical but not heat stimulation of the tongue significantly decreased, and the mechanical but not heat responses of Vc nociceptive neurons were significantly enhanced on day 7 compared with sham rats. The number of pERK-immunoreactive（IR）cells in the Vc significantly increased compared with sham rats on day 7 after tongue dry. The decrement of the mechanical HWT and the increase in the number of pERK-IR cells were reversed following successive intrathecal（i.t.）administration of MEK1 inhibitor PD98059. The enhanced neuronal activity was also significantly suppressed following i. t. administration of PD98059. The number of pAMPA- IR cells in the Vc significantly increased compared with sham rats on day 7 after tongue dry. The increased number of pAMPA-IR cells was return to the pretreatment level after successive i. t. administration of PD98059. These findings suggest that AMPA Receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons via ERK phosphorylation is involved in mechanical tongue pain associated with dry mouth.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E5 *in vitro* 振動刺激負荷装置の開発と振動刺激が培養骨芽細胞分化に及ぼす影響

○太田　岳，千葉　美麗，林　治秀

東北大　院歯　口腔生理

【目的】我々は，歯周組織への機械的な振動刺激負荷により歯科矯正学的歯の移動速度が促進されることを報告した．しかしながら，本現象のメカニズムの詳細はいまだ不明な点が多い．本研究は，*in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し，振動刺激のパラメータが骨芽細胞分化に及ぼす影響を検証する．

【方法】ピエゾ素子により周波数および加速度を制御する *in vitro* 振動負荷装置を開発し，タイプ I コラーゲンでコーティングしたシリコーン膜製の培養面中央に加速度 1.0-175 m/s$^2$，周波数 30-90 Hz，垂直振幅 0-2.5 mm の正弦波振動を負荷した．ストレインゲージ法を用いて細胞培養面の振動様相を動ひずみ計にて実測し，ひずみの分布を調べた．さらに，ロゼット解析にて最大および最小ひずみの方向を求めた．次に，骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用い，振動刺激を 10 分間負荷した．24 時間後，骨形成マーカー遺伝子と *Gapdh* の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した．

【結果】(1) 振動により培養表面に発生するひずみは加速度の増加に伴い線形に上昇し，周波数の増加に伴い減少した．ひずみの大きさは，時間を横軸とする正弦波形で，位置によって逆位相を示し，中央を通る主ひずみの方向が観察された．(2) 骨芽細胞は，周波数 60 Hz，加速度 5.0 m/s$^2$ の振動条件下で，*Runx2*，*Osterix*，*Type I collagen*，*Alkaline phosphatase* の遺伝子発現がコントロール群に対して有意に上昇（$p<0.05$）し，一方，加速度 1.0 m/s$^2$の条件下では有意な差は見られなかった．

【結論】我々は，負荷した振動刺激の周波数，加速度による培養表面の動的ひずみ様相と分布が明らかな振動周波数と加速度を正確に制御する振動負荷装置を開発し，細胞培養表面上のひずみ計測を $\mu$ ストレインレベルで確立した．また，振動刺激による骨芽細胞の分化誘導には，周波数のみならず加速度が重要なパラメータであることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Induction of osteogenic differentiation stimulated by vibration

○Ota T，Chiba M，Hayashi H

Div Oral Physiol, Tohoku Univ, Grad Sch Dent

Although vibrational stimulation has been shown to accelerate orthodontic tooth movement, the mechanism involved remains unclear. In this study, we developed an *in vitro* vibrational loading system with regulated frequency and acceleration in order to investigate the effects of vibration on osteoblasts. The directions of the maximum and minimum principal strains and the strain distribution on the surface of a cell culture silicone membrane were determined using the strain gauge method. After successfully establishing vibrational conditions over the range of 1.0-175 m/s$^2$ and 30-90 Hz, mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells were subjected to vibrational stimulation for 10 minutes. Twenty-four hours after stimulation, the cellular gene expression was analyzed using real-time polymerase chain reaction. We found that the strain increased lineally with the magnitude of acceleration and that opposite phases of the strain wave were observed depending on the position of the cell culture surface. Vibrational stimulation significantly increased the expression of osteogenic marker genes including *Runx2*, *Osterix*, *Type I collagen*, and *alkaline phosphatase* at 5.0 m/s$^2$ and 60 Hz, but not at 1.0 m/s$^2$ and 60 Hz. In conclusion, these results suggest that not only frequency but also acceleration are important parameters that regulate osteoblast differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E6　歯の石灰化における TRPM7 の役割

○緒方佳代子[1,2]，岡　　暁子[2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，永嶌　勝之[1]，尾崎　正雄[2]，
岡部　幸司[1]

[1]福歯大　細胞生理
[2]福歯大　成育小児歯

【目的】歯の石灰化の分子機構に関しては未だ不明なことが多い．今回我々は，$Ca^{2+}$や$Mg^{2+}$等のミネラル輸送を担う陽イオンチャネルでありながら，酵素としてのキナーゼドメインを併せ持つユニークな“Chanzime”TRPM7 に着目し，歯の石灰化における役割について検討を行った．【方法と結果】(1)マウスの全身における TRPM7 の発現部位を in situ hybridization および real time PCR を用いてスクリーニングした結果，他の組織に比べ歯において非常に高い発現を認めた．(2) TRPM7 発現の免疫組織学的な解析により，胎生 16.5 日齢以降の歯胚の歯乳頭およびエナメル器に発現を認め，さらに発生が進むと，TRPM7 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に高い発現を認めた．(3)エナメル芽細胞株 SF2 及び象牙芽細胞株 mDP 細胞を用いて検討した結果，両細胞株とも高い TRPM7 の発現を認めると共に，パッチクランプ法にて TRPM7 様イオン電流も検出された．(4) shRNA を用いた SF2 及び mDP 細胞の TRPM7 ノックダウンにより，先述の TRPM7 様電流量が減弱した．さらに石灰化誘導の培養において TRPM7 発現を抑制すると，VonKossa 染色の減弱，つまり石灰化の抑制が認められたが，一方で ALP 染色は影響を受けなかった．(5)TRPM7 分子のキナーゼドメインの機能解析のために，キナーゼ機能を欠失した TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて，歯の組織学的解析およびマイクロ CT 解析を行ったところ，変異マウスの切歯エナメル質に形成不全が観察された．【結論】以上のことから，TRPM7 は，エナメル芽細胞および象牙芽細胞に特徴的に発現しているチャネル蛋白であり，エナメル質形成，象牙質形成における石灰化過程で重要な役割を持つことが示唆された．非会員共同研究者：圓谷智之，片桐千秋，松下正之（琉球大学医学部　分子・細胞生理）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Elucidating the role of the dominant expression TRPM7 in tooth and its calcification

○Ogata K[1,2]，Oka K[2]，Fukushima H[1]，Okamoto F[1]，Nagashima K[1]，Ozaki M[2]，Okabe K[1]

[1]Sec Cellular Physiol, Fukuoka Dent Coll
[2]Sec Pediatric Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll

TRPM7 is an unusual bi-functional protein containing an ion channel covalently linked to a protein kinase domain. Here, we report the TRPM7, predominantly expressed in ameloblast and odontoblast, play the pivotal role in calcification of dentin and enamel formation. Screened the TRPM7 expression profile by in situ hybridization and tissue specific q-PCR analysis was shown that the predominant expression of TRPM7 mRNA in teeth to compare with other organs. In immunohistochemical analysis, TRPM7 was started to express in differentiated ameloblast and odontoblast from the bell stage. In lower incisor, TRPM7 expression of ameloblasts was seen throughout the entire process of amelogenesis. To exam the functional role of TRPM7 in calcification, we performed knockdown TRPM7 in ameloblast（SF2）/odontoblast（mDP）cell lines using shRNA system. TRPM7 shRNA suppressed the expression of TRPM7 and TRPM7-like ionic current in SF2 and mDP. After cultured each cells with osteogenic differentiation medium, staining of von Kossa was clearly diminished, but ALP activity was not changed by TRPM7 depletion. Lastly, in vivo analyze of TRPM7 K1648R mice which loss-of kinase function of TRPM7 revealed critical role in this mechanism. These results demonstrate the crucial importance of TRPM7 function during mineralization of both enamel and dentin formation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E7　歯根膜における転写因子 Mkx の機能解析

○幸田　直己[1,2]，森山　啓司[2]

[1]医科歯科大　院医歯　システム発生・再生
[2]医科歯科大　院医歯　顎顔面矯正

【背景・目的】
歯根膜組織は歯と骨を繋ぎ，咀嚼力という機械的負荷が加わる特殊な環境に置かれ，歯の機能において非常に重要な役割を担っている．しかし，これまで歯根膜の形成や恒常性の維持に関わる分子の同定は進んでおらず，歯根膜に関する知見は乏しいのが現状である．今回，我々は腱組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている転写因子 Mkx が歯根膜に発現していることを見いだした．歯根膜における Mkx の機能について，*Mkx* 欠損マウスを用いた解析を通じて解明することを本研究の目的とした．
【方法】
歯根膜における Mkx の発現は，*Mkx* 遺伝子に GFP をノックインした *Mkx* 欠損マウスを用い，抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的手法により解析を行った．また，*Mkx* 欠損マウスにおける歯根膜の表現型解析は組織切片の H-E 染色ならびにトルイジンブルー染色により，歯根膜のコラーゲン線維に関する解析は透過型電子顕微鏡を用いた解析により評価を行った．歯根膜に発現する遺伝子の解析は，マウス歯根膜から RNA を抽出し，Q-PCR により解析を行った．
【結果】
10 週齢のマウス上顎臼歯において Mkx の発現は歯根膜に限局し，*Mkx* 欠損マウスでは加齢とともに上顎臼歯根間中隔部において歯根膜の細胞成分の肥厚を伴った歯根膜腔の拡大を認めた．また，*Mkx* 欠損マウスの歯根膜に存在するコラーゲン線維の短径は一様でなくばらつきを示していた．さらに Q-PCR 解析により歯周組織に関連する種々の遺伝子発現の変動を認めた．
【結論】
Mkx は歯根膜に発現し，種々の遺伝子発現を精巧に制御することで，歯根膜におけるコラーゲン線維の形成をはじめとした歯根膜の恒常性維持に関与することが示唆された．この成果は，将来的な Mkx の人為的発現制御による歯根膜の保護や再生に結びつくことが期待される．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Roles of transcriptional factor Mohawk in PDL

○Koda N[1,2]，Moriyama K[2]

[1]Dept Systems BioMed, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Maxillofacial Orthognathics, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Transcriptional factor Mohawk homeobox（Mkx）has been shown to be mainly expressed in tendon tissues and plays an important role in the tissue homeostasis through the regulation of gene expressions such as *Col1a1*（Ito et al., PNAS, 2010）. Although periodontal ligament（PDL）have compositional similarities with tendons, the function of *Mkx* in PDL has never been clarified.
Here, we report that Mkx is highly expressed in PDL at 10-week-old mouse maxillary molars. PDL space in maxillary molar roots' septum expands with age-related in *Mkx* knockout mice, which is accompanied by a thickening of the cellular components of PDL. Based on transmission electron microscope（TEM）analysis of knockout mice, we found that Mkx has an essential role in collagen fibril formation. Furthermore, we also found that expression of various genes is changed in PDL of the *Mkx* knockout mice. Our results not only define the role of Mkx in PDL but also suggest the molecular basis for the development of regenerative medicine of PDL in the future.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E8 ラット歯周組織における弾性系線維の発達と分布様式

○井上　孝二[1]，原　矢委子[2]，佐藤　哲二[2]

[1]鶴見大　歯　電顕センター
[2]鶴見大　歯　解剖・組織細胞

【背景と目的】生後 5 週ラットの歯肉では，3 種の弾性系線維すべてが認められるのに対し，臼歯の歯根膜や切歯のセメント質側ではオキシタラン線維のみが分布し，切歯のエナメル質側ではオキシタラン線維に加えて少数のエラウニン線維も観察されることを，前回の学会で発表した．本研究では，歯周組織での弾性線維系の発生過程を調べる目的で，胎生 20 日の歯胚周囲の歯小嚢や粘膜固有層の弾性系線維を調べた．さらに，5 週以後の経年変化を知るために，生後 14 週の下顎切歯と臼歯の歯根膜，歯肉の粘膜固有層に分布する弾性系線維の分布様式についても検討を加えた．【材料と方法】試料としては，胎生 20 日，生後 5 週と 17 週ラットの下顎切歯と第一臼歯の歯周組織を用いた．光顕解析では，オキシタラン線維の検出にアルデヒドフクシン・ハルミ染色，弾性線維の検出にワイゲルトの弾性線維染色を施した．電顕解析では，薄切切片をトルイジンブルー染色により確認後，超薄切片を作製し，microfibril のみのオキシタラン線維と microfibril の中央に elastin のコアをもつエラウニン線維や弾性線維を比較検討するため，タンニン酸を加えた三重染色法にて観察した．【結果と考察】胎生 20 日の切歯や臼歯の歯小嚢（歯胚と歯槽骨の間の部位）内にオキシタラン線維を確認した．この時期の歯胚周囲の歯槽骨を被う骨膜の細胞間や歯胚直上の粘膜固有層にはエラウニン線維が観察された．このことから，オキシタラン線維とエラウニン線維はほぼ同時期に形成されると推測された．生後 14 週の臼歯歯肉の粘膜固有層には 3 種の弾性系線維すべてが分布していた．歯槽骨の骨膜内には，エラウニン線維と弾性線維が観察された．さらに，臼歯歯根膜の歯槽骨よりに位置する血管付近では，少数のエラウニン線維が確認された．本結果は咀嚼などによる経年変化と考えると，歯科矯正時における変化と一致する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Development and distributional pattern of the elastic fiber system in the periodontal tissue of rats

○Inoue K[1]，Hara Y[2]，Sato T[2]

[1]Res Cent Elec Micros, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Dept Anat and Hist, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

［Purpose］We have so far showed developmental, topographic organizations of the elastic fiber system in the periodontal ligament of rats. The aim of the present study is to evaluate the development and distributional pattern of the elastic fiber system in the periodontal tissue of rats.［Materials and Methods］Wistar rats of embryo 20 days, postnatal 5, and 14 weeks were used for this study. Oxytalan and elastic fibers were light-microscopically identified. For electron microscopic analysis, some tissue blocks were embedded in epoxy resin after fixation. Semi-thin sections were stained with toluidine blue, ultra-thin sections were labeled with uranyl acetate and lead citrate or with tannic acid, uranyl acetate and lead citrate.［Results and Discussion］Both oxytalan and elaunin fibers were already confirmed in the periodontal tissue surrounding the dental germ at embryo 20-day. Elaunin fibers were localized only outside of the alveolar bone and in the connective tissue underlylig the mucosal epithelium. In the rat of postnatal 14 weeks, the lamina propria of gingiva was occupied by three kinds of fibers, namely elastic, elaunin and oxytalan fibers. In addition, the number of elaunin fibers seemed to increase with aging in periodontal ligament of the first molar.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E9 Sox21 によるエナメル芽細胞分化メカニズムの解析

○齋藤　　幹，福本　　敏

東北大　院歯　小児歯

【背景】Sox（sex determining region Y-box）は転写因子群の 1 つであり，その代表分子である Sox2 は幹細胞の機能維持に重要であることが報告されている．我々は，包括的な遺伝子解析から，Sox21 が新規の成熟エナメル芽細胞マーカーであることを見いだした．そこで Sox21 の歯胚形成における役割を解明する為に，Sox21 遺伝子欠損マウスの解析を行ったところ，エナメル小柱構造に異常を伴う形成不全を認めた. そこで今回, Sox21 によって制御される下流遺伝子のスクリーニングを行い，本分子によるエナメル質形成メカニズム解明を行った.

【材料と方法】歯原性上皮細胞株である SF2 に Sox21 遺伝子を過剰発現させ，Chip シークエンスを用いて Sox21 によって発現が制御される分子のスクリーニング行なった．候補分子は qPCR 法にて Sox21 により発現調節されるかの確認を行った．さらに Sox21 によって発現制御される分子については SF2 細胞に siRNA を加えて発現抑制を行なった後，エナメル芽細胞マーカーの発現を検討した.

【結果】Chip シークエンスの結果，Sox21 によって制御される候補分子が多数得られた．そこで Sox21 欠損マウスのエナメル芽細胞における遺伝子発現変化を調べたマイクロアレイの結果と比較し，関連する分子について約 10 種類程度に絞り込んだ．qPCR 法により数種が Sox21 により発現調節されていることを確認した．このうち細胞周期を調節している分子に対する siRNA を用いた解析から，KLK4 の発現制御に関わることを見いだした.

【考察】Sox21 は，Sox2 発現を阻害し，分化誘導を調節することが知られている．幹細胞では細胞増殖が抑制されているが，Sox21 が細胞周期を直接調節することにより，分化誘導を行っている可能性が示唆された.

**【利益相反】**利益相反状態にはありません.

## Analyses of the ameloblast differentiation mechanism by Sox21.

○Saito K，Fukumoto S

Div Pediatric Dent, Tohoku Univ

［BACKGROUND］ We discovered that Sox21 was a novel mature ameloblast marker by the comprehensive gene analysis. Then, in order to clarify the role in a tooth-germ formation of Sox21 when a Sox21 deficient mouse was analyzed, the hypoplasia accompanied with the abnormality enamel-rod structure was observed. In this study, the downstream genes regulated by Sox21 were screened to identify the amelogenesis mechanism by this gene.

［METHODS］ The candidate molecules controlled by Sox21 in the Sox21 overexpressed dental epithelial cell line were investigated by the Chip sequence. The candidate molecules were confirmed the Sox21 dependence by the qPCR. The expression of the ameloblast marker was considered in dental epithelial cell line with siRNA of the molecule in which the dependence was confirmed.

［RESULTS］ Many candidate molecules regulated by Sox21 were obtained in the Chip sequence results. It was confirmed by qPCR that a few gene were Sox21 dependence. The gene expression of KLK4 was regulated by the siRNA of the molecule which is controlling the cell cycle.

［DISCUSSION］ Sox21 is impeding Sox2 expression and regulating differentiation. Furthermore, the cell proliferation is inhibited in the stem cell. It is suggested that Sox21 is inducing the differentiation by regulating a cell cycle.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E10 Rho-YAP シグナルによるエナメル上皮幹細胞維持機構

○大津　圭史，藤原　尚樹，原田　英光

岩医大　歯　発生生物

生涯伸び続けるマウス切歯では，形成端（apical bud）に存在するエナメル上皮幹細胞の持続的分裂がその成長を維持している．しかしながら，その幹細胞維持機構については未だ不明な点が多い．以前我々は Rho シグナリングが，上皮－間葉転換（Epithelial-Mesenchymal transition: EMT）を介して上皮細胞の極性化，細胞接着を制御していることを見いだした．そこで本研究では，エナメル上皮幹細胞における Rho シグナリングの役割について検討した．まず，RhoA の下流のエフェクター分子である ROCK の阻害薬を培養エナメル上皮細胞に添加したところ，上皮細胞マーカーの発現が低下し，間葉細胞マーカー，EMT マーカー（Slug），エナメル上皮幹細胞マーカー（Sox2）の発現が上昇することが定量 PCR にて明らかとなった．さらにその細胞では Slug と Sox2 タンパクの発現局在が細胞質から核へと移行していることがわかった．さらにマウス切歯において Yes-associated protein（YAP）transcriptional coactivator の発現を免疫染色にて調べたところ，その発現はエナメル上皮細胞の活発な細胞分裂が見られる transit amplifying cell（TA）領域で強く認められる一方，エナメル上皮幹細胞領域ではみられなかった．また培養エナメル上皮細胞において Rho 活性化薬は YAP の転写活性を上昇させ，ROCK 阻害薬は低下させた．以上より，Rho-YAP シグナリングが細胞分裂制御を介してエナメル上皮幹細胞維持に関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho-YAP signaling

○Otsu K，Fujiwara N，Harada H

Dept Anat, Div Dev Biol Regen Med, Iwate Med Univ

The continuous growth of rodent incisors is supported by the division of dental epithelial stem cells that reside in the cervical loop region（apical bud）. However, the regulatory mechanism of the stem cell maintenance has not been fully elucidated. We have recently found that Rho signaling regulated the cell polarity and adhesion through epithelial-mesenchymal transition（EMT）. In this study, we examined the role of Rho signaling in dental epithelial stem cells. qPCR showed that ROCK（downstream of Rho effectors）inhibitor decreased expression of epithelial markers and increased mesenchymal markers in cultured dental epithelial cells. In the treated cells, mRNA expressions of slug（EMT markers）, and Sox2（dental epithelial stem cell marker）also increased and the intense nuclear accumulation was observed. Further, immunohistochemistry of mouse incisors showed Yes-associated protein（YAP）transcriptional coactivator was strongly expressed in actively proliferating TA cells, whereas not expressed in dental epithelial stem cells. Treatment of Rho activator promoted YAP transcriptional activity in mHAT9d, as assayed by luciferase reporter assays. Conversely, inhibition of ROCK hindered YAP transcriptional activity, suggesting that Rho regulated cell proliferation through YAP. Together, these results suggested that Rho-YAP signaling was multifunctional pathway that control stemness of dental epithelial stem cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E11　マウス切歯 apical bud および切歯・臼歯歯髄における静的幹細胞維持機構について

○石川　裕子[1]，中富　満城[2]，大島　勇人[3]

[1]新潟大　院医歯　口腔保健
[2]九歯大　解剖
[3]新潟大　院医歯　硬組織形態

【目的】マウス切歯の上皮幹細胞ニッチである apical bud および切歯・臼歯歯髄における静的幹細胞の局在とその維持機構を解明するために，マウス切歯 apical bud，臼歯発生過程の歯髄における BrdU label-retaining cells（LRCs）の局在と Gli1，sonic hedgehog（Shh），Patched1（Ptch1）発現との関連を免疫組織学的に解析した．
【方法】妊娠 ICR マウスに 3 日間（胎生 15～17 日）BrdU を腹腔内投与し歯髄幹細胞／前駆細胞をラベルし，生後 1 日～5 週齢まで経時的に仔マウスをアルデヒド系固定液にて灌流固定し，EDTA で脱灰・パラフィン包埋後，頭部矢状断パラフィン切片を作製した．引き続き，抗 BrdU 抗体，抗 Sox2 抗体，抗 Gli1 抗体，抗 Shh 抗体，抗 Ptch1 抗体および抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色を行った．さらに各陽性細胞数の経時的変化について定量解析を行った．
【結果と考察】動的および静的な幹細胞をもつ切歯では，apical bud の外エナメル上皮側および形成端歯乳頭に濃く染まる LRCs および Gli1 陽性細胞が共局在し，同部位には Ptch1 発現が見られ，Shh タンパク質は上皮・間葉に広く分布していた．静的な幹細胞をもつ臼歯では，LRCs は生後 1 日で歯髄広範に分布していたが歯の発生の進行に伴い数が減少し，生後 1 週以降に濃く染まる LRCs は歯髄中央部血管周囲に維持されていた．Gli1 タンパク質は発生を通して髄角部で強く発現しているものの，歯髄中央部では生後 2 週で急激に発現が上昇し生後 5 週まで歯髄中央部血管周囲に強く発現していた．Ptch1 は生後 1 日から髄角部に，生後 3 週以降で歯髄中央部血管周囲に発現し，Shh は上皮・間葉に発現がみられた．以上より，上皮および間葉の静的幹細胞が Shh シグナルで維持されることが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanisms maintaining quiescent stem cells in the incisor apical bud and the incisor and molar dental pulp in mice

○Ishikawa Y[1]，Nakatomi M[2]，Ohshima H[3]

[1]Div Oral Sci Health Promotion, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Anat, Dept Oral Health Improvement, Kyushu Dent Univ
[3]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

**Objective:** This study aimed to clarify the mechanisms maintaining quiescent stem cells in the incisor apical bud and the incisor and molar dental pulp in mice.
**Methods:** Three intraperitoneal injections（E15-17）of BrdU were given to pregnant ICR mice to label stem/progenitor cells in the birthed mice. The samples were collected on postnatal day 1 to week 5. Immunohistochemistry for BrdU, Sox2, Gli1, Shh, Ptch1, and Ki-67 was conducted in the sagittally-cut paraffin sections. Chronological changes in the number of immunopositive cells were quantitatively analyzed.
**Results and Conclusions:** In the incisor, both Glil and Ptch1 were expressed at the outer enamel epithelium of apical bud and the dental papilla in the apical end, where numerous dense label-retaining cells（LRCs）were localized. In the developing molar, numerous LRCs decreased in number after postnatal week 1. Gli1 and Ptch1 expressions first appeared in the cusped area to become to associate with blood vessels in the center of pulp after weeks 2 and 3, respectively. In contrast, Shh protein was widely distributed in the epithelial and mesenchymal tissues of incisors and molars. In conclusion, Shh signaling is suggested to play a crucial role in maintaining the epithelial and mesenchymal quiescent stem cells.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-E12　外エナメル上皮・星状網除去による歯胚発生への影響

○田畑　　純，杉浦　真琴

医科歯科大　院医歯　硬組織構造

【目的】歯胚のエナメル器を構成する外エナメル上皮（OEE）や星状網細胞（SR），および星状網の間質は，歯胚の中で大きな体積と細胞数を占める．従来ある説では，咬頭が成長するための空間の確保，内エナメル上皮の保護，石灰化に必要な何らかの機能，などが挙げられるが，いずれも十分な検証がなされないまま今日に至っている．そこで，本研究では OEE と SR の大部分を取り除いた歯胚（OSX 歯胚）を作成し，培養して，歯冠形態や細胞分化にどのような影響を示すかを調べた．

【方法】発生 16 日の ICR マウスの下顎第 1 臼歯歯胚を摘出し, OSX 歯胚を作成して, 改良トロウェル法で培養した．TUNEL 法，BrdU 取込実験，腎被膜下培養は常法に依った

【結果】OSX 歯胚は，除去部以外に障害を与えていないものを選んで使用し，7 日培養して検証に用いた．この期間に，OEE と SR の修復はほとんど認められなかった．しかし，歯胚の形態形成はほぼ正常に進み，咬頭の数や形に大きな変化は認められなかった．また，細胞分化も正常であり，分化マーカーの発現や基質形成においてもほぼ正常であった．腎被膜下に移植して 2 週間後に摘出した歯胚では発達したエナメル質が観察された．これらのことから，OEE と SR が大きく欠除していていても，歯胚の形態形成はほぼ支障なく進行することが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Elimination-effect of outer enamel epithelium and stellate reticulum on tooth germ development

○Tabata MJ，Sugiura M

Sec Biostructural Sci, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

［Aim］The components of enamel organ of tooth germ, i.e., outer enamel epithelium（OEE）and stellate reticulum（SR）and the matrix of SR Component of enamel organ of tooth germ, occupied with large volume and large numbers of the cells in tooth germ in development. For the role of this area, there are many hypotheses until today, but the validation is necessary more. So, we made OEE- and SR-excised（OSX）tooth germ and validate the effect.

［Materials & Methods］ Tooth germs of the mandibular first molar are prepared from ICR mouse in embryonic day 16. OSX tooth germs are made microsurgically and cultured in modified Trowell's method. Protocols of TUNEL, BrdU and culture in kidney capsule are in standard.

［Result］ OSX tooth germs in 7 days were used for validation. Reconstruction of OEE and SR was not obviously in this period. However, the tooth development and cusp formation were normal. Cell structure was normal and the marker expressions were also normal. Tooth germs after the additional culture in kidney capsule for 14 days showed developed enamel. From these findings, we can conclude that tooth germs are able to develop normally, if the OEE and SR are eliminated in large part.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F1 マウス舌移植モデルにおけるヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移形質と癌微小環境

○白子　要一[1]，佐藤かおり[1]，田谷　雄二[1]，青葉　孝昭[1]，島津　徳人[2]，添野　雄一[1]

[1]日本歯大　生命歯　病理
[2]麻布大　生命環　食品生理

悪性腫瘍の浸潤・転移に関与する因子として癌細胞形質とともに脈管を含む癌微小環境が注目されている．本研究では，口腔癌の進展過程における細胞形質変化と間質構築との関連を検証する目的で，マウス舌へのヒト口腔癌細胞移植を実施した．転移巣由来株 HSC2，OSC19，OSC20 および原発巣由来株 KOSC2，HO-1u1 をヌードマウス舌側縁部に注入，所定期間後に舌および頸部リンパ節を採取，パラフィン包埋薄切標本（4 μm 厚）を作製した．癌細胞形質として E カドヘリン，ビメンチン，サイトケラチン，CD44s，間質組織要素として PECAM（血管内皮），Lyve-1（リンパ管内皮）の多段階免疫染色を施し，デジタル記録・コンピュータ演算による組織要素分画と定量解析を行った．3 次元構造解析に向けては連続薄切標本 200 枚から空間連結処理・立体構築を行った．移植した癌細胞株はいずれも舌組織で癌胞巣を形成した．被移植マウスでのリンパ節転移巣形成率は転移巣由来株で 100%，原発巣由来株で 40%未満であった．細胞表現形質の解析では，使用したすべての癌細胞株で浸潤先端部において E カドヘリン発現減弱と CD44s 発現亢進が認められ，ビメンチン発現は細胞株毎に多様性を示した．これらの細胞形質が転移巣で維持されていることも確認できた．画像演算処理により腫瘍内間質と周囲間質を分画すると，PECAM 陽性血管密度は非移植対照群の舌組織と比べて移植群の腫瘍周囲および腫瘍内間質で高まっているのに対し，Lyve-1 陽性リンパ管密度は転移巣由来株の腫瘍内間質でのみ有意に上昇していた．3 次元観察では周囲間質から腫瘍内間質に至るまでの血管・リンパ管走行を辿ることができ，腫瘍内外間質の境界面を設定した定量解析では細胞株間での血管・リンパ管貫入スポット数の違いも判明した．舌組織での癌胞巣性状には癌細胞株の由来・発現形質が関与し，異なる腫瘍―間質間相互作用が転移に影響することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Invasive/metastatic properties and tumor-stromal microenvironments of human oral squamous cell carcinoma cells in a xenograft mouse model

○Shirako Y[1]，Sato K[1]，Taya Y[1]，Aoba T[1]，Shimazu Y[2]，Soeno Y[1]

[1]Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent
[2]Dept Life Food Sci, Azabu Univ Sch Life Environmental Sci

The present study aimed to characterize tumor establishment in both tongue and regional lymph nodes and to investigate vascular stromal remodeling in a xenograft model of human oral squamous cell carcinoma (OSCC). We transplanted five human OSCC cell-lines into nude mouse tongues, and determined tongue tumor growth and micrometastatic dissemination by serial tissue sectioning in combination with immunohistochemistry using E-cadherin, cytokeratin, vimentin, and PECAM-1/Lyve-1 antibodies with the aid of computer-assisted image analysis. All cell-lines tested were tumorigenic in mouse tongue. The metastatic lesion-derived cell-lines (OSC19, OSC20, and HSC2) yielded a 100% nodal metastasis rate, whereas the primary tumor-derived cell-lines (KOSC2 and HO-1-u-1) showed below 40% metastatic potential. Immunohistochemistry showed that the individual cell-lines gave rise to heterogeneous phenotypes and that their micrometastatic lesions assimilated these phenotypes. OSCC cell-lines also represented heterogeneous properties with respect to parenchyma-stroma structure and blood/lymph vessel densities in the peri- and intra-tumor regions. Three-dimensional reconstruction analysis enabled to characterize the tumor-host border and penetrating blood/lymph vessels through the border zone. These results support that tumorigenicity and tumor architecture in the host tongue environment depend on the origin and properties of the cell-lines and that metastatic progression may take place through heterogeneous tumor-host interactions.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F2　口腔扁平上皮癌における DKK3 の発現と機能解析

○片瀬　直樹

川崎医大　医　分子生物 1

【目的】我々は口腔扁平上皮癌（OSCC）の発生と進展に関わる特異的な癌関連遺伝子の検索から DKK3 に注目した．DKK3 は多くの腫瘍で発現が低下しており，癌抑制遺伝子として機能すると考えられているが，我々のこれまでの研究では，OSCC では DKK3 はむしろ高頻度に発現しており，DKK3 発現群は予後不良であることが明らかとなっている．本研究では OSCC 由来細胞株を用いて DKK3 遺伝子の機能解析を行った．【方法】各種の腫瘍細胞株での DKK3 発現を Real-time PCR と western blotting で確認した後，OSCC 由来細胞に対して，DKK3 発現プラスミドのトランスフェクションによる強制発現系と，shRNA の導入によるノックダウン系を構築した．これらの細胞を用いて，細胞増殖，浸潤，遊走性への影響を検討した．また，DKK3 発現の増減による Wnt signal の変化を検討した．【結果と考察】DKK3 発現は OSCC などの一部の癌のみに限られており，ほとんどの癌では発現が減弱していた．OSCC 細胞での強制発現系では，DKK3 発現は mRNA レベルでもタンパクレベルでも有意に増加した．細胞増殖への影響は明らかではなかったが，浸潤性，遊走性は増加する傾向を認めた．ノックダウン系では DKK3 発現の有意な低下に伴い，細胞増殖，浸潤，遊走も全て有意に低下した．強制発現系での TOP/FOP assay では Wnt/$\beta$-catenin 系の亢進が示唆された．DKK family は oncogenic Wnt signal を抑制するが，DKK3 のみは Wnt signal を抑制することはできないとされ，その機能は不明である．本研究からは OSCC では DKK3 は組織特異的に oncogenic にふるまい，腫瘍の浸潤や転移を促進している可能性が示唆された．（共同研究者：寺田久美子，鈴木貴弘，西松伸一郎，山村真弘，山内明，濃野勉）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression and functional analyses of DKK3 in oral head and neck squamous cell carcinoma（OSCC）

○Katase N

Dept Mol Dev Biol Kawasaki Med Sch

We identified DKK3 as a key gene that are involved in cancer progression in OSCC. DKK3 belongs to the DKK family, which is known as a negative regulator of oncogenic Wnt signaling. Although some reports indicate that DKK3 may not modulate Wnt signaling and its function is still unknown, DKK3 is believed to be a common and powerful tumor suppressor in many kinds of malignancies. However, we reported that DKK3 is predominantly expressed by OSCC cells, and that patients with DKK3 expression showed poorer prognosis, implying oncogenic roles of DKK3 in OSCC. To explain this paradoxical situation, we performed functional analyses on DKK3 in OSCC cell lines. Overexpression of DKK3 resulted in elevated cellular migration and invasion, and conversely, DKK3 knockdown resulted in significantly reduced cell proliferation, migration and invasion. Detailed analyses revealed that these phenotypic changes associated with altered DKK3 expression may be the results of modulation of Wnt/beta-catenin signaling. These results strongly imply that DKK3 may tissue-specifically exert oncogenic function in OSCC, and might be the clinical target for metastasis management.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F3 がんの肺転移抑制におけるケモカイン CXCL14/BRAK と NKT 細胞との相乗作用

○陽　暁艶[1]，宮本　千央[1,2]，居作　和人[1,2]，加藤　靖正[3]，畑　隆一郎[1,2]

[1]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター
[2]神奈川歯科大　口腔科学
[3]奥羽大　歯

## Mechanisms of tumor suppression by chemokine CXCL14: Synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells on the suppression of metastasis on the lung

○Yang X[1]，Miyamoto C[1,2]，Izukuri K[1,2]，Kato Y[3]，Hata R[1,2]

[1]Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Biol Kanagawa Dent Univ
[3]Dept Oral Fxn Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent

［Purpose］We reported previously that high expression of chemokine CXCL14/BRAK（CXCL14）gene in the host animals resulted in suppression of carcinogenesis, growth and metastasis of tumor cells, and extended life span of tumor carrying animals（Scientific Reports 5:9083, 2015）. The aim of this study was to find the mechanisms of tumor metastasis suppression by CXCL14.［Materials & Methods］Melanoma cells or Lewis lung carcinoma（LLC）cells were injected via a tail vein into wild type（Wt）or CXCL14 transgenic（Tg）mice. Melanoma cells that had been engineered to express the CXCL14 gene under the control of doxycycline（B16-LMT3-Tet/OnBRAK）were also injected via a tail vein into Wt, T-cell and B-cell deficient SCID mice, or T-cell, B-cell and NK cell-deficient NOG mice to investigate colonization to the lungs. Some of the Tg and Wt mice were also pre-injected with NK cell depleting anti-asialo-GM1 or NK cell and NKT cell depleting anti-NK1.1 antibodies. We also pretreated mice with alpha-galactosylceramide, an NKT cell activator, to see the roles of NK cells and NKT cells in CXCL14-dependent tumor suppression in vivo.［Results］Expression of CXCL14 whether in host mice or in tumor cells suppressed rate of tumor metastasis on the lung. Injection of anti-asialo-GM1, anti-NK1.1 antibodies to the mice attenuated the suppressing effects of CXCL14 on the tumor metastasis but still rate of tumor suppression was higher in the CXCL14 Tg mice. Injection of alpha-galactosylceramide to the mice before and after injection of tumour cells enhanced the suppressing effects of CXCL14 on the tumor metastasis, and extended life span of tumor carrying animals.［Conclusion］Our results indicate that there are synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells, which secrets interferon gamma, on the suppression of tumor metastasis on the lung.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F4　抗体修飾バブルリポソームを活用した抗癌活性の作用機序の解明

○平林　文香[1,2]，岩永賢二郎[2]，沖永　敏則[1]，有吉　　渉[1]，西原　達次[1]

[1]九歯大　感染分子生物
[2]九歯大　生体機能 顎顔面外科

【目的】近年，超音波造影剤ガスを封入したバブルリポソームへの超音波照射により，細胞内へ薬物や遺伝子を送達するソノポレーション法が注目されている．口腔扁平上皮癌では，EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）が高発現していることが報告されている．そこで，今回我々は，抗 EGFR 抗体を修飾したバブルリポソームにソノポレーション法を併用することで，扁平上皮癌細胞に対して特異的に薬剤を導入する方法の開発を試みた．【方法】ヒト歯肉癌細胞株 Ca9-22 細胞を用いた．抗 EGFR 抗体は，B 細胞ハイブリドーマ 528 細胞の培養上清より回収した．Polyethylene glycol で修飾したリポソームに，抗 EGFR 抗体の部分還元体を結合させ，抗体修飾リポソームを作製した．さらにパーフルオロプロパンガスを内封してバブルリポソームを調製した．バブルリポソームを Ca9-22 細胞，Bleomycin（BLM）の混合液に添加し，超音波を照射した後，細胞の増殖抑制および細胞死について検討した．【結果】本方法により低濃度の BLM を導入したところ，著明な癌細胞増殖抑制効果が認められた．さらに，薬剤導入が誘導する細胞死はアポトーシスであることが明らかになった．【考察】これらの結果から，抗体修飾リポソームを使用したソノポレーション法は，口腔扁平上皮癌細胞株に，より効率的・特異的に薬剤導入が可能な anticancer drug delivery system であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Elucidation of mechanisms on anticancer drug delivery system using bubble immunoliposomes

○Hirabayashi F[1,2]，Iwanaga K[2]，Okinaga T[1]，Ariyoshi W[1]，Nishihara T[1]

[1]Div Infect Mol Biol, Dept Health Promotion, Kyushu Dent Univ
[2]Div Oral and Maxillacioa Surgery, Dept Sci Physical Functions, Kyushu Dent Univ

Purpose: Ultrasound-targeting bubble liposome destruction has been proposed as an innovative drug and gene delivery system which is known as 'sonoporation'. Epidermal growth factor receptor（EGFR）is reported to be overexpressed in oral cancer. In the present study, we developed a specific drug delivery system against squamous cell carcinoma using sonoporation and receptor-targeted immunoliposomes. Materials & Methods: Ca9-22, a human gingival carcinoma cell line, was used in this study. The anti-EGFR antibody was prepared by culture supernatant from 528 hybridomas. Immunoliposomes were generated by conjugating anti-EGFR antibody to liposomes, and were entrapped Ultrasound contrast gas for making bubble liposomes. Ca9-22 cells were exposed to ultrasound in the presence of bleomycin（BLM）and immunobubbleliposomes. Results: Bubble immunoliposomes and ultrasound exposure improved the growth inhibition of Ca9-22 cells at the low dose of BLM in vitro. In addition, the population of apoptotic cells were remarkably increased when a low dose of BLM was delivered by using sonoporation with bubble immunoliposomes. Conclusion: Sonoporation using bubble immunoliposomes makes it possible to administer drugs into cells more efficiently and specifically by novel mechanism of action, suggesting a novel application for chemotherapy treatment for oral squamous cell carcinoma.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F5 分子シャペロン R2TP complex は，口腔扁平上皮癌の進展にどのように関わるか？―酵母からがん研究へ―

○柿原　嘉人[1]，山崎　　学[2]，佐伯万騎男[1]

[1]新潟大　院医歯　歯科薬理
[2]新潟大　院医歯　口腔病理

R2TP complex は，出芽酵母で最初に同定され，哺乳類においても構造的，機能的に広く保存されている．ヒト R2TP complex は RuvBL1，RuvBL2，RPAP3，PIH1D1 の 4 つの異なるタンパク質から成り，RuvBL1 と RuvBL2 はヘテロ六量体リングに PIH1D1 が直接結合し，さらに RPAP3 が PIH1D1 に結合した安定な complex である．これまでに，この complex は，リボソーム生合成，PIKK シグナリング，RNA ポリメラーゼ II 形成に関わることが明らかにされているが，その中で，発表者らは，R2TP が mTOR パスウェイの mTORC1 複合体のアセンブリーやリボソーム RNA 前駆体のメチル化に関わる box C/D snoRNP のアセンブリーを助けるシャペロン機能を持つことを明らかにしてきた．興味深いことに，酵母の系において，R2TP は対数増殖期では核内に局在し，静止期になると細胞質へ移行することが観察され，さらなる解析によって，この R2TP の核-細胞質間のシャトリングが snoRNP/リボソーム生合成を調節し，細胞分裂を制御していることが明らかとなった．さらに，「細胞分裂が盛んながん細胞では，R2TP はどのような挙動を示すのだろうか？」という疑問を検証するため，口腔扁平上皮癌の組織標本対して R2TP 各因子の免疫組織染色を行ったところ，特に悪性度の高いがん組織において R2TP の核局在が顕著に観察された．このことから，R2TP は酵母の系と同様にがん細胞においても核－細胞質間の移行によって細胞分裂を制御していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## What is the role of molecular chaperone R2TP complex in oral squamous cell carcinoma? ―applying lessons from yeast to human cancer research―

○Kakihara Y[1]，Yamazaki M[2]，Saeki M[1]

[1]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

The R2TP is well-conserved protein complex from yeast to human, and is composed of the AAA+（ATPases Associated with diverse cellular Activities）proteins of RuvBL1 and RuvBL2, as well as PIH1D1 and RPAP3. Recent studies have shown that the R2TP is involved in ribosome biogenesis, PIKK signaling, and RNA polymerase II activity. We have demonstrated that the R2TP supports the assembly of mTORC1 complex and box C/D snoRNP by its chaperone function. In the current study, we found that the R2TP significantly associates with box C/D snoRNPs in vigorously growing yeast cells in nucleus but not in poorly growing cells as R2TP relocalizes to cytoplasm. Further functional analyses in yeast showed that the nucleus-cytoplasmic shuttling of R2TP controls the activity of ribosome biogenesis in response to different growth conditions. To investigate its role in cancer cells, we determined the localization of R2TP in OSCC（oral squamous cell carcinoma）biopsy specimens by immunohistochemical analysis. As a result, we observed the R2TP localization in nuclei especially in malignant cancer cells. Taken together, we propose that the R2TP could regulate the cancer cell development by shuttling between to nucleus and cytoplasm as well as controlling the snoRNP/ribosome biogenesis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F6 酸性細胞外 pH は，EMT を促進誘導する微小細胞外環境因子として機能するか？

○鈴木　厚子，前田　豊信，湯澤　　仁，加藤　靖正

奥羽大　歯　口腔生化

癌組織内の細胞外 pH（pHe）が酸性を示すことは Warburg 効果として良く知られており，近年，酸性 pHe が癌細胞の悪性形態を誘導することが明らかにされてきている．本研究では，Lewis lung carcinoma（LLC）細胞の亜株で，高転移株（LLCm4 細胞）と低転移株（LLCm1 細胞）を用いて EMT に対する酸性 pHe の影響について検討した．EMT のマーカーとして E-cadherin と Vimentin の発現量を RT-qPCR 法と免疫細胞化学染色で比較したところ，酸性 pHe は，上皮マーカーである E-cadherin を減少させ，間葉系マーカーである Vimentin の発現を誘導した．が，その効果はタンパク質レベルで顕著であった．酸性 pHe は CM 中に遊離してくる E-cadherin の ectodomain 量を増加させ，その shedding に関与する MMP9 合成が上昇した．さらに酸性 pHe は，Twist1 ,2 と Zeb2 の発現を誘導したことから，酸性 pHe による E- cadherin レベルの低下には合成阻害と ectodomain の shedding の 2 段階で調節されていることが示唆された．細胞の運動性について，wound healing assay で検討したところ，酸性 pHe により細胞運動能が亢進した．Matrigel を用いる Boyden chamber assey 法による in vitro 浸潤活性は，酸性 pHe により促進した．これらのことから，酸性細胞外 pH は，EMT を促進誘導する微小細胞外環境因子であることが示唆された．
キーワード：Lewis lung carcinoma（LLC）細胞，EMT，酸性 pHe，細胞外マトリックス，MMP9
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Does acidic extracellular pH function to promote EMT as the microenvironment factor?

○Suzuki A，Maeda T，Yuzawa S，Kato Y

Dept Oral Fnx Mol Biol Ohu Univ Sch Dent

It is well known, as the Warburg effect, that the extracellular pH（pHe）in cancer tissue is often acidic. In recent years, the acidic pHe has been suggested to be associated with malignant phenotype of cancer cells. In this study, we examined the effect of acidic pHe on the epithelial mesenchymal transition（EMT）using sublines of Lewis lung carcinoma cells, high metastatic LLCm4 and low metastatic LLCm1 cells. When vimentin and E-cadherin expressions were determined by RT-qPCR and immunocytochemistry, we found that acidic pHe decreased E-cadherin level and increased vimentin level. Their changes were markedly in protein levels rather than their mRNA levels. Acidic pHe increased both release of E-cadherin ectodomain and MMP9 secretion into CM. Moreover, acidic pHe induced expression of Twist1/2 and Zeb2. These data suggested that suppression of E-cadherin by acidic pHe was caused by two steps: i.e., reduction of mRNA level and subsequent its ectodomain shedding. Wound healing and Boyden chamber assays revealed that acidic pHe induced cell motility and in vitro invasive activity through Matrigel, respectively. From these results, acidic pHe promotes EMT as a microenvironmental factor. Keyword: Acidic extracellular pH, Invasion, EMT, Lewis lung carcinoma, MMP-9
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F7 Curdlan 誘導オートファジーによる syk の分解を介した破骨細胞分化制御機構

○有吉　涉，沖永　敏則，西原　達次

九歯大　感染分子生物

これまで我々は，破骨細胞前駆細胞に発現している C-type レクチン受容体の 1 つ dectin-1 のリガンドである curdlan が，NFATc1 の発現抑制を介して，破骨細胞の形成を負に制御すること，さらにそのメカニズムとして，syk タンパクの分解が関与していることを報告した．本研究では，curdlan による syk タンパクの分解機構について検討を行った．破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞の dectn-1 過剰発現株を樹立し，curdlan を添加して培養を行ったところ，dectin-1 とともに syk のタンパク発現量が著明に減少した．この現象は，遺伝子レベルでの発現抑制を伴わないことから，細胞内分解系による制御を想定し解析を行った．まず，bafilomycin A1 で前処理を行い，オートファゴソームとリソソームの融合を抑制したところ，curdlan 添加による dectin-1，syk タンパクの発現減少は回復し，curdlan による dectin-1，syk タンパクの分解が，オートファジー・リソソーム系に依存している可能性が示唆された．このことは curdlan の添加により，オートファゴソーム・オートリソソームのマーカーである LC3-II の形成が誘導されることからも支持された．さらに，阻害薬を用いた実験結果から，オートファゴソームによるバルク分解系の誘導に，phoshatidylinositol 3-kinase の活性化および分解のターゲット分子である syk のリン酸化が関与している可能性が示唆された. 本研究で, dectin-1 を介した curdlan による破骨細胞分化抑制に, オートファジー・リソソーム系の活性化が関与していることが明らかとなった．現在，オートファゴソーム形成に関わる autophagy-related gene（ATG）の関与について検討中である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Curdlan regulates osteoclast formation by autophagic/lysosomal degradation of syk protein

○Ariyoshi W，Okinaga T，Nishihara T

Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ

Dectin-1, a lectin receptor for beta-glucan, is found predominantly on cells of the myeloid lineage. In the previous study, we have demonstrated that the dectin-1 agonsist curdlan inhibits osteoclast formation through down-regulation of syk expression in osteoclast progenitor cells. To clarify the role of syk on osteoclastogenesis, we examined the syk expression in dectin-1 over expressing RAW 264.7 cells（d-RAWs）incubated with curdlan and observed the time-dependent syk protein degradation in the presence of curdlan. However, real-time RT-PCR analysis revealed that curdlan treatment had no effect on mRNA expression of syk in d-RAWs. From these results, we speculate that posttranslational modifications regulate the syk degradation induced by curdlan. Pretreatment with the autophagy/lysosome inhibitor, bafolomycin A1, but not proteasome inhibitor, MG132, markedly blocked syk degradation induced by curdlan. We also found that curdlan stimulation increased autophagy marker, LC3-II. These results suggested that autophagy plays an important role in osteoclastogenesis by regulating degradation of syk. Furthermore, inhibition of phosphatesitol 3-kinase and syk phosphorylation reversed the curdlan-induced syk degradation in d-RAWs. Manipulating syk expression levels by curdlan in osteoclast progenitor cells might have beneficial therapeutic effects in patients with osteoporosis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F8 PTH の投与頻度の違いによるリモデリング・ミニモデリングを基盤とした骨形成

○山本知真也[1]，長谷川智香[1]，本郷　裕美[1]，原口　真衣[1]，織田　公光[2]，網塚　憲生[1]

[1]北大　院歯　硬組織発生
[2]新潟大　院医歯　口腔生化

【目的】 骨形成の様式は，破骨細胞の骨吸収が先行するリモデリングと破骨細胞の骨吸収に依存しないミニモデリングに分けられる．また，PTH 間歇投与の骨形成のメカニズムは，リモデリング・ミニモデリングによるものか，あるいは，骨細胞の sclerostin 産生低下によるものか未だ明確ではない．我々はマウスに hPTH（1-34）を異なる頻度で投与した場合の骨形成様式について検索した．【材料と方法】 生後 6 週雄性マウスに PTH（20 μg/kg/日，80 μg/kg/日）を 4 回/日，2 回/日（高頻度群），1 回/日，1 回/2 日（低頻度群）で 2 週間，腹腔内投与した．同マウスをアルデヒド固定後，パラフィンまたは Epon 樹脂に包埋し，各種の組織化学ならびに透過型電子顕微鏡観察を行った．【結果と考察】 PTH 高頻度群を観察すると多数の不規則な骨梁が形成されており，鋸歯状の骨表面やセメントラインを観察した．骨梁周囲に ALP 陽性前骨芽細胞の厚い細胞層と多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在し，カルセイン二重標識では鋸歯状のセメントラインが観察されたことから，活発なリモデリングが推測された．一方，低頻度群を観察すると前骨芽細胞の細胞層はあまり発達せず，TRAP 陽性破骨細胞の数はコントロール群と比較して明らかな差は認められなかった．カルセインの二重標識では滑らかな骨表面とセメントラインが認められたことから，ミニモデリング様の骨形成が推察された．また，血中リン濃度を調節する FGF23 は PTH 投与頻度が高くなるにつれて多数の骨細胞に陽性反応が認められたが，sclerostin に関しては，コントロール群と PTH 投与群において明らかな違いは認められなかった．以上から，PTH は，高頻度投与では活発なリモデリングにより，一方，低頻度投与ではリモデリングとミニモデリングにより骨形成を誘導すると推測された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Remodeling-based and mini-modeling-based bone formation induced by PTH administration with different intervals

○Yamamoto T[1]，Hasegawa T[1]，Hongo H[1]，Haraguchi M[1]，Oda K[2]，Amizuka N[1]

[1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Div Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Purpose: Bone formation can be divided into two histological manners, remodeling and mini-modeling. Recently, reduced synthesis of sclerostin has been reported to be involved in PTH-driven anabolic effect. To provide a clue for better understanding how the different intervals of PTH administration induce bone formation, we have examined the mice femora administered with PTH in a regimen of different intervals. Material and method: Male mice at 6 week-old were subjected to intraperitoneal injection of hPTH（1-34）（20 micro-g/kg/day or 80 micro-g/kg/day）at the regimens of 1time/2day, 1time/day, 2times/day, 4times/day for 2 weeks. Mice were fixed with paraformaldehyde solution, and their femora and tibiae were assessed by histochemistry and TEM observation. Result and discussion: High frequency of PTH administration showed many metaphyseal trabecules and a thick preosteoblastic cell layer and many osteoclasts, and the resultant bone matrix included scalloped shape of cement lines and calcein labeling, indicating accelerated bone remodeling. In contrast, the low frequency showed mature osteoblasts localized atop mildly-convex bone surfaces that featured smooth cement lines（arrest lines）, therefore, indicating mini-modeling. Thus, it seems likely that high frequency of PTH administration induces remodeling-based bone formation, while the lower frequency causes more bone by not only bone remodeling but also mini-modeling.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F9 副甲状腺ホルモン(PTH)間歇投与による骨代謝マーカーと形態組織学的変化について

○廣瀬　勝俊，佐藤　　淳，大家　香織，野田　百合，社領　美紀，豊澤　　悟
大阪大　院歯　口腔病理

【目的】副甲状腺ホルモン(PTH）の間歇投与を利用した骨形成作用は，骨粗鬆症治療薬として使用されている．しかし，その投与方法の違いにより骨形成作用に差が生じ，その骨形成機序は未だ不明な点も多い．そこで，ヒトの骨粗鬆症治療に準じたPTH間歇投与を行ったラットにおける骨形成機序を骨代謝マーカーと形態学的観点から検討を行った．【方法】生後13週齢の雄性SDラットにPTH［1-34］(30 μg/kg)を週3回，皮下投与し，実験開始後1, 3, 6ヶ月目に採取した血清を凍結保存すると共に，μCTにて脛骨の骨密度測定を行った．実験開始後3,6ヶ月後には脛骨を4% PFAで固定し，未脱灰標本と脱灰標本を作製し，脱灰標本を免疫染色に用いた．凍結保存血清はELISAにより骨代謝マーカーを測定した．【結果と考察】PTH投与群では，1, 3, 6ヶ月後の脛骨で骨密度の上昇を認め，その差は脛骨近位部で顕著であった．形態学的観察から，PTH投与群では骨幹端部の海綿骨量が増加し，対照群と比較して太い骨梁が認められた．骨代謝マーカーでは，PTH投与群で成熟骨芽細胞のマーカーであるosteocalcin（OC)の血中濃度が有意に上昇したが，その他の骨代謝マーカー(TRAP5b，NTX，P1NP，Dmp1，SOST)に有意差は認められなかった．次に，各骨代謝マーカーに相当する抗体(TRAP，TypeIcollagen propeptide，OC，Dmp1，SOST)を用いて脛骨組織の免疫染色を実施したが，対照群と比較してPTH投与群に明らかな変化は認められなかった．以上から，ヒトの骨粗鬆症治療に準じたPTH間歇投与実験では，骨吸収の亢進は明らかではなく，骨形成の亢進が認められた．その骨形成機序には，骨芽細胞系列の中の成熟骨芽細胞が関与していることが示唆された．＊本研究は，旭化成ファーマとの共同研究である
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Elucidation of anabolic effects in bone by intermittent PTH administration

○Hirose K，Sato S，Oya K，Noda Y，Sharyo M，Toyosawa S
Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent

［Background］Intermittent administration of parathyroid hormone（PTH）is known to have an anabolic effect on bone, hence, it has been used for clinical treatment of osteoporosis. However, PTH has diverse effects on bone metabolism depending on the mode of administration and the mechanism of PTH actions is not fully understood. To address this issue, we elucidated the effects of intermittent administration of PTH corresponding to the mode of administration for clinical treatment of osteoporosis.［Materials and methods］13-week-old male SD rats were treated with s.c. human PTH［1-34］at 30（μg/kg), 3 times/week for 6 months. The experimental and the control rats at 1, 3 and 6 months after onset of treatment were studied.［Results and Discussion］μCT analysis indicated PTH-treated groups had increased bone mineral density in tibiae. An increase in trabecular thickness was histologically observed. Serum level of osteocalcin in PTH-treated groups was enhanced relative to controls, but no differences in serum TRAP5b, NTX, P1NP, Dmp1, and SOST. No significant difference of immunohistological findings in tibiae was observed between PTH-treated groups and controls. These findings indicated that intermittent administration of PTH enhanced bone formation without altering bone resorption and this anabolic effect may be involved in mature osteoblasts.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F10 軟骨内骨化および骨成長における NF-κB の時間・空間的制御機構の解明

○中富　千尋，浦田真梨子，松原　琢磨，古株彰一郎，自見英治郎

九歯大　分子情報生化

【目的】骨の骨化様式には軟骨内骨化と膜内骨化の 2 つの様式があり，軟骨内骨化においては軟骨細胞が静止・増殖・肥大軟骨細胞へと順次分化し最終的に骨に置換される．骨が効率よく成長するにはこの一連の連続的な過程が正常に機能することが重要であるが，この過程は非常に複雑で様々なシグナル分子により厳密に制御されている．転写因子群 NF-κB は骨代謝調節において非常に重要な分子であり多くの研究がなされてきたが，軟骨内骨化および骨成長制御機能についてはほとんど解析されていない．NF-κB の非古典的経路が常に活性化されている p100 分子変異型マウスは野生型と比較して体の大きさが顕著に小さく，軟骨内骨化における一連の過程に何らかの障害が生じていると考えられた．そこで我々は，p100 変異マウスの軟骨組織および骨形成過程を解析することにより，NF-κB の非古典的経路による軟骨内骨化の制御機構を明らかにすることを目的とした．

【方法と結果】出生直後から生後 21 日目の野生型および p100 変異型マウス長管骨（脛骨・腓骨）を 4% PFA にて固定後パラフィン包埋し，4 μm の薄切切片を作成した．Alcian blue により軟骨組織を染色し解析したところ，p100 変異マウスでは野生型と比較して成長板軟骨の肥大軟骨細胞層が減少し，腓骨頭軟骨細胞の肥大化は抑制されていた．さらにこの変化は生後 7 日目以降に生じることが明らかになった．また，TRAP 染色にて骨軟骨境界面に存在する破骨細胞の存在を確認したところ破骨細胞数は野生型と変異型マウスで同程度であったことから，変異型マウスにおける肥大軟骨細胞層の減少は破骨細胞の影響ではないと考えられた．

【結論】以上より，NF-κB の非古典的経路が軟骨内骨化および骨成長の制御に関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A spatiotemporal role of NF-κB in endochondral ossification and bone growth

○Nakatomi C，Urata M，Matsubara T，Kokabu S，Jimi E

Div Mol Signaling and Biochem, Kyushu Dent Univ

During skeletal development, the majority of the skeleton is formed by endochondral ossification, in which a cartilage template is replaced by bone. In long bones this process occurs at the primary and secondary ossification centers separated by the growth plate. To achieve longitudinal growth, growth plate chondrocytes go through several stages including proliferation, differentiation, hypertrophy and apoptosis. This intricate process is regulated by various signaling molecules. NF-κB signaling pathway is important for bone homeostasis but little is known about the regulatory role in bone growth. Reduced growth and shortened long bones are the unique phenotypes of the $p100^{-/-}$ mice, in which alternative NF-κB signaling pathway is constitutively activated. We observed the cartilage of tibiae and fibula of $p100^{-/-}$ mice at different postnatal stages. The hypertrophic zone of the growth plate of tibiae was narrower and the hypertrophy of chondrocytes was inhibited in the head of fibula of $p100^{-/-}$ mice and these defects started were seen after 7-day-old. In addition, the number of osteoclasts of $p100^{-/-}$ mice was almost equivalent to that of wild-type mice. These results suggest the alternative NF-κB signaling pathway is involved in the regulation of differentiation of chondrocytes and endochondral ossification.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F11　マウスメッケル軟骨におけるセプトクラストの局在と三次元的形態

○坂下　　英[1,2]，坂東　康彦[1]，平良芙蓉子[1,2]，崎山　浩司[1]，天野　　修[1]

[1]明海大　歯　解剖
[2]明海大　歯　口腔顎顔面外科

目的：セプトクラストは骨端板の骨軟骨境に存在する非石灰化軟骨基質を吸収する単核性の細胞である．しかし，他の軟骨吸収部位における分布や役割は全く不明である．メッケル軟骨は下顎骨に先行して発生し，耳小骨形成部位を除いて出生前に消失するが，その消失機構は不明な点が多い．本実験では，セプトクラストに特異的に発現する表皮型脂肪酸結合タンパク（E-FABP）を指標に用い，マウス胎仔メッケル軟骨におけるセプトクラストの分布を免疫組織化学的に検索し，さらにその三次元的形態を解析した．方法：胎生 15 日齢（E15），E16，E17，E18 の ddy マウスを 4%パラホルムアルデヒドで固定し，通常免疫染色に 10 μm の凍結連続切片，共焦点レーザー走査型顕微鏡での三次元的解析に 20 μm の凍結連続切片をそれぞれ作成した．一次抗体に抗マウス E-FABP ポリクロナール抗体（東北大学大和田教授より供与）を用いた．結果：E-FABP 陽性セプトクラストは E16 のメッケル軟骨中間部の吸収面に初めて認められた．E17 ではメッケル軟骨前方部の吸収面に沿って多数のセプトクラストが認められ，E18 では E17 と比較してセプトクラスト数が減少した．三次元的形態解析では，E-FABP 陽性セプトクラストは紡錘形で単核性の細胞体と，吸収面に伸びた数本の突起を持っていたが，突起を持たないタイプや，紡錘形を示さないタイプ等の形態的変化が認められた．考察・結語：これらの結果から，セプトクラストがメッケル軟骨の吸収面に沿って存在し，軟骨基質の吸収に関与することが示唆された．また，メッケル軟骨におけるセプトクラストの形態には種々のタイプが認められたことから，吸収部の基質の状態も変化に富むことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Localization of septoclasts in Meckel's cartilage of mice and their three-dimensional morphology

○Sakashita H[1,2]，Bando Y[1]，Taira F[1,2]，Sakiyama K[1]，Amano O[1]

[1]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div Oral Surg II, Meikai Univ Sch Dent

Septoclasts are mononuclear spindle-shaped cells resorbing uncalcified cartilage matrix at the growth plate, but their distribution is still unclear at other types of cartilage including Meckel's cartilage（MC）in the embryonic mandible. This study aimed to clarify the spatial and chronological localization of septoclasts in mouse MC using the immunohistochemistry of epidermal-fatty acid-binding protein（E-FABP）expressed exclusively in septoclasts. Septoclasts immunopositive for E-FABP were initially recognized at the resorption sites of the intermediate portion of MC. At E17, many septoclasts were distributed along the resorption surface of the anterior portion of MC, but they decreases in number to E18. Three-dimensional analyses by a confocal laser-scanning microscope revealed that septoclasts in MC showed spindle-shaped cell body accompanying several short processes elongating toward the resorption surface. In addition, septoclasts with non-spindle-shaped cell body or without cell processes were also found. These results suggest that septoclasts participate in the resorption of various conditioned uncalcified matrix during the regression of mouse MC.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-F12　レチノイン酸欠乏・過剰による septoclast の増殖抑制と形態変化の誘導

○坂東　康彦，坂下　　英，崎山　浩司，天野　　修

明海大　歯　解剖

【背景】表皮型脂肪酸結合タンパク（E-FABP）は peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）beta を介する細胞増殖を誘導する脂肪酸またはレチノイン酸（RA）シグナル伝達に関与すると考えられている．我々はこれまでにマウス骨端板で軟骨吸収に関与すると考えられている septoclast の E-FABP の発現と PPARbeta の局在を示し，RA 欠乏・過剰が septoclast の数の減少と形態変化を引き起こすことを示した．今回，免疫組織化学的手法を用いて RA 欠乏・過剰と septoclast の細胞数減少，形態変化の誘導の関連について解析した．

【方法】RA300 mg/kg を経口過剰摂取させた生後 4 週齢（P4w），ビタミン A 欠乏食を離乳期より摂食させた P9w ddy マウス，およびそれらのコントロールから採取した脛骨骨端板の凍結組織切片に対し，抗 E-FABP 抗体（東北大学大和田祐二教授供与）と PPARbeta，TUNEL 法，retinoic acid receptror（RAR）beta，cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein（CD-RAP）の免疫組織化学的蛍光二重染色を行った．

【結果】ビタミン A 欠乏（RA 欠乏）で septoclast に細胞増殖抑制と形態変化を誘導する CD-RAP が局在した．RA 過剰で septoclast に細胞増殖を媒介する PPARbeta の発現抑制と，アポトーシスのマーカーの TUNEL 陽性反応，RA によるアポトーシス誘導を介する RARbeta の局在が認められた．

【結論】本研究結果から，RA 欠乏・過剰における septoclast の細胞数減少，形態変化には PPARbeta，CD-RAP，RARbeta が関与することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Induction of growth arrest and morphological alteration in septoclasts by deficiency and excess of retinoic acids

○Bando Y，Sakashita H，Sakiyama K，Amano O

Div Anat, Meikai Univ Sch Dent

**Background:** We previously reported that epidermal-type fatty acid-binding protein（E-FABP）and peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）beta were localized in septoclasts, cartilage-resorbing cells in the epiphyseal plate of mice. Furthermore, we showed that morphological change and decrease in number of septoclasts were caused by RA deficiency and excess. In the present study, the mechanism of septoclastic changes caused by RA was investigated immunohistochemically.

**Methods:** RA-excess mice were given an oral dose of RAs at 4-weeks old（P4w）and RA-deficient mice were received the vitamin A-free diet from weaning to 9-weeks old. Double immunofluorescent staining of E-FABP and PPARbeta, TUNEL method, retinoic acid receptror（RAR）beta and cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein（CD-RAP）were performed.

**Results:** In septoclasts of RA deficiency, CD-RAP which induces cell growth arrest and morphological change was immunolocalized. PPARbeta mediating cell proliferation was reduced compared with control. In RA excess, apoptosis positive for TUNEL reaction or RARbeta which mediates apoptosis was induced in septoclasts.

**Conclusion:** These results suggest that PPARbeta, CD-RAP and RARbeta are involved in RA-induced changes of septoclasts in mouse epiphyseal plate.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G1 *Streptococcus sanguinis* による IL-1α 産生誘導活性

○佐伯　　歩[1]，長谷部　晃[1]，中澤　　太[2]，柴田健一郎[1]

[1]北大　院歯　口腔分子微生
[2]北医療大　歯　微生物

*Streptococcus sanguinis*（Ss）は，感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目されており，その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている．IL-1 は IL-1α と IL-1β からなり，昨年の本学術大会で，Ss がマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1β の産生を誘導することを報告した．そこで，今回は，Ss の IL-1α 産生誘導活性について検証した．

C57BL/6（B6）マウスならびに caspase-1，ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ（BMM）を大腸菌 LPS で 4 時間プライミングした後，*S. sanguinis* ATCC 10556 で 12 時間刺激した．上清中に放出された IL-1α 量は ELISA 法で測定した．

Ss は B6 由来の BMM に IL-1α の産生を誘導し，caspase-1，NLRP3 ならびに ASC をノックアウトすることにより減弱した．しかしながら，本活性は caspase-1 阻害剤である z-YVAD-FMK では阻害されなかった．

Ss は BMM に対して IL-1α 産生を誘導する活性を有し，その活性発現には NLRP3 インフラマソームは関与するが，caspase-1 のタンパク質分解活性は関与しないことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## IL-1alpha inducing activity of *Streptococcus sanguinis*

○Saeki A[1]，Hasebe A[1]，Nakazawa F[2]，Shibata K[1]

[1]Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

*Streptococcus sanguinis*（Ss）, a human oral inhabitant, is one of the most potent agents of infective endocarditis（IE）. Recently, the proinflammatory cytokine IL-1 consisting of IL-1alpha and IL-1beta has been shown to contribute to the onset of IE. Last year, we showed that Ss activates the NLRP3 inflammasome to produce IL-1beta in murine dendritic cells and macrophages. Therefore, this study was designed to examine whether Ss has the activity to induce IL-1alpha production by these cells. Bone marrow-derived macrophages（BMMs）from C57BL/6（B6）, NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient mice were used. These cells were stimulated for 4 h with E. coli LPS and then for 12 h with *S. sanguinis*（Ss）ATCC 10556 in the presence of penicillin and streptomycin. IL-1alpha secreted was measured by ELISA. Ss cells had the activity to induce secretion of IL-1alpha by BMMs from B6 in a dose-dependent manner, but the activity toward NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient BMMs were significantly attenuated. The activity was not attenuated by the caspase 1 inhibitor z-YVAD-fmk. Thus, this study suggests that the IL-1alpha-inducing activity of Ss was mediated by the NLRP3 inflammasome activation, but not by the proteolytic activity of caspase-1.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G2 咀嚼粘膜に発現するB7-H1は過度な免疫応答による損傷を保護している

○Kang Siwen，大野　建州，永井　重徳，東　みゆき
医科歯科大　院医歯　分子免疫

## Masticatory mucosa-associated B7-H1 protects excess immune-related tissue damage

○Kang SW，Ohno T，Nagai S，Azuma M
Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

［Purpose］Immune checkpoint receptors such as CTLA-4 and PD-1 play crucial roles for maintaining self-tolerance and preventing excess tissue damages by immune responses against exogenous antigens. B7-H1（CD274）is one of ligands for PD-1 and often induced on non-lymphoid tissue cells at the inflammatory condition as well as lymphoid cells. We previously reported that B7-H1 was physiologically induced on prickle cells of masticatory mucosae such as dorsal surface of tongue（DST）, gingiva and hard palate. Various topical stimuli could induce B7-H1, but the expression level on the basal cells was consistently limited. In this study, we examined functional contribution of masticatory mucosa-associated B7-H1 in local inflammatory responses.［Results］Topical painting with OVA and/or DNFB onto the skin, buccal mucosa（BM）, or DST induced B7-H1 along with the basal cell proliferation, however the induced levels on basal cells of BM and DST were clearly impaired. Transfer of in vitro activated DO11.10 T cells and OVA/DNFB painting onto DST induced local inflammation, but these inflammatory responses were further enhanced by treatment with a neutralizing anti-B7-H1 mAb. B7-H1 expression was observed in both epithelial cells（EC）and infiltrating immune cells and infiltrating T cells expressed PD-1. Thus, to distinguish the contribution of EC-associated B7-H1, we established B7-H1/PD-1 double-knockout bone marrow（BM）chimera mice that selectively lack B7-H1/PD-1 expression on immune cells. Similar transfer of activated DO11.10 T cells and OVA/DNFB-painting induced local infiltration of PD-1+ DO11.10 CD4+ T cells over the basement membrane. Blockade of B7-H1 further increased CD4+ T cell infiltration with severe damage of epithelium. Transfer of PD-1-/- DO11.10 T cells also showed the enhanced local inflammation.［Discussion］These results suggest that masticatory mucosa-associated B7-H1 negatively regulates effector function of PD-1+ T cells and protects from excess tissue damages mediated by immune cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G3 *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading に関与する因子について

○今村　圭吾[1]，近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，成田　由香[3]，藤原　　卓[1]，中山　浩次[2]

[1]長崎大　院医歯薬　小児歯
[2]長崎大　院医歯薬　微生物
[3]福歯大　感染生物

Bacteroidetes フィラムに属する *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原細菌は 9 型分泌機構（T9SS）を介し，様々な病原タンパク質を分泌している．本研究の対象であるグラム陰性細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は土壌中や水中に生息する細菌であるが，Bacteroidetes フィラムに属し，T9SS を構成する遺伝子群を保有している．本菌の T9SS はキチナーゼなど本菌を特徴づける菌体表層タンパク質の輸送に関与するとともに，本菌の滑走運動とも密接な関係がある．*F. johnsoniae* は colony spreading（CS）を起こす．この現象はこの菌の持つ滑走運動能と関係しており，その関連遺伝子の欠損変異株では起きない．我々は，1%寒天濃度の栄養飢餓培地上では，富栄養培地に比較して著明な CS が起き，グルコースを添加すると，グルコース濃度依存的に CS が抑制されることを報告した．CS には滑走運動能が関係し，環境因子が影響を与えていると考えられるが，どのような機構で CS が起こるのかについての詳細な研究はない．供使菌株として *F. johnsoniae* ATCC 17061（UW101）を用いた．栄養飢餓培地として PY2 および同培地にグルコースを添加した PYG の寒天濃度を 0.3%に変更した培地（mPY2，mPYG）を用いて，CS について検討した．我々が以前報告した 1%寒天培地とは異なり，mPYG で樹枝状の CS がみられた．これは，ある遺伝子領域（X 遺伝子群）の欠損株では野生株に比して CS が著しく亢進した．さらに，各菌株の発現タンパク質を比較したところ，複数のタンパク質の発現に相違があり，そのなかに我々が以前報告したコロニー拡張因子（colony spreading factor, CSF）があった．このことから，0.3%寒天 PYG 培地での CS にも CSF が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Investigation of Colony Spreading related factors in *Flavobacterium johnsoniae*

○Imamura K[1]，Kondo Y[1]，Sato K[2]，Narita Y[3]，Fujiwara T[1]，Nakayama K[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[3]Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontopathic bacteria belonging to Bacteroidetes phylum secrete various virulence proteins by the type IX secretion system（T9SS）. *Flavobacterium johnsoniae*, which is a gram-negative bacterium living in the soil or freshwater, possesses a gene cluster of T9SS involving in transportation of some proteins and a gliding system. *F. johnsoniae* cells exhibit Colony Spreading （CS）. *F. johnsoniae* CS was found to take place under a starvation condition and was inhibited by addition of glucose to the starved media. *F. johnsoniae* mutants defective in gliding motility showed no CS. Therefore, CS seems to be related with gliding motility and environmental factors may influence on CS. In this study, *F. johnsoniae* ATCC 17061 was incubated on the modified PY2（mPY2）medium solidified with 0.3% agar or mPY2（0.3% agar）supplemented with glucose（mPYG）. *F. johnsoniae* spread on mPYG in a dendritic shape. This dendritic CS was strongly enhanced in the deletion mutant of X gene cluster. SDS-PAGE with these strains revealed that the expression of several proteins including the colony spreading factor（CSF）previously found was different among the strains, indicating that the CSF was related to the dendritic CS.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G4 *Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素に着目した分子進化解析

○山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，広瀬雄二郎[1,2]，後藤　花奈[1]，住友　倫子[1]，川端　重忠[1]

[1]大阪大　院歯　口腔細菌
[2]名大　院医　泌尿器

*Streptococcus agalactiae* は新生児の細菌性髄膜炎の主な原因菌であり，健常な小児の咽頭や成人の腸管，膣などから分離される．本菌は，シアル酸が表層に局在する莢膜多糖を産生する一方，肺炎球菌のシアル酸分解酵素 NanA と相同性の高い分子を有する．小児に細菌性髄膜炎を惹き起こす肺炎球菌においては，NanA が中枢神経系への侵入因子および抗貪食因子として働くことが報告されている．そこで本研究では，*S. agalactiae* の NanA 様分子の系統解析と機能の検討を行った．

アミノ酸配列の比較解析から，*S. agalactiae* の NanA 様分子は，肺炎球菌の NanA で保存される糖鎖認識部位と細胞壁架橋モチーフを欠落することが明らかとなり，この分子を NonA と命名した．*nanA* と *nonA* の遺伝子配列を用いて，ベイズ法および最尤法により作成した系統樹から，*nonA* は *nanA* から派生したことが示唆された．次に，*S. agalactiae* の *nonA* 欠失株ならびに NanA 発現 *nonA* 欠失株を作製し，シアル酸分解能を比較したところ，野生株と *nonA* 欠失株では分解活性が認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株は高い分解活性を呈した．また，野生株と各変異株を用いてヒト脳血管内皮細胞への侵入試験を行った結果，野生株と *nonA* 欠失株の侵入能に差は認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株は両株と比較して約 3 倍の細胞内侵入率を示した．さらに，血中殺菌試験を行ったところ，野生株と *nonA* 欠失株に差は認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株の血中生存率は両株と比較して約 3 割に低下した．

これらの結果から，NonA は進化の過程でシアル酸分解能を失い，*S. agalactiae* のヒト脳血管内皮細胞への侵入ならびに血中生存能に寄与しないことが示唆された．また，*S. agalactiae* がシアル酸分解能を失い，莢膜シアル酸を持つという新たな生存戦略を選択した可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular evolutionary analysis on inactive sialidase of *Streptococcus agalactiae*

○Yamaguchi M[1]，Nakata M[1]，Hirose Y[1,2]，Goto K[1]，Sumitomo T[1]，Kawabata S[1]

[1]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Urol, Nagoya Univ Grad Sch Med

*Streptococcus agalactiae*, a leading cause of meningitis in human newborns, is commonly isolated from pharyngeal, rectal, or virginal sites. *S. agalactiae* contains pneumococcal sialidase-like protein, whereas the sialic acid-capsule of *S. agalactiae* is a critical virulence factor. The sialidase of *Streptococcus pneumoniae*, NanA, functions as an invasin of central nervous system and anti-phagocytic factor. In this study, we analyzed the role of *nanA*-ortholog of *S. agalactiae* in the pathogenesis.

We named the *nanA*-ortholog as "*nonA*", since computational analysis showed that NonA lacks the lectin-domain and cell wall anchoring motif conserved in NanA. Phylogenetic analysis indicated that *nonA* was derived from *nanA*. *S. agalactiae* wild-type and *ΔnonA* strains did not show sialidase activity, but *ΔnonA*-pNanA strain showed high activity. The invasion rate of *ΔnonA*-pNanA strain into human brain microvascular endothelial cells was more than three times higher than that of wild-type and *ΔnonA* strains, while there were no differences between wild-type and *ΔnonA* strains. Interestingly, the growth rate of *ΔnonA*-pNanA strain in human blood was ～30% of that of wild-type and *ΔnonA* strains.

These results indicated that NonA lost its sialidase activity during evolutional history and *S. agalactiae* acquired another survival strategy with sialic acid-capsule instead of the active sialidase.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G5 口腔バイオフィルム初期形成期における cyclic dipeptide の影響

○眞島いづみ[1,2]，宮川　博史[2]，中澤　　太[2]

[1]学振　特別研究員　PD
[2]北医療大　歯　微生物

【背景】*Streptococcus* 属と *Veillonella* 属細菌は口腔バイオフィルムの初期形成を担うことが報告されている．我々のこれまでの研究過程において，*V. tobtsuensis* の存在下で *S. gordonii* のバイオフィルム形成量が著しく増加することを明らかにし，かつ *V. tobetsuensis* の培養上清中に cyclic dipeptide, Autoinducer（AI）-1, AI-2 様物質が強く検出されることを報告した．【目的】cyclic dipeptide が Autoinducer 様物質として，*S. gordonii* と *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に与える影響を解析した．【方法】cyclic dipeptide である cyclo（-L-Leu-L-Pro）（CHEM-IMPEX INT'L INC.）を段階希釈後，培地に添加し，*S. gordonii* と *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響をワイヤー法で解析した．【結果】cyclo（-L-Leu-L-Pro）は，*S. gordonii* 及び *V. tobetsuensis* の生育及びバイオフィルム形成において有意な影響は及ぼさなかった．【考察】本研究の結果から，*V. tobetsuensis* 由来 cyclic dipeptide 様物質は，*S. gordonii* 及び *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に影響を与えず，通常の Autoinducer として働く可能性は低いことが考えられた．また，*V. tobetsuensis* 存在下で，*S. gordonii* のバイオフィルムを増加させる因子は，cyclic dipeptide 様物質以外の因子であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of cyclic dipeptide on the oral biofilm formation at early stage

○Mashima I[1,2]，Miyakawa H[2]，Nakazawa F[2]

[1]Research Fellow JSPS
[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Backgrounds: It is suggested that oral *Veillonella* has important roles with oral *Streptococcus* in the biofilm formation at early stage. Our previous study demonstrated that *V. tobetsuensis* promotes to form the biofilm of *S. gordonii* significantly. Also, It has been previously reported that cyclic dipeptide, Autoinducer（AI）-1 and AI-2 like substance were detected in the supernatant from *V. tobetsuensis* as strong signals. Purpose: In this study, the effects of cyclic dipeptide on the biofilm formation of *S. gordonii* and *V. tobetsuensis* were investigated. Method: Cyclic dipeptide, cyclo（-L-Leu-L-Pro）were added to the medium after making serial dilution. The biofilm was quantified by using wire method reported previously. Results: Cyclic dipeptide had no effects on the growth and biofilm formation of *S. gordonii* and *V. tobetsuensis* significantly. Discussion & Conclusion: It was suggested that cyclic dipeptide like substance from *V. tobetsuensis* had no effects on the biofilm formed by *S. gordonii* and *V. tobetsuensis*. These facts proposed that the promotion factor of the biofilm formed by *S.gordonii* with *V. tobetsuensis* might be any other substances in the supernatnats from *V. tobetsuensis*.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G6 *Salmonella* Typhimurium の細胞内増殖は PLC-related catalytically inactive protein によるオートファジー調節により抑制される

○原田　佳枝，兼松　　隆

広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理

【目的】我々は，PRIP（PLC-related catalytically inactive protein）が新たなオートファジー調節分子であり，アミノ酸飢餓刺激によるオートファジーを調節するとともに，細胞内へ侵入した黄色ブドウ球菌の増殖をオートファジー系を介して調節することを示した．ここでは，PRIP を介したオートファジーによる細菌増殖調節の分子メカニズムを明らかにするため，サルモネラ（*Salmonella* Typhimurium）感染モデルを用いて検討した．

【方法】PRIP ノックアウト（*Prip*-KO）マウスより胎児繊維芽細胞（mouse embryonic fibroblast, MEF）を調整した．MEF にサルモネラを感染させて LC3（microtubule-associated protein 1 light chain 3）抗体で免疫染色と DAPI で細菌 DNA の染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡による観察で LC3 陽性 *Salmonella* containing vacuoles（SCVs）を検出した．さらに，RFP-GFP-LC3 の GFP の pH 感受性を利用して *Prip*-KO 細胞のオートファゴソーム成熟を検討した．MEF にサルモネラを感染させ，成熟した SCVs（$GFP^-/RFP^+$）と未成熟 SCVs（$GFP^+/RFP^+$）に含まれる細菌数を測定し，1 細胞あたりで SCVs に含まれるサルモネラのなかで，何％が成熟 SCVs にあるか計算し比較した．

【結果】サルモネラ感染時の *Prip*-KO 細胞では，細胞内サルモネラ菌数，LC3 陽性 SCVs 内のサルモネラ菌数ともに，野生型に比べて増加していた．また *Prip*-KO 細胞では，SCVs における RFP-GFP-LC3 の GFP シグナル消失が野生型よりも減少したことから，autophagic flux が抑制されていることが分かった．

【考察】*Prip*-KO 細胞では，SCVs 成熟に伴う酸性化が抑制されて細菌排除能が低下した結果，細胞内の細菌増殖が促進していることが示唆された．これにより，PRIP が細胞内のサルモネラ増殖を調節する分子であることが明らかとなった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Intracellular growth of *Salmonella* Typhimurium is inhibited by autophagic regulation of PLC-related catalytically inactive protein

○Harada-Hada K，Kanematsu T

Dept Mol Cell Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

We have elucidated that PLC-related catalytically inactive protein（PRIP）is a novel autophagic regulator that mediates intracellular proliferation of *Staphylococcus aureus* in host cells. To disclose the molecular mechanisms of bacterial elimination by autophagic pathway, we here examined using a *Salmonella* Typhimurium infection assay. In mouse embryonic fibroblasts（MEFs）infected with *Salmonella*, the number of intracellular bacteria and bacteria surrounded by LC3-positive autophagosome-like vacuoles were both increased in *Prip*-knockout（KO）MEFs. In addition, we analyzed autophagic flux by measuring GFP-signal quenching of RFP-GFP-LC3, and it was inhibited in *Salmonella* containing autophagosome-like vacuoles（SCVs）of *Prip*-KO MEFs. Altogether, impaired acidification in SCVs of *Prip*-KO MEFs may induce abnormality in antibacterial autophagy, resulting in remarkable *Salmonella* proliferation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G7 除脳ラット灌流標本を用いた上気道筋群の支配神経活動への $CO_2$負荷の影響

○立川　哲史[1]，中山希世美[1]，望月　文子[1]，中村　史朗[1]，清本　聖文[1]，飯島　毅彦[2]，井上　富雄[1]

[1]昭和大　歯　口腔生理
[2]昭和大　歯　歯科麻酔

血中 $CO_2$濃度の上昇により動脈血液中の pH が低下すると，中枢の化学受容器や末梢の化学受容器が興奮し，呼吸リズムを変化させることが知られている．上気道の形状は気道開通性において極めて重要な役割を果たしているが，喉頭周囲筋の活動に対する $CO_2$濃度上昇の影響は明らかでない．そこで，本研究では，除脳ラット経動脈灌流標本を用いて，灌流液の $CO_2$濃度を変化させ，喉頭周囲筋を支配する神経の活動にどのような影響を及ぼすのか調べた．実験には，生後 3-4 週齢のラットを用いた．除脳ラット灌流標本を作製し，95% $O_2$-5% $CO_2$混合ガスで曝気した人工脳脊髄液（pH7.4）を灌流させた．横隔神経，上喉頭神経，舌骨下筋群を支配する第一，第二頸髄神経の枝（C1－2），舌根を支配する舌下神経，声門の開大，閉鎖を支配する反回神経から吸引電極を用いて複合活動電位を記録した．次に，92% $O_2$-8% $CO_2$混合ガス曝気によって灌流液中の $CO_2$濃度を上昇させ，活動電位に対する影響を調べた（n＝5）．その結果，呼吸頻度は 15.1±9.5%低下したが，横隔神経，上喉頭神経および C1－2，舌下神経，反回神経の活動の振幅は，それぞれ 20.6±8.8%，11.1±3.2%，26.3±8.8%，41.6±14.5%，23.8±3.7%増大した．さらに，横隔神経に対する C1－2 の神経活動開始は，$CO_2$濃度の上昇により有意に早くなった（コントロール vs $CO_2$濃度上昇:0.28±0.03 秒 vs0.83±0.04 秒）．また，上喉頭神経，舌下神経，反回神経でも同様の傾向が見られ，それぞれ（0.18±0.05 秒 vs0.81±0.02 秒）（0.21±0.06 秒 vs0.66±0.10 秒）（0.144±0.02 秒 vs0.39±0.06 秒）となった．以上の結果から，$CO_2$濃度の上昇により，中枢あるいは末梢の化学受容器が横隔膜の運動のみならず，喉頭周囲筋の運動に変化を引き起こしている可能性が示唆された

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of hypercapnia on respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles

○Tachikawa S[1]，Nakayama K[1]，Mochizuki A[1]，Nakamura S[1]，Kiyomoto M[1]，Iijima T[2]，Inoue T[1]

[1]Dept Oral Physi, Showa Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Perioperative Med Div Anesthesiol, Showa Univ Sch Dent

Hypercapnia induces activation of central chemoreceptors and peripheral chemoreceptors and changes in the respiratory rhythm. However the influence of hypercapnia on the activity of the muscles related to patency of upper airway is unclear. In this study, we examined efferent nerve activities in a branch of the cervical spinal nerve innervating the infrahyoid muscles（CN), the superior laryngeal nerve（SLN), the recurrent laryngeal nerve（RLN), and the hypoglossal nerve（HN）innervating the lingual radix with the phrenic nerve（PN）under hypercapnic acidosis. Experiments were performed on arterially-perfused decerebrate rats aged between postnatal days 21-33. When $CO_2$ concentration in the perfusate was increased from 5% to 8% to make preparations hypercapnic acidosis, peak amplitude of the respiratory nerve activity in all the recorded nerves increased. Moreover, the hypercapnic acidosis advanced the onset of the respiratory activity in the CN, SLN, RLN, and HN with the reference of the onset of the respiratory activity in the PN. These results suggest that hypercapnia acidosis affects the pattern of movements among the, muscles related to patency of upper airway and the diaphragm.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G8 マウス咬筋の筋活動に対するシタロプラムの影響

○野川　泰葉[1,2]，望月　文子[1]，加藤　隆史[3]，片山　慶祐[4]，安部　友佳[4]，中村　史朗[1]，
中山希世美[1]，若林　則幸[2]，馬場　一美[4]，井上　富雄[1]

[1]昭和大　歯　口腔生理
[2]医科歯科大　院医歯　部分床義歯補綴
[3]大阪大　院歯　口腔解剖 2
[4]昭和大　歯　補綴

ブラキシズムは異常な咀嚼筋活動で，顎口腔領域に重大な障害を引き起こす可能性がある．近年，抗うつ薬の一種であるセロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）の長期服用はブラキシズムを悪化させる危険因子になり得ることが示唆されているが，SSRI が咬筋活動にどのような影響を与えるのか不明である．そこで，SSRI の一種であるシタロプラムを投与したとき，覚醒，ノンレム睡眠，レム睡眠時の咬筋活動の変化を検討した．動物は 7～10 週齢の雄性 C57BL/6 系統のマウスを用い，脳波，眼電図，頸筋および咬筋筋電図を記録した．手術により記録電極を設置したマウスは 5 日間の回復期間の後，1 日おきに 3 日馴化し，1 日の休憩期間の後，生体電気信号を 24 時間記録し，コントロールとした．その後，生理食塩水（生食）あるいはシタロプラムを充填した浸透圧ポンプを背部皮下に埋入し，生食（5 匹），シタロプラム 10 mg/kg/day（6 匹），シタロプラム 100 mg/kg/day（4 匹）を 5 日間持続的に投与後，24 時間記録した．咬筋の筋活動は 10 秒エポック毎の積分値を求め，コントロールの覚醒時の筋活動量の平均値を 100％として正規化し評価した．暗期のレム睡眠ではシタロプラム 100 mg/ kg 投与群の咬筋の筋活動量は生食群に比べて有意に増加した．また，ノンレム睡眠でもシタロプラム投与群の咬筋の筋活動量は生食投与群と比較して有意差はなかったが増加する傾向があった．一方，覚醒時では，咬筋の筋活動量はシタロプラム投与群と生食群で有意な差が認められなかった．以上の結果から，マウスに高濃度のシタロプラムを 5 日間投与すると，レム睡眠時で咬筋活動の増加が認められ，シタロプラムは睡眠時の咬筋の筋活動を増加させる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effects of citalopram on masseter muscle activities in mice

○Nogawa Y[1,2]，Motizuki A[1]，Kato T[3]，Katayama K[4]，Abe Y[4]，Nakamura S[1]，Nakayama K[1]，
Wakabayashi N[2]，Baba K[4]，Inoue T[1]

[1]Dept Oral Physi, Showa Univ Grad Sch Dent
[2]Removable Partial Prosth, Tokyo Med and Dent Univ, Grad Sch Med and Dent Sci
[3]Dept Oral Anat and Neurobio, Osaka Univ Grad Sch Dent
[4]Dept Prosth, Showa Univ Sch Dent

Bruxism is characterized by involuntary masseter muscle activity, and administration of the selective serotonin reuptake inhibitors（SSRIs; citalopram）for long periods has been reported to be one of the exacerbating factors in bruxism. However, it is unknown how SSRIs affect masseter muscle activity. In this study, we examined the effects of citalopram on the masseter muscle activity during wakefulness（W）, non-rapid eye movement（NREM）sleep and rapid eye movement（REM）sleep. After a training session, EEG, EOG, and EMG of the masseter and neck muscles in mice were recorded for 24 h as the control condition. Then mice were implanted subcutaneously with osmotic minipumps that infused saline or citalopram（10 mg and 100 mg/kg/day）for 5 days. Subsequently, the recording sessions of the administration conditions were acquired for 24 h. In the dark period citalopram（100 mg/kg）significantly increased the mean activity of the masseter muscle during REM compared with saline administration. Citalopram tend to increase the masseter muscle activity during NREM, although the difference was not significant. During W, the masseter muscle activity was not significantly different between citalopram and saline administrations. These results suggest that citalopram may affect the masseter muscle activity during sleep.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G9 外側手綱核から三叉神経中脳路核ニューロンへの直接投射

○大原　春香[1,2]，佐藤　文彦[1]，加藤　隆史[1]，山城　　隆[2]，吉田　　篤[1]

[1]大阪大　院歯　口腔解剖 2
[2]大阪大　院歯　矯正

【背景と目的】三叉神経中脳路核ニューロン（Vmes）は，咀嚼筋筋紡錘や歯根膜に生ずる深部感覚を伝達する一次求心性ニューロンであり，顎，舌，咽頭，喉頭の運動の制御に極めて重要である．脳内に存在する三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体は，辺縁系（情動）にかかわる様々な大脳皮質や皮質下の脳部位からの下行性の入力を受けることが知られている．しかし，負の情動（痛み，ストレス，不安など）のセンターである外側手綱核（LHb）が，顎口腔領域や咽頭喉頭の運動の制御にどのように関わるのかは不明である．【方法】ラットを用い，ペントバルビタール麻酔下で実験を行なった．逆行性トレーサーである Fluorogold（FG）の Vmes への注入と，順行性トレーサーである biotinylated dextranamin（BDA）の LHb への注入を行い，LHb から Vmes ニューロンへの直接投射の有無とその様態を検討した．【結果】FG の Vmes への注入により，逆行性に標識されたニューロンが，LHb 外側部（LHbl）にわずかに同側優位の両側性に多数認められたが，LHb 内側部（LHbm）にはほとんど認められなかった．BDA の LHbl への注入により，順行性に標識された軸索と終末が Vmes にわずかに同側優位の両側性に多数認められ，Vmes ニューロンの細胞体とコンタクトする標識軸索終末も認められた．しかし，LHbm に限局した BDA の注入では，標識軸索は Vmes には両側ともに認められなかった．【考察】本研究によって，LHbl から Vmes ニューロンへの直接投射の存在が初めて明らかになった．この投射路を介して，顎，舌，咽頭，喉頭の運動が負の情動によって調節される可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Direct projection from lateral habenula to trigeminalmesencephalic nucleus neurons in rats

○Ohara H[1,2]，Sato F[1]，Kato T[1]，Yamashiro T[2]，Yoshida A[1]

[1]Dept Oral Anat and Neurobiol, Grad Sch Dent, Osaka Univ
[2]Dept Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Grad Sch Dent, Osaka Univ

Trigeminal mesencephalic nucleus（Vmes）neurons are primary afferents conveying deep sensations from masticatory muscles and periodontal ligaments, and are crucial for controlling movements of jaw, tongue, pharynx and larynx. Their cell bodies in brain receive descending commands from several cortical and subcortical structures which are involved in limbic systems. However, it remains still unclear how lateral habenula（LHb）, a center of negative emotions（pain, stress, and anxiety）, can influence the control of oromaxillary and pharyngolaryngeal movements. Therefore, we examined whether LHb sends direct projections to Vmes in rats. After injections of retrograde tracer FG in Vmes, neurons were labeled bilaterally in lateral division of LHb（LHbl）, whereas a very few neurons in medial division of LHb（LHbm）. After injections of anterograde tracer BDA in LHbl, axon fibers and terminals were distributed in Vmes, where some axonal boutons contacted the cell body of Vmes neurons bilaterally. After BDA injections confined in LHbm, no labeled axons were seen bilaterally in Vmes. This study for the first time showed the existence of direct projections from LHbl to Vmes neurons, suggesting the possibility that the movements of jaw, tongue, pharynx and larynx are modulated by negative emotions that are signaled by LHbl neurons.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G10　摂食行動と内臓感覚とを結びつける新たな神経回路

○岩井　治樹，倉本恵梨子，山中　淳之，後藤　哲哉

鹿児島大　院医歯　機能形態

摂食行動は，動物が生存する上で必須の機能であるが，口腔およびそれに続く消化管に関わる感覚が摂食行動の際どのような役割を果たすのか，その神経回路学的基盤は定まっていない．本研究では，ラット脳の内臓感覚に関わる結合腕傍核と顎運動，摂食，飲水，あるいは脂肪摂取に関わる線条体腹側部に着目し，これらの神経核がどのような神経回路を構成しているのか，順行性トレーサー（BDA）および逆行性トレーサー（CTb）を用いて調べた．最初に，結合腕傍核からの投射を調べるために，内側結合腕傍核あるいは内側結合腕傍核外側部に順行性トレーサーを注入した．その結果，軸索終末は，視床の卵形正中核，内側中心核，束傍核，後内側腹側核小細胞部，および後結合野で観察された．続いて，これらの視床核群からの投射を調べるために，同領域にそれぞれ順行性トレーサーを注入した．その結果，卵形正中核は，線条体腹中央部に，束傍核腹外側部は，線条体腹外側部に，内側中心核，束傍核腹内側部，および後結合野は，線条体腹内側部に投射し，一方で，後内側腹側核は，前交連後脚間質核に投射した．最後に，結合腕傍核・視床ニューロンと視床・線条体ニューロンが神経連絡を構成しているかどうか調べるために，順行性トレーサーを内側結合腕傍核あるいは内側結合腕傍核外側部に，および逆行性トレーサーを線条体腹側部に注入する二重標識実験を行った．その結果，内側結合腕傍核あるいは内側結合腕傍核外側部からの軸索終末と線条体腹側部へ投射する神経細胞は，視床の卵形正中核，内側中心核，束傍核，後内側腹側核小細胞部，および後結合野において近接を構成していた．これらの結果から，結合腕傍核-視床-線条体路が存在し，ここから，結合腕傍核に含まれる内臓感覚情報が，視床核群を経由し，線条体腹側部の摂食行動機能に影響することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Neural circuits connecting visceral sense and feeding behavior

○Iwai H，Kuramoto E，Yamanaka A，Goto T

Dept Oral Anat and Cell Biol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Feeding behavior is essential function in animal life, however, it is unknown how visceral sense involve feeding behavior. This study focused on the medial parabrachial nucleus（MPB）and external part of the MPB（MPBE）relating visceral sense and ventral caudate putamen（CPu）relating food, water, and fat intakes. We also investigated whether the MPB or MPBE connected with the ventral CPu through the thalamic nuclei, using anterograde（BDA）and retrograde（CTb）tracers. As a result, firstly the MPB or MPBE projected to the oval paracentral thalamic nucleus（OPC）, central medial thalamic nucleus（CM）, parafascicular thalamic nucleus（PF）, parvicellular part of the posteromedial ventral thalamic nucleus（VPMpc）, and retroreuniens area（RRe）, and secondly the OPC projected to the ventrocentral CPu, ventrolateral PF projected to the ventrolateral CPu, and CM, ventromedial PF, and RRe projected to the ventromedial CPu. On the other hand, the VPMpc projected to the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure. These results suggest that visceral information from the MPB and MPBE would affect feeding behavior occurring in the ventral CPu.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O1-G11　下行性痛覚抑制系における視床-皮質投射の機能を形態学的に解析する

○倉本恵梨子，岩井　治樹，山中　淳之，後藤　哲哉

鹿児島大　院医歯　機能形態

“痛み”の感じ方は精神状態により大きく変化することが知られ，例えば試合中のスポーツ選手は少々の傷では痛みを感じない．これは「下行性の痛覚抑制系」の働きによるもので，大脳皮質からの下行性制御により末梢からの痛覚入力が抑制される．この痛覚抑制系の異常が神経性の慢性疼痛の原因の一つと考えられており，治療法開発のためにも，このシステムの作動原理の解明が必要不可欠である．大脳皮質の眼窩野腹外側部（ventro lateral orbital area: VLO）を活性化すると痛み反射の閾値があがることなどから，VLO が下行性痛覚抑制系の最上位中枢であると考えられる．しかし生理的条件下で，どのような興奮性入力を受けて VLO が賦活するのか不明である．ラット VLO に逆行性トレーサーを注入すると視床 submedial nucleus（Sm）および mediodorsal nucleus（MD）に多くの標識されたニューロンが観察されたため，本研究では Sm と MD から VLO への視床-皮質投射について形態学的解析を行った．順行性トレーサーの遺伝子改変シンドビスウイルスを単一の Sm または MD ニューロンに感染させた．感染した細胞は膜移行性シグナル付きの蛍光タンパクを発現するため，蛍光タンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学染色により，樹状突起から軸索末端までニューロンを完全に可視化し，形態解析を行った．MD と Sm のニューロンはどちらも大脳皮質において，主に第 2-5 層に軸索投射をしていた．しかし軸索投射領域に違いが見られ，すべての Sm ニューロンが VLO に限局して軸索を分布させたのに対し，MD ニューロンは VLO だけでなく，帯状回や島皮質，前辺縁皮質など複数の領野に同時に軸索投射し，VLO に投射しないものもあった．Sm は痛覚抑制に特化した視床核であり，MD は前頭葉の活動を協調させる機能をもつことが示唆された．本研究は京都大学大学院医学研究科 高次脳形態学教室の金子武嗣 教授，古田貴寛 准教授，日置寛之 助教との共同研究である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The roles of the thalamus and cerebral cortex in descending pain modulation

○Kuramoto E，Iwai H，Yamanaka A，Goto T

Dept Oral Anat Cell Biol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

The ventrolateral orbital（VLO）region of the frontal cortex is involved in pain modulation through activation of periaqueductal gray-brainstem descending pathway to inhibit the nociceptive inputs at the spinal/trigeminal level. To understand role of the VLO in the descending pain modulation, it is important to reveal the inputs that activate the VLO. When a retrograde tracer was injected into the rat VLO, numerous retrogradely labeled neurons were observed in the submedial thalamic nucleus（Sm）and mediodorsal nucleus（MD）. Thus, in the present study, we analyzed thalamocortical projections of single Sm and MD neurons by a neuron-labeling method with Sindbis viral vectors expressing fluorescent proteins. The labeled thalamic neurons were completely visualized by immunoperoxidase staining for fluorescent proteins, and reconstructed. In the cerebral cortex, both axon fibers of Sm and MD neurons were mainly distributed in the middle layers. Interestingly, Sm neurons projected their axon fibers restrictively to the VLO, whereas MD neurons sent their axons not only to the VLO and also to the cingulate, agranular insular and prelimbic areas simultaneously, or often did not projected to the VLO. These results suggest that the Sm is specifically related to pain modulation, while the MD coordinates activation of frontal cortical areas.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C1 $\beta_2$アドレナリン受容体刺激による骨格筋肥大に対する cAMP 活性化因子 Epac の役割

○大貫　芳樹[1]，梅木　大輔[2]，伊藤　愛子[2]，奥村　　敏[1]

[1]鶴見大　歯　口腔生理
[2]鶴見大　歯　歯科矯正

【目的】$\beta_2$-adrenoceptor（$\beta_2$-AR）への慢性刺激が骨格筋の肥大を誘発することは報告されているが，筋線維タイプによる感受性の違いやその作用機序には不明な点が多い．一方，$\beta$-AR シグナル伝達経路のセカンドメッセンジャーである cyclic AMP（cAMP）により活性化される因子として，Protein kinase A 以外に Epac（exchange protein directly activated by cAMP）が近年報告された．本研究では，Epac1 遺伝子欠損マウス（Epac1KO）を用い，クレンブテロール（CB，$\beta_2$-AR 作動薬）投与による各種骨格筋（咬筋，前脛骨筋，ヒラメ筋）の肥大に対する Epac1 の役割を明らかにすることを目的とした．【方法】Wild type（WT）および Epac1KO（KO）マウスを，それぞれ対照群と CB 投与群（2 mg/kg/day, I.P.）に分け，計 4 群とした．3 週間飼育後，咬筋，前脛骨筋，ヒラメ筋を摘出し，筋重量および筋線維断面積（CSA）を解析した．また，Akt や calmodulin kinase II（CaMKII）などの筋肥大誘発シグナル因子のリン酸化レベルをウエスタンブロット法にて定量的に解析した．【結果】CB 投与により，WT では咬筋，前脛骨筋の重量および CSA が有意に増加したのに対し，KO では有意な増加は観察されなかった．同様に，WT の咬筋，前脛骨筋では，CB 投与により，Akt とその下流のシグナル因子 p70 S6 kinase 1，および CaMKII とその標的因子 histone deacetylase 4（HDAC4）のリン酸化レベルが有意に増加したのに対し，KO では有意な増加は観察されなかった．一方，ヒラメ筋は WT と KO 共に，CB 投与による影響を受けなかった．【結論】CB 投与による $\beta_2$-AR への慢性刺激は，速筋線維（タイプ II）優位な筋（咬筋，前脛骨筋）では Epac1 を介して Akt および CaMKII シグナル伝達経路を活性化し，筋肥大を誘発するのに対し，遅筋線維（タイプ I）優位な筋（ヒラメ筋）ではこれらのシグナル伝達経路の活性化および筋肥大を誘発しない．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The role of cAMP sensor Epac1 in skeletal muscle hypertrophy induced by beta2-adrenoceptor stimulation

○Ohnuki Y[1]，Umeki D[2]，Ito A[2]，Okumura S[1]

[1]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med
[2]Dept Orthod, Tsurumi Univ Sch Dent Med

To further elucidate the role of Epac（exchange protein directory activated by cAMP）in the signaling mechanisms responsible for the beta2-adrenoceptor（beta2-AR）-mediated phenotypic changes of skeletal muscle, we examined the effects of chronic stimulation of beta2-AR with clenbuterol（CB）(i.p., 2 mg/kg/day for 3 weeks), a beta2-AR agonist, on muscle mass and myofiber cross-sectional area（CSA）in masseter, tibialis anterior and soleus muscles of wild-type（WT）and Epac1-null（Epac1KO）mice. In masseter and tibialis anterior muscles, muscle mass and myofiber CSA were significantly increased by the CB treatment in WT while not in Epac1KO. The inhibition of the CB-induced hypertrophy by Epac1 disruption was associated with the suppression of CB-induced phosphorylation of Akt and its downstream molecules, S6K1, as well as CaMKII and its target, HDAC4, a negative regulator of MEF2. On the other hand, soleus muscle was not affected by the CB treatment in both WT and KO mice. These results suggest that Epac1 plays important roles in the beta2-AR-mediated hypertrophy potentially through subsequent activation of both Akt and CaMKII signaling pathways in masseter and tibialis anterior muscles predominantly composed of fast-type（type II）fibers rather than in soleus muscle predominantly composed of slow-type（type I）fibers.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C2 腫瘍及び非腫瘍細胞由来アルカリ性ホスファターゼ活性の阻害物質に対する反応性の比較

○川村　良[1,3]，出山　義昭[2,4]，吉村　善隆[2]，鈴木　邦明[2]，山崎　裕[1]

[1]北大　院歯　高齢者
[2]北大　院歯　細胞分子薬理
[3]松崎歯科医院
[4]ポプラアベニュー歯科クリニック

【目的】iPS 細胞や腫瘍細胞に関する研究から ALP が細胞の分化に関与することが示唆された．そこで，腫瘍細胞と非腫瘍細胞の ALP の比較を目的に活性を阻害する物質に対する反応性の違いを検討した．【材料及び方法】市販のヒトの骨，小腸，胎盤及び肝臓由来の ALP，及びヒト腫瘍細胞である Saos-2, HeLa, P19 と P19 をレチノイン酸（RA）で処理して神経系細胞に分化させた RA-P19 の ALP を使用し ALP 活性を測定した．また，ALP 活性阻害物質として tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate 及び vanadate に対する反応性を調べた．【結果と考察】ヒト臓器由来の ALP 活性の各阻害物質に対する反応性はアイソザイムの型によって異なったが，ヒト腫瘍細胞由来の ALP 活性の反応性には大きな相違はなく，未分化な腫瘍細胞の ALP は，臓器の由来にかかわらず類似した性質を示す可能性が示唆された．P19 と RA-P19 の ALP は etidronate 以外の阻害物質には類似した反応性を示したが，etidronate に対しては異なった．EDTA でも同様の結果が得られたため，etidronate はキレート作用により ALP 活性を阻害すると結論した．ALP 活性に必要な Zn は，低濃度では ALP 活性を促進したが高濃度では逆に阻害し，P19 における 2 種の親和性の異なる Zn 結合部位の存在が示唆された．さらに Zn の低親和性部位の RA 処理による変化が，P19 と RA-P19 の ALP 活性の etidronate に対する反応性の相違を引き起こすことを示唆する結果を得た．【結論】腫瘍細胞の ALP は臓器特異的な阻害物質に対する反応性を喪失する可能性と活性発現に必須の Zn 結合部位の変化も阻害物質に対する反応性に影響を及ぼす可能性を示した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Comparison for the sensitivity to inhibitors of alkaline phosphatase activity derived from tumor and non-tumor cells

○Kawamura R[1,3]，Deyama Y[2,4]，Yoshimura Y[2]，Suzuki K[2]，Yamazaki Y[1]

[1]Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[2]Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[3]Matsuzaki Dental Clinic
[4]Poplar Avenue Dent Clinic

[Objectives] As alkaline phosphatase（ALP）may relate to the differentiation of cells, we compared the sensitivity to inhibitors of ALP activity derived from tumor and non-tumor cells. [Materials and methods] We measured the activity of commercial ALP derived from non-tumor human bone, small intestine, placenta and liver, and of ALPs from human tumor cells, Saos-2, HeLa, P19 and RA-P19 which was differentiated into neurologic cells treated with retinoic acid（RA）. We examined sensitivity of ALP activity to tetramisole, levamisole, L-homoarginine, etidronate and vanadate. [Results and discussion] The sensitivity to inhibitors of ALPs derived from human organs varied depending on isozyme type, but the sensitivity from tumor cells were similar, suggesting that ALP of undifferentiated tumor cells lost the organ specific characters. Sensitivities of P19 and RA-P19 were almost same except for etidronate. Concentration-dependency of Zn on ALP activity suggested the presence of low and high affinity Zn binding sites in P19 ALP and we obtained results to suggest that the change of sensitivity to etidronate is caused by the effect of RA treatment on low affinity Zn site. [Conclusion] ALP of tumor cells seemed to lose organ-specific sensitivity to inhibitors and RA treatment changed the sensitivity of P19 ALP to etidronate.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C3　3-Deazaneplanocin A は口腔がん細胞の遺伝子発現パターンを変化させる

○八田　光世[1]，永沼　香織[2]，有田　晴一[1,3]，石井　太郎[1,4]，大久保つや子[1]，山﨑　　純[1]

[1]福歯大　細胞分子生物
[2]福歯大　口腔顎顔面外
[3]福歯大　口腔治療
[4]福歯大　成長発達歯

【目的】がん細胞におけるエピゲノム異常は，遺伝子発現パターンの変化を介して細胞の形態変化や運動性・浸潤能の獲得に関与すると考えられている．これまでに，私達は低分化型口腔がん細胞に 3-deazaneplanocin A（DZNep）を処理することでエピゲノム異常による keratin 13 遺伝子サイレンシングが解除されることを報告してきた．本研究では，低分化型口腔がん細胞の悪性形質に対する DZNep の効果を明らかにするため，上皮―間葉転換（EMT）に関与する遺伝子発現について検討した．【方法】低分化型口腔がん細胞（SAS）に DZNep（10 μM）を 48 時間処理した．タンパク発現およびヒストン修飾はウエスタンブロットをおこない，さらに Image J1.47v にて定量した．また qRT-PCR 解析にて mRNA 発現を定量した．【結果と考察】 DZNep 処理によりヒストン H3K27 メチル化酵素 EZH2 のタンパクレベル，グローバルなヒストン H3K27 トリメチル化および H2AK119 モノユビキチン化状態が低下した．さらに，フォークヘッド転写因子 FOXO1 の mRNA 発現レベルは変化しないが，タンパクレベルが低下することを新たに見出した．ケラチノサイトにおける FOXO1 標的遺伝子であり EMT 誘導因子として知られる TGFβ1 の mRNA 発現レベルも低下しており，EMT に関連する遺伝子群についても上皮マーカー（E-cadherin，involucrin）の上昇および間葉系マーカー　（α-smooth muscle actin，twist2）の低下が認められた．これらの結果から DZNep が核内因子を阻害して遺伝子発現パターンを変化させることが明らかになり，低分化型口腔がん細胞の分化転換に影響を与える可能性が示された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of 3-deazaneplanocin A on gene expression in oral squamous cell carcinoma cells

○Hatta M[1]，Naganuma K[2]，Arita S[1,3]，Ishii T[1,4]，Ohkubo T[1]，Yamazaki J[1]

[1]Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll
[2]Dept Oral Maxillac Surg, Fukuoka Dent Coll
[3]Dept Odontol, Fukuoka Dent Coll
[4]Dept Oral Growth Develop, Fukuoka Dent Coll

Epigenetic alterations play important roles in the regulation of gene expression determining cellular phenotype in cancer cells. Although 3-deazaneplanocin A（DZNep）has been known to reactivate tumor suppressor genes in several cancer cells, it remains unclear whether DZNep attenuates the malignant phenotypes of oral squamous cell carcinoma（OSCC）cells. In this study, we investigated the effect of DZNep on the expression of genes related to epithelial-mesenchymal transition（EMT）in OSCC cells. The poorly differentiated OSCC cells（SAS）were treated with 10 μM DZNep for 48 hours. Western blot analysis revealed that DZNep decreased the global levels of trimethylation of histone H3-K27 and monoubiquitination of histone H2A-K119, which were mediated by polycomb repressive complexes. Furthermore, we found that DZNep depleted the FOXO1 protein, while FOXO1 mRNA levels remained unchanged. The mRNA levels of TGFβ1, a potent EMT inducer transcriptionally regulated by FOXO1, were also reduced in response to DZNep. Finally, quantitative RT-PCR analysis revealed that the epithelial cell maker genes, E-cadherin and involucrin, were upregulated, whereas the mesenchymal cell marker genes, α-smooth muscle actin and twist2, were downregulated in the SAS cells treated with DZNep. These results suggest that DZNep affects epithelial plasticity through gene expression changes in OSCC cells.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C4 ハイドロキシアパタイトはマウス顎骨へのチタンインプラント即時埋入後の接触性骨形成に影響を及ぼす

○渡辺　泰典，斎藤浩太郎，大島　勇人

新潟大　院医歯　硬組織形態

【目的】インプラント埋入後のオッセオインテグレーション獲得過程には，既存骨から骨形成が開始する Distance osteogenesis（遠隔性骨形成）とインプラント表面から直接骨形成が開始する Contact osteogenesis（接触性骨形成）の 2 つのタイプの骨形成が起こることが報告されている．本研究では，インプラント埋入後のオッセオインテグレーションへのハイドロキシアパタイト（HA）の効果について，細胞レベルで解明することを目的とする．そこで本研究は 4 週齢 ICR マウス上顎骨にインプラント即時埋入後に骨-インプラント界面のオッセオインテグレーションにおける HA の効果を解析することを目的とする．【方法】4 週齢 ICR マウスの上顎右側第一臼歯を抜去し，ドリルによって埋入窩を形成し，HA ブラスティングおよび機械研磨チタンインプラントを埋入した（各々 HA 群と Sm 群）．インプラント埋入 1，5，14，28 日後に動物を固定・脱灰した後にパラフィン切片を作製し，HE・アザン染色，オステオポンチン（OPN）および Ki67 免疫染色，TUNEL 評価，TRAP 酵素組織化学，非脱灰標本には電子線マイクロアナライザ（EPMA）による定量解析を行った．【結果と考察】両群とも術後 28 日までにオッセオインテグレーションが完了したが，術後 5 日では HA 群で接触性骨形成が開始しており，同部位には OPN 陽性反応が見られたが，両群共に遠隔性骨形成によるオッセオインテグレーションは完了していなかった．術後 14 日では，組織学的に接触性骨形成と遠隔性骨形成を区別することが困難であったが，Sm 群に比較して HA 群で有意に骨・インプラント界面 OPN 陽性率が高かった．したがって，インプラント表面の HA が骨・インプラント界面における OPN 陽性反応に影響を及ぼし，結果として接触性骨形成を促進することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Hydroxyapatite affects contact osteogenesis after immediately placed titanium implantation in mice

○Watanabe T，Saito K，Ohshima H

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

Objective: This study aimed to analyze the effects of hydroxyapatite（HA）on osseointegration at the bone-implant interface after immediately placed implantation. Methods: Right maxillary first molars of 4-week old ICR mice were extracted and cavities were prepared with a drill and placed with titanium implants with/without HA blasting（HA and Sm groups, respectively）. Following the fixation of animals at 1-28 days after implantation, the decalcified samples were embedded in paraffin and the prepared sections were processed for immunohistochemistry using anti-OPN and Ki67 antibodies, TUNEL assay, and TRAP histochemistry. The elements and bone volume of undecalcified samples were quantitatively analyzed by Electron Probe Micro Analyser（EPMA）. Results and Conclusions: Bone formation occurred on the old bone surface（distance osteogenesis）or on the implant surface（contact osteogenesis）, resulting in the completion of osseointegration until 28 days after operation in the both groups. In the HA group, contact osteogenesis occurred on Day 5 and the OPN immunoreactivity at the bone-implant interface significantly increased in rate compared with the Sm group on Day 14. These results suggest that the HA on the implant surface affects the OPN immunoreactivity on the bone-implant interface, resulting in the increase of contact osteogenesis following immediately placed titanium implantation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C5 アネキシン A5 欠損マウスは歯の咬耗と腱付着部における顎骨の肥大を呈する

○島田　明美[1]，小松浩一郎[1]，新井　嘉則[2]，大貫　芳樹[3]，中島　和久[1]，山下　照仁[4]，奥村　敏[3]，二藤　彰[1]

[1]鶴見大　歯　薬理
[2]日本大　歯
[3]鶴見大　歯　口腔生理
[4]松本歯大　硬組織機能解析

成体において，歯と顎骨の正常な形態は咀嚼系の調節により維持されると考えられているが，その調節の分子メカニズムについては不明な点が多い．アネキシン A5（Anxa5）は，細胞膜裏打ちタンパク質として多彩な機能が報告されており，細胞膜修復の調節，アポトーシスにおけるシグナル伝達に加えて，骨芽細胞におけるメカニカルセンサーとしての役割などが推定されているが，骨の発生に関しては，Anxa5 をノックアウトしても野生型マウスとの顕著な差は認められないことが報告されている（Brachvogel et al, 2003）．今回我々は，Anxa5 が成体マウスの歯と顎骨の形態の制御に関与することを見出した．解析には Anxa5 遺伝子コード領域に lacZ を挿入したノックインマウス（Anxa5$^{-/-}$）を用いた．Anxa5$^{-/-}$マウスでは，lacZ が関節軟骨，骨膜，および腱・靭帯と骨の付着部に強く発現していた．生後 4 週では Anxa5$^{-/-}$マウスと野生型マウスの歯や骨の形態に著明な差は認められなかった．しかし，生後 16 週では，マイクロ CT 解析により Anxa5$^{-/-}$マウスにおける臼歯咬耗の増大，腱・靭帯付着部における顎骨の肥大，ならびに上顎口蓋突起の肥大を認めた．また組織学的解析によって，腱・靭帯付着部における骨量と骨基質の増大，咬筋における筋線維の肥大を認めた．これらの結果は，Anxa5 が咀嚼系の制御を介して歯と骨の形態を維持する可能性を示唆する．【会員外共同研究者：Ernst Pöschl】

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Annexin A5 null mice show hyper tooth attrition and excess bony outgrowth of the jaws

○Shimada A[1], Komatsu K[1], Arai Y[2], Ohnuki Y[3], Nakashima K[1], Yamashita T[4], Okumura S[3], Nifuji A[1]

[1]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Nihon Univ Sch Dent
[3]Dept Physiol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[4]Div Hard Tissue Res, Inst for Oral Sci Matsumoto Dent Univ

Molecular mechanisms that underlie maintenance of normal tooth and bone shapes in adults are poorly understood. We show here that Annexin A5（Anxa5）may regulate those shapes in mice. We used Anxa5-null mouse in which lacZ was inserted into the coding region of Anxa5 gene. In Anxa5$^{-/-}$ mice, lacZ was strongly expressed at articular cartilage, periosteum, and tendon/ligament insertion sites to bone. There were no obvious differences in tooth and bone morphology between wild and Anxa5$^{-/-}$ mice at 4 weeks of age. After 16 weeks of age, however, we found hyper attrition of molar teeth and bony outgrowth at the attachment sites of jaw muscles in the mandible. Excess bony outgrowth was also observed at palatine process of the maxilla in Anxa5$^{-/-}$ mice. Histological analyses revealed that bone volume and bone matrix deposition at the insertion sites were increased. Interestingly, masseter muscle show increase in muscle fiber diameter. In addition, we observed enlargement of the periodontal ligament space. These findings show that Anxa5 deficiency leads to hyper tooth attrition, excess bony outgrowth of the jaw and jaw muscle hypertrophy, suggesting that Anxa5 is required for maintenance of tooth and bone shapes through proper mastication system.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-C6 Semaphorin 3A は cdk6 タンパク質発現の低下と STAT3 の tyrosine 705 リン酸化阻害を伴い骨細胞の細胞突起を伸長させる

○新村　昌弘[1,2]，佐藤　　毅[1]，林　　直樹[1]，大久保正彦[1]，榎木祐一郎[1]，古株彰一郎[3]，
依田　哲也[1]

[1]埼玉医大　医　口腔外科
[2]新村歯科医院
[3]九歯大　分子情報生化

顎顔面領域の骨再生医療において，骨芽細胞あるいは破骨細胞を制御するさまざまなサイトカインを応用する試みがなされているが，いまだ臨床応用には至っていない．骨組織を構成する細胞において 9 割を占める骨細胞は，その細胞突起を介して骨芽細胞や破骨細胞とネットワークを形成して互いの生理機能を調節しており，骨が再生する過程において骨細胞突起の伸長が重要であると考えられている．semaphorin 3A（Sema3A）は骨形成を促進させ骨吸収を抑制するサイトカインで，われわれは感覚神経由来の Sema3A が骨再生に重要であることを示した（Nature 2013）．今回，Sema3A の骨細胞の細胞突起に対する作用を検討する目的で研究を行った．細胞は骨細胞様細胞株 MLO-Y4，試薬は recombinant mouse Sema3A（rmSema3A）を用いた．phalloidin 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い Cellomics Array ScanVTI による細胞突起伸長計測解析を行った．12 時間の無血清培地による培養後に rmSema3A を添加し，1,3,6 時間でサンプリングを行い，real time RT-PCR による mRNA 発現解析，western blot 法によるタンパク質発現解析を行った．MLO-Y4 に rmSema3A 処理をしたところ，コントロールと比較して有意に細胞突起が伸長された．細胞突起伸長マーカーである E11 の mRNA 発現は上昇しなかったが，タンパク質発現は上昇していた．Sema3A は骨細胞の成熟に重要なサイトカインと考えられ，顎顔面領域における骨再生医療への応用が期待できる薬剤となる可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Semaphorin 3A promotes dendrite elongation in association with downregulation of cdk6 and inhibition of tyrosine 705 phosphorylation of STAT3 in osteocytes

○Niimura M[1,2]，Sato T[1]，Hayashi N[1]，Okubo M[1]，Enoki Y[1]，Kokabu S[3]，Yoda T[1]

[1]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Saitama Med Univ
[2]Niimura Dent Clinic
[3]Div Mol Signaling and Biochem, Dept Health Improvement, Kyushu Dent Univ

Although various cytokines which regulate the function of osteoblasts or osteoclasts have been found, the attempt of clinical application using those cytokines for bone tissue engineering in maxillofacial region has failed. Osteocytes communicate with bone cells to regulate their function each other via dendrites of osteocytes, suggesting that dendrite elongation plays a vital role for bone regeneration. We have reported that semaphorin 3A（Sema3A）derived from sensory neuron, which promotes bone formation and inhibits bone resorption, plays an essential role for bone regeneration（Nature 2013）. In this study, we examined the effect of Sema3A on dendritic processes of osteocytes. We used osteocyte-like cell line MLO-Y4 and analyzed total dendrite length quantitatively. Total dendrite length was significantly increased in MLO-Y4 stimulated with Sema3A compared to control. The protein level of E11, a dendrite marker of osteocytes, was upregulated in a time-dependent manner. On the other hand, cdk6 was downregulated in a time-dependent manner. Moreover, Sema3A reduced phosphorylation at tyrosine 705 of STAT 3 in MLO-Y4. Taken together, these results suggest that Sema3A regulates dendrites in osteocytes in association with downregulation of cdk6 and inhibition of STAT 3 phosphorylation. Sema3A may be a promising drug to apply for bone tissue engineering.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D1 骨／インプラント界面の静的圧縮応力に対する骨の反応 ―静的圧縮の限界応力に関する研究―

○井汲　憲治，須澤　徹夫，吉村健太郎，上條竜太郎

昭和大　歯　口腔生化

【目的】オッセオインテグレーションの喪失を避けるためには，応力の安全余裕を認識する必要がある．本実験は定量的な静的圧縮応力を発生させる装置を用いて，オッセオインテグレーション状態にある骨/インプラント界面の静的圧縮に対する限界応力(critical stress)を検索することを目的とした．【材料と方法】骨支持部，荷重発生部と荷重伝達部からなる小型装置開発した．2 匹のビーグル犬の左右の脛骨に骨支持部を埋入して，2ヵ月後に荷重伝達部を骨支持部の中に設置した．その 2ヵ月後に，荷重発生部のネジを締めることにより，オッセオインテグレーション状態にある荷重伝達装置の先端の骨/インプラント界面に静的圧縮応力（0-180 MPa）を発生させた．7 日後に骨ブロックを摘出し，組織形態計測を行った．【結果】骨/インプラント界面部においては，骨吸収やオッセオインテグレーションの喪失は認められなかった．また，骨/インプラント界面付近のオステオンの形態は静的圧縮応力の量によって影響されなかった．一方，骨/インプラント界面と反対の皮質骨の外側において骨膜反応が認められた．【結論】オッセオインテグレーションの状態にある骨/インプラント界面付近の骨は，120 MPa を超える静的圧縮応力に対して，ほとんど反応を示さないことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Bone response to static compressive stress at bone-implant interface: A study of critical static compressive stress

○Ikumi N，Suzawa T，Yoshimura K，Kamijo R

Dept Oral Biochemistry, Showa Univ

Purpose: To avoid osseointegration failure, it is requied to identify an appropriate safety stress margin. A novel device was developed to generate a quantitative amount of static compressive stress with the aim to clarify critical stress of osseointegrated bone-implant interface. Materials and Methods: Small parts for bone sustaining, load generation, and load transmittance were developed and implanted inside the tibial cortical bone in adult beagle dogs. Each tibia in 2 dogs received bone sustaining parts, then after 2 months the load transmitting parts were placed into the bone sustaining parts. After another 2 months, various magnitudes of static compressive stress（0-180 MPa）were generated by tightening the load generating part to the osseointegrated bone-implant interface. After 7 days, dissected blocks were prepared for histomorphometric analyses. Results: There were no obvious signs of bone resorption or loss of osseointegration in any of the groups. The change in shape of osteon was not influenced by the amount of static compressive stress. However, periosteal reactions were observed under the periosteum of the cortical bone on the opposite side. Conclusion: These results indicate that osseointegrated bone-implant interfaces show minimal response to static compressive stress, even when such stress is greater than 120 MPa.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D2 ビーグル犬インプラント周囲顎骨における生体アパタイト結晶配向性

○小高　研人，松永　　智，廣内　英智，笠原　正彰，阿部　伸一
東歯大　院歯　解剖

【目的】骨を構成する無機成分である生体アパタイト(BAp)の結晶構造は，異方性のきわめて強い六方晶をベースとしている．近年このBAp結晶のc軸配向性と骨の力学機能との関連がみいだされたことから，骨質解析の重要性に注目が集まっている．デンタルインプラントからその周囲の顎骨に加わる荷重の影響に関しては未だ不明な点が多く残されているが，骨質解析を行うことで，インプラントから周囲顎骨に加わる荷重による影響の一端を解明することができる．そこで今回我々は，インプラントを有するビーグル犬顎骨と有歯顎骨および無歯顎骨におけるBAp結晶配向性の測定を行い，その結果を比較することで，インプラント周囲顎骨におけるBAp結晶配向性を定量評価することを目的とした．
【方法】ビーグル犬の上顎骨第四前臼歯部の有歯顎骨および無歯顎骨，インプラント埋入後6ヶ月および15ヶ月の顎骨を試料とし，BAp結晶配向性の測定を行った．測定点として，鼻腔底および眼窩下管底部，口蓋側および頬側の皮質骨の4点を設定した．BAp結晶配向性の測定は，微小領域エックス線回折装置を使用し，反射型および透過型エックス線回折によって得られた(002)と(310)のエックス線回折ピークを用いて，近遠心方向，咬合方向，頬舌方向のそれぞれに対して配向性を定量的に評価した．
【結果と考察】咬合を有する顎骨の頬側皮質骨は，咀嚼荷重方向への圧縮応力に対し高い構造特性をもっていることが示唆された．一方，インプラントから比較的遠隔にある眼窩下管底部および鼻腔底部においても，負担過重が生じ圧縮応力に対して高い抵抗性を発揮する可能性が示唆された．無歯顎骨においてはいずれの方向にも優先配向性を示さないこと，またインプラント埋入後15ヶ月のものと比較して埋入後6カ月のものは同じ傾向でより弱い配向性を示したことから，骨が荷重を受ける期間によってその構造特性に差を生じる可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Biological apatite crystallographic orientation of peri-implant bone in Beagle

○Odaka K，Matsunaga S，Hirouchi H，Kasahara M，Abe S
Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent

In recent years, it has become clear that the orientation of biological apatite（BAp）crystals, which reflects bone quality, is closely related to local stress. Few studies have been conducted on BAp crystal alignment in response to mechanical stress in the jaw bone around dental implant. The purpose of this study was to quantitatively evaluate BAp crystal orientation using microbeam X-ray diffractometry in the orientations in nasal, infraorbital, palatal, and buccal areas were compared.
The maxillary fourth premolar region in Beagle bone samples were designated as the region of interest and BAp crystal orientation in each area were measured. BAp crystal orientation was determined by both reflection- and transmission-based microbeam X-ray diffractometry. The diffraction intensity ratio was calculated using X-ray diffraction peaks of（002）and（310）.
The results showed that BAp crystals in dentulous and peri-implant bone had preferential orientation in the direction of masticatory force in the buccal area. However, some differences had seen between them in nasal and infraorbital area. Quantitative evaluation suggests that peri-implant bone may adapt crystallographically to the load caused by chewing.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D3　電解酸性機能水の生物学的機能

○浅野　正岳

日本大　歯　病理

電解酸性機能水（acid-electrolyzed functional water; FW，三浦電子社製）が，生体に対する為害性がなく，殺菌性に優れていることについては多くの報告がある．本研究では，FW の生物学的機能について検索することを目的として，ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞（OSCC）を用いた実験を行った．Cytokine array による実験の結果，FW 刺激は OSCC に対して，無刺激のものと比較して優位に interkeukin-1$\alpha$（IL-1$\alpha$）の産生を誘導することを見出した．文献的に IL-1$\alpha$ は皮膚線維芽細胞に PPAR$\beta/\delta$ および IL-1ra の発現を誘導することにより創傷治癒の促進効果があるとの報告があり，これに基づきヒト歯肉線維芽細胞に OSCC の培養上清および recombinant human IL-1$\alpha$（rhIL-1$\alpha$）を作用させた．すると，皮膚と同様に両分子の発現を誘導することが示された．このことから，FW は上皮細胞に対して IL-1$\alpha$ 産生を誘導することにより，創傷治癒を促進させる可能性があるという仮説を立て，マウス皮膚に人為的に創傷を作成し，これに FW を作用させた時の創傷面積の変化について経日的に観察を行った．その結果，FW 作用群では，生理食塩水処理群と比較して，創傷作製翌日に約 20％の創傷面積の縮小効果が認められた．そこで，この効果が IL-1$\alpha$ によるものであることを確認するために，IL-1$\alpha$ knockout mouse（IL-1$\alpha$KO）を用いて同様の実験を行ったところ，IL-1$\alpha$KO では FW による創傷治癒促進効果は観察できなかった．さらに，創傷局所での IL-1$\alpha$ 産生について皮膚組織から抽出した RNA を用いて real-time PCR により計測したところ，FW 処理群で優位に IL-1$\alpha$ mRNA の発現上昇が確認できた．以上の結果から，FW は上皮細胞に対して IL-1$\alpha$ 産生を誘導し，これにより創傷治癒を早める効果があることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The biological function of acid-electrolyzed functional water

○Asano M

Dept Pathol, Nihon Univ Sch Dent

To explore the biological function of acid-electrolyzed functional water（FW）, human oral squamous cell carcinoma-derived cell（OSCC）was treated with or without FW. After16 h of culture, the culture supernatants were harvested and subjected to cytokine array. The results indicated that FW induced the secretion of IL-1$\alpha$ by OSCC. IL-1$\alpha$ is reported to accelerate the wound healing process in the skin. Based on this report, the wound was artificially generated on the back skin of C57BL/6 mice. The wound was treated with FW or PBS and the wound area was measured. FW-treatment induced the wound healing process and resulted in 20％ reduction in wound area 1 day after treatment. To confirm the contribution of IL-1$\alpha$, the same experiments were performed with IL-1$\alpha$ knockout mice（IL-1$\alpha$KO）. Accelerated wound healing by FW treatment was abrogated in IL-1$\alpha$KO mice. To further confirm the induction of IL-1$\alpha$ in the skin tissue, total RNA was extracted from FW-treated or PBS-treated tissues and subjected to real-time PCR. The augmented expression of IL-1$\alpha$ was observed in FW-treated tissue. All these results indicated that FW induced IL-1$\alpha$ secretion by epithelial cells and thereby induced the wound healing process.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D4　慢性炎症に関連するNLRP3インフラマソームの活性化機構の解析

○村上　智彦，高畑　佳史，波多　賢二，西村　理行

大阪大　院歯　生化

歯周病や代謝性疾患などの患部組織において，マクロファージなどの炎症細胞の浸潤と慢性的な炎症が観察され，慢性化した炎症が組織変性と疾患重症化の重大な要因となることが指摘されている．特にここ数年，慢性炎症を伴う各種疾患発症に，インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体が関与することがわかってきた．インフラマソームはNOD-like receptor（NLR），adaptor protein（ASC），Caspase-1が複合体を構築することにより形成され，Caspase-1を活性化させるプラットフォームとして働く．活性化したCaspase-1は，炎症性サイトカインであるIL-1$\beta$, IL-18を産生すると共に，細胞死（pyroptosis）を誘導することが知られている．歯周病では，原因菌の一つである*Porphyromonas gingivalis*が疾患発症に関わるが，興味深いことに，*Porphyromonas gingivalis*の感染はNLRP3（NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3）インフラマソームを活性化させることが報告されている．しかしながら，NLRP3インフラマソームを活性化させるメカニズムは未だ不明である．今回，我々はNLRP3インフラマソームの活性化を誘導する細胞外ATP刺激が細胞内カルシウム濃度を上昇させる現象に着目し，カルシウムシグナルがNLRP3インフラマソームの活性化に重要であるかを検討した．その結果，各種カルシウムシグナル阻害剤がミトコンドリアダメージの抑制を伴ってNLRP3インフラマソームの活性化を特異的に阻害することを明らかにした．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The development of chronic inflammation in oral diseases

○Murakami T，Takahata Y，Hata K，Nishimura R

Dept Mol Cell Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Chronic inflammation is associated with various diseases such as periodontal disease and Rheumatoid arthritis. It has been reported that chronic inflammation is induced by the NLRP3（NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3）inflammasome, which is a platform for caspase-1 activation and controls the maturation and release of the pro-inflammatory cytokines IL-1b and IL-18. It is important for the clarification of chronic inflammation to address the activation mechanism of NLRP3 inflammasome. The activation of NLRP3 inflammasome is implicated in a variety of inflammatory processes including infection（*Porphyromonas gingivalis* etc）, autoinflammatory diseases and metabolic diseases. While mitochondrial damage is reported to be essential for activation of NLRP3 inflammasome, the proximal steps in NLRP3 inflammasome activation still remain unclear. Here we show that calcium signals are required for activation of NLRP3 inflammasome with mitochondrial damage. We demonstrate that blocking calcium signals inhibit assembly and activation of the NLRP3 inflammasome complex. Moreover, calcium signal inhibitors block mitochondrial damages such as mitochondrial ROS generation, depolarization and mitochondrial DNA release during ATP stimulation in LPS primed bone marrow macrophages. Our findings support a model for NLRP3 inflammasome activation by calcium-mediated signals.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D5 オメガ3脂肪酸は歯周病細菌が誘導するインフラマソーム活性を抑制する

○沖永　敏則，有吉　　渉，西原　達次

九歯大　感染分子

【背景・目的】脂肪酸は，細胞の生命活動に必須である一方，様々な疾患との関わりが報告されている．そのなかでも不飽和脂肪酸（ω-3系脂肪酸）であるドコサヘキサエン酸（DHA）には，抗炎症作用があることが報告されている．我々は，歯周病細菌侵入マクロファージにおいて，インフラマソームが活性化され，炎症性サイトカインの発現が誘導されることを報告してきた．そこで，今回，DHAの歯周病細菌誘導マクロファージに及ぼす影響について検証した．

【方法】通法に従い，歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4株を用い，ヒトマクロファージU937細胞に侵入実験を行った．オメガ3脂肪酸としてDHAを用いた．遺伝子発現解析はReal-Time RT-PCR解析，タンパク発現はウェスタンブロッティング解析およびELISAを行った．

【結果】U937細胞をDHAで刺激したところ，歯周病細菌が誘導する炎症性サイトカインIL-1βの遺伝子およびタンパク発現が著しく抑制された．PMA前処理により，U937細胞にてエンドサイトーシス関連因子クラスリンの発現が誘導される．興味深いことに，歯周病細菌侵入U937細胞において，DHA処理はクラスリンの発現を抑制した．さらに，エンドサイトーシス阻害剤により，歯周病細菌誘導のIL-1βの遺伝子およびタンパクの発現が抑制された．

【考察】以上の結果から，マクロファージにおいて，DHAは，クラスリン発現抑制を介して，歯周病細菌が誘導するIL-1β発現を抑制することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Omega-3 fatty acids downregulated inflammasome activity in periodontopathic bacteria invasion in macrophages

○Okinaga T，Ariyoshi W，Nishihara T

Div Infect Micro Biol, Kyushu Dent Univ

It is well known that the deficiency of fatty acids can lead to chronic disease. In particular, previous study reported that omega-3 fatty acid, such as docosahexaenoic acid（DHA）, can suppress inflammatory activation and play a beneficial role in a variety of inflammatory human disease. Periodontitis is known to be an infectious disease caused by bacterial infection, followed by inflammation. In the present study, we clarified the role of omega-3 fatty acids in periodontopathic bacteria-invaded macrophages. Periodontopathic bacterium, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 was used in this study. Human macrophage U937 cells were invaded with *A. actinomycetemcomitans*. The expression of IL-1beta protein was detected by Western blotting and ELISA. The gene expression was confirmed by Real-Time RT-PCR. The expression of IL-1beta induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion was downregulated in DHA-treated U937 cells. In addition, the expression of Clathrin, which is mediator of endocytosis, was found in macrophages. Interestingly, DHA prevented the expression of Clathrin in *A. actinomycetemcomitans*-invaded U937 cells. Furthermore, pitstop, endocytosis inhibitor, prevented the production of IL-1beta induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion. These results indicate omega-3 fatty acid downregulated the inflammasome activity induced by *A. actinomycetemcomitans*, suggesting the combination of the suppression of Clathrin-mediated endocytosis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-D6 Smad3 活性化を介した窒素含有 bisphosphonate による caspase-1 放出の増加

○玉井利代子，小林美智代，清浦　有祐

奥羽大　歯　口腔病態解析制御

【目的】前回，我々は，窒素含有 bisphosphonates の一種であるアレンドロネート（ALN）前処理による，TLR4 リガンドが引き起こす IL-1$\beta$ 産生の増加は，転写因子 Smad3 の活性化が関与することを報告した．本研究では，ALN 前処理による caspase-1 放出増加における Smad3 の関与について検討した．

【方法】TLR4 リガンドである lipid A はペプチド研究所から購入した．マウスマクロファージ様細胞 J774.1 は，10％ウシ血清添加 RPMI1640 培地を用いて，5％ $CO_2$, 37℃で 5 回から 8 回継代培養後，96 穴平底マイクロプレートに 1 穴あたり $2\times10^5$個播種した．16 時間後，無血清 RPMI1640 培地で 1 回細胞を洗浄し，同細胞を ALN（100 $\mu$M）含有または不含の培地で 24 時間培養，2 回細胞を洗浄，lipid A（100 ng/ml）含有または不含培地で 24 時間インキュベートした．そして，上清中の caspase-1 を ELISA 法で定量した．抑制実験では，ALN 添加 1 時間前に Smad3 抑制剤である SIS3 を終濃度 3 $\mu$M または 10 $\mu$M で J774.1 細胞に加えた．

【結果と考察】SIS3 は，ALN による J774.1 細胞の caspase-1 放出増加を濃度依存的に抑制した．以上の結果は，Smad3 活性化が caspase-1 を介して，ALN 前処理による IL-1$\beta$ 産生増加に関与することを示唆する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The nitrogen-containing bisphosphonate up-regulated the release of caspase-1 via Smad3 activation

○Tamai R，Kobayashi M，Kiyoura Y

Dept Oral Med Sci, Ohu Univ Sch Dent

［Purpose］In previous study, we investigated the effects of Smad3 activation on the increase in TLR4-induced IL-1beta production by pretreatment with alendronate（ALN）, one of the nitrogen-containing bisphosphonates. In this study, we investigated the effects of Smad3 activation on the increase in caspase-1 release by ALN.

［Methods］Lipid A was purchased from Peptide Institute. The mouse macrophage-like J774.1 cells（$2\times10^5$ cells/well）were pretreated with or without ALN for 24 h and washed twice with serum-free RPMI1640. Cells were then incubated in the presence or absence of lipid A（100 ng/ml）in RPMI1640 containing 10% FBS for 24 h. Levels of secreted caspase-1 in culture supernatants were measured by ELISA. For Smad3 inhibition assays, J774.1 cells were treated with 3 microM or 10 microM SIS3, an inhibitor of Smad3, for 1 h prior to the addition of ALN.

［Results and Discussion］SIS3 inhibited ALN-increased caspase-1 release by J774.1 cell. The results suggest that Smad3 activation participates in ALN-augmented IL-1beta production via caspase-1.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E1　破骨細胞アクチンリングに局在する新規分子 PPP1r18

○松原　琢磨[1]，金原　正敬[2]，前田　敏博[2]，吉澤　光弘[2]，中富　千尋[1]，古株彰一郎[1]，
自見英治郎[1]，山本　照子[2]

[1]九歯大　分子情報生化
[2]東北大　院歯　顎口腔矯正

［目的］破骨細胞が骨吸収を行う際には破骨細胞特異的な細胞骨格構造である明帯を形成し，骨基質と強固に接着することによって骨吸収に最適な環境を構築する．チロシンキナーゼ c-Src 遺伝子欠損マウスにおける破骨細胞は明帯を形成できず，その結果破骨細胞による骨吸収不全による大理石骨病となる．この結果より，明帯形成は破骨細胞の骨吸収機能に必須であり，明帯形成の分子制御機構を明らかにすることは骨粗鬆症をはじめとした代謝性骨疾患の治療法の確立にもつながると考えられる．そこで，申請者は in vitro において破骨細胞の明帯に相当するアクチンリングを構成するドット状のポドソームに着目し，ポドソーム形成に関与する分子の同定を試みた．［方法・結果］c-Src 遺伝子欠損が欠損した線維芽細胞系細胞株 SYF 細胞は恒常活性型 c-Src を過剰発現することにより，ストレスファイバーがポドソームへと変化する．そこで，申請者は恒常活性型 c-Src を過剰発現した SYF 細胞由来の細胞内抽出物より c-Src をベイトとして質量分析を行い，アクチン結合タンパク質 PPP1r18 を見出した．PPP1r18 は SYF 細胞において恒常活性型 c-Src により誘導されるポドソーム上に一致して局在していた．次に破骨細胞における PPP1r18 の発現および局在を検索した結果，PPP1r18 はアクチンリング上のポドソームに一致して局在していた．さらに，既知のポドソーム形成タンパク質である Cortactin との局在を比較した結果，両者ともにポドソームに一致した局在を認めた．さらに，c-Src と PPP1r18 との関連を検討した結果，c-Src との弱い結合を認めたが，恒常活性型 c-Src の過剰発現による PPP1r18 のチロシンリン酸化は認められなかった．［結論］破骨細胞アクチンリング上のポドソームに局在し，その形成に関与する可能性のある分子 PPP1r18 を同定した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A novel protein PPP1r18 is involved in actin ring formation of osteoclasts

○Matsubara T[1]，Kinbara M[2]，Maeda T[2]，Yoshizawa M[2]，Nakatomi C[1]，Kokabu S[1]，Jimi E[1]，
Yamamoto-Takano T[2]

[1]Dept Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ
[2]Div Orthodo Dentofacial Orthopedics, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Osteoclasts form sealing zone and ruffled border, a characteristic actin cytoskeletal structure and adhere to bone matrix strongly while bone resorption. Osteoclasts in c-Src deficient mice that shown osteopetrosis did not form sealing zone and ruffled border and they could little resorb bone. This shows the importance of sealing zone in osteoclasts in bone resorption. Sealing zone is consistent with dot-like actin structure named podosomes. Podosomes are cell periphery of osteoclast in vitro and involved in sealing zone formation. Constitutively activated c-Src made podosome formation in c-Src null fibroblasts（SYF cells）. To reveal the mechanism of podosome formation, we analyzed the binding protein of c-Src in SYF cells by Mass spectrum analysis. Then we found an actin binding protein PPP1r18. PPP1r18 was highly expressed and localized at podosomes in constitutively activated c-Src overexpressed SYF cells. Furthermore, PPP1r18 was strictly localized in podosome of osteoclast actin ring corresponding with sealing zone. PPP1r18 was co-localized with Cortactin that also regulates actin in podosome. We next examined regulation mechanism of PPP1r18. PPP1r18 was weakly bound to c-Src and was not phosphorylated by constitutively activated c-Src. These results suggest that PPP1r18 is involved in sealing zone formation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E2 骨吸収の促進は骨細胞における sclerostin の発現を低下させ，Wnt/β-catenin シグナルを促進する

○小出　雅則[1]，小林　泰浩[1]，山下　照仁[1]，上原　俊介[2]，飯村　忠浩[3]，中村美どり[2]，
高橋　直之[1]，宇田川信之[1,2]

[1]松本歯大　分子硬組織
[2]松本歯大　口腔生化
[3]愛媛大　プロテオサイエンスセ

【目的】骨の恒常性は，骨吸収と骨形成の共役により保たれている．OPG 欠損マウス（OPG-KO）では骨吸収のみならず骨形成も亢進している．近年，骨細胞から分泌される sclerostin（Sost）は，骨形成を促進する Wnt/β-catenin シグナルのアンタゴニストであることが示された．我々は，OPG-KO において Wnt/β-catenin シグナルが亢進する知見を得ている．そこで骨吸収と骨形成の共役に sclerostin の発現調節が関わるか検討した．【方法と結果】骨吸収亢進マウスとして 12 週齢の OPG-KO を用いた．脛骨の免疫染色の結果，OPG-KO の β-catenin 発現は対照マウスより増加していた．一方，OPG-KO の sclerostin 発現は対照マウスより顕著に低下していた．Real-time RT-PCR 解析の結果，長管骨において OPG-KO の Sost 発現は対照マウスより著しく低下していた．一方，OPG-KO の Wnt/β-catenin シグナルの標的遺伝子である Axin2 発現および骨形成の指標である Alpl 発現は対照マウスより増加していた．8 週齢の OPG-KO に抗 RANKL 抗体（5 mg/kg）を腹腔に 1 回投与し，12 週齢にて脛骨の免疫染色を行った．抗 RANKL 抗体投与により，OPG-KO の骨吸収は抑制された．一方，sclerostin 発現は増加した．Real-time RT-PCR 解析の結果，抗 RANKL 抗体投与により OPG-KO の長管骨の Sost 発現は顕著に増加した．一方，抗 RANKL 抗体投与により OPG-KO の Axin2 発現および Alpl 発現は著しく減少した．【結論】骨吸収の促進は，骨細胞の sclerostin 発現を低下させ，Wnt/β-catenin シグナルおよび骨形成を亢進させた．骨代謝共役には sclerostin の発現調節が重要な役割を担っていることが示唆された．【会員外共同研究者】保田尚孝（オリエンタル酵母工業株 長浜生物科学研究所）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Bone resorption suppresses sclerostin expression in osteocytes and promotes Wnt/β-catenin signaling

○Koide M[1], Kobayashi Y[1], Yamashita T[1], Uehara S[2], Iimura T[3], Nakamura M[2], Takahashi N[1], Udagawa N[1,2]

[1]Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ
[3]Div Bio-Imaging, Proteo-Science Center, Ehime Univ

Bone is continuously remodelled by bone resorption and formation. Osteoprotegerin-deficient（OPG-KO）mice exhibited increased bone formation as well as increased bone resorption. Sclerostin, an antagonist of Wnt/β-catenin signaling, produced by osteocytes inhibits bone formation. An immunohistochemical study showed that osteoblasts strongly expressed β-catenin in the tibiae of OPG-KO mice. We then examined the expression of sclerostin in long bones of 12-week-old OPG-KO mice using immunohistochemical and real-time RT-PCR techniques. Sclerostin-positive osteocytes were decreased in OPG-KO mice compared with control mice. A real-time RT-PCR analysis showed that the expression of Sost mRNA was significantly lower in OPG-KO mice than in control mice. In contrast, the expression of Axin2 mRNA, a target gene of Wnt/β-catenin signaling, and Alpl mRNA, a bone formation marker, was significantly higher in OPG-KO mice than in control mice. Administration of anti-RANKL antibody to OPG-KO mice suppressed bone resorption and increased the expression of Sost mRNA compare with vehicle-treated OPG-KO mice. In contrast, the expression of Axin2 and Alpl mRNA was lower in OPG-KO mice treated with anti-RANKL antibody than in vehicle-treated OPG-KO mice. We propose that bone resorption inhibits the expression of sclerostin in osteocytes, which, in turn, promotes Wnt/β-catenin signaling.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E3 BMP2は転写因子OsterixとMsx2を介して変形性関節症の創薬ターゲット，Wntアンタゴニスト FRZBの発現を制御する

○八木　寛子，高畑　佳史，村上　智彦，波多　賢二，西村　理行

大阪大　院歯　生化

【目的】変形性関節症（OA）は，股関節や膝関節に好発するが，歯科領域でもIV型顎関節症の原因であり，有効な治療法の開発が渇望されている．近年，古典的WntシグナルがOAのリスクファクターであることが示されている．一方Wntアンタゴニスト，frizzled-related protein（FRZB）の遺伝子変異あるいは遺伝子欠損が，ヒトあるいはマウスでOAを誘発することが報告されている．そこで本研究では，FRZBをOAの有効な創薬ターゲットと考え，その発現制御機構の解明を目指した．【方法・結果】生体におけるFRZBの発現部位を検討するため，生後0日齢C57BLマウスの各組織からRNAを採取し，RT-qPCR法にてその発現を探索した．その結果，胸骨及び肋軟骨でFrzbの高い発現を認めた．また4日齢ICRマウス由来の関節軟骨表層細胞は非常に高いFrzbの発現を示した．次にヒト軟骨細胞様株SW1353を用いて，FRZBの発現に関与するサイトカインを検索したところ，BMP2刺激でFRZBの発現が促進された．一方，Wnt3a及びIhh刺激は，FRZBの発現に影響を与えなかった．そこでBMP2によるFRZBの発現促進機構を明らかにするために，BMP2の下流で機能する転写因子，Runx2，Msx2及びOsterixをSW1353細胞に過剰発現し，FRZBの発現に対する効果を検討した．Msx2あるいはOsterixの過剰発現によりFRZBの発現は顕著に増加したが，Runx2の過剰発現は効果を示さなかった．更にFRZB遺伝子プロモーター領域を含む各種ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作製し，Msx2並びにOsterixの関与を検討したところ，Msx2及びOsterixの過剰発現はFRZB遺伝子のプロモーター活性を促進した．【考察】BMP2はFRZBの発現促進効果を有し，その作用メカニズムとしてはMsx2及びOsterixが関与していることが明らかとなった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## BMP2 regulates expression of a Wnt antagonist FRZB, a putative therapeutic target for osteoarthritis, through Msx2 and Osterix

○Yagi H，Takahata Y，Murakami T，Hata K，Nishimura R

Dep Mol Cell Biochem, Osaka Univ Grad Sch Dent

Osteoarthritis（OA）, which is degenerative arthritis most commonly observed in knee and hip joints, results in type IV temporomandibular joint disease. Recent studies suggested that canonical Wnt signaling is one of risk factors OA. Interestingly, human and mouse genetic studies indicated importance of frizzled-related protein（FRZB）, a Wnt antagonist, in prevention of OA. In this study, we investigated transcriptional regulation of FRZB. To examine tissues distribution of Frzb in vivo, we examined the expression in organs and cells isolated from C57BL and ICR mice, and found high expression of Frzb in sternum and rib cartilages, and the superb high expression of Frzb in superficial zone cells of articular cartilage. To explore the cytokines involved in FRZB expression, we stimulated a human chondrogenic cell line, SW1353, with BMP2, Wnt3a or Ihh. BMP2 clearly increased FRZB, whereas Wnt3a and Ihh have no effect. We next examined the effect of overexpression of BMP2-regulated transcription factors, including Runx2, Osterix and Msx2, on FRZB expression. Overexpression of Msx2 or Osterix stimulated FRZB expression and its promoter activity in SW1353 cells, but Runx2 overexpression had no effects. Thus, our data suggest that BMP2 regulates FRZB expression through Msx2 and Osterix.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E4 破骨細胞分化における新規アクチン骨格制御因子としての DCL-1/CD302 の役割と CCN2 との関連

○青山絵理子[1]，星島　光博[1]，服部　高子[2]，久保田　聡[1,2]，滝川　正春[1]

[1]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター
[2]岡山大　院医歯薬　口腔生化

CCN2 は主に間葉系の組織，細胞において，分化，増殖などを促進するタンパク質であるが，近年破骨細胞における作用が次々と明らかになっている．また，この分子の性質の一つとして他の生理活性因子や膜タンパク質と結合してその機能を制御することが知られており，さらなる CCN2 結合因子の発見のためのスクリーニングを行った結果，CCN2 の結合因子候補として DCL-1/CD302 が見いだされてきた．DCL-1/CD302 は C タイプレクチンドメインを有する膜タンパク質の一種であるが，その発現分布や機能についてはほとんど報告がない．このような状況の下，我々は昨年の本大会で DCL-1/CD302 がマウス由来骨髄細胞から誘導した破骨細胞において発現していることや siRNA による DCL-1/CD302 の発現抑制は成熟破骨細胞の出現および骨吸収を抑制することを報告した．そこで，今回はアクチンリングを形成しつつある細胞に siRNA を加えて DCL-1/CD302 を抑制した時のアクチンリングの様子を観察したところ，リングの断片化が観察された．また，CCN2 との関連性を検討するため DCL-1/CD302 と CCN2 およびアクチンを同時に染色したところ，これら三者は成熟破骨細胞で発現していることが分かった．さらに CCN2 および DCL-1/CD302 のそれぞれがアクチンと結合していることを免疫沈降法で確認した．これらのことは DCL-1/CD302 はアクチンリングの形成，維持に必須の因子であり，CCN2 はその機能を発揮する上で何らかの役割を担っている可能性を示している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A novel regulatory factor in osteoclastogenesis DCL-1/CD302 and the role of its binding to CCN2

○Aoyama E[1], Hoshijima M[1], Hattori T[2], Kubota S[1,2], Takigawa M[1]

[1]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]Depart Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

CCN2 is known as a multi-potent factor in proliferation and differentiation of mesenchymal tissues and cells via its direct bindings to other growth factors or membrane proteins. As a result of screening, DCL-1/CD302 was found as a new candidate binding to CCN2. DCL-1/CD302 is one of C-type lectin receptors but the distribution and the function are mostly not clarified. Previously we presented that DCL-1/CD302 was expressed with actin ring in mature osteoclasts induced from murine bone marrow cells, and siRNA targeting DCL-1/CD302 inhibited maturation of osteoclasts and bone resorption in vitro. Here, we show that siRNA targeting DCL-1/CD302 caused fragmentation of actin ring. Immunostaining for DCL-1/CD302, actin and CCN2 showed that these three factors expressed in mature osteoclasts. Immunoprecipitation and western blotting assay showed that both of CCN2 and DCL-1/CD302 bound to actin. These data suggest that DCL-1/CD302 has a critical role in actin ring formation and CCN2 could contribute to this process.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E5　CCN2 は骨細胞を介して破骨細胞形成を制御する

○西田　　崇[1]，久保田　聡[1,2]，服部　高子[1]，滝川　正春[2]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔生化
[2]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター

我々はこれまで骨芽細胞に対する CCN family protein 2/connective tissue growth factor（CCN2/CTGF）の機能解析を通して，CCN2 が骨形成過程に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた．この結果を *in vivo* で確認するため，胎生 18.5 日胚の CCN2 欠損マウスの骨組織を詳細に解析したところ，骨形成の障害だけでなく，すでに形成された骨組織にも変形が見られ，骨形成後の骨リモデリングにも影響があると考えられた．そこで，今回，骨リモデリングを制御する骨細胞に対する CCN2 の作用を骨細胞機能の 1 つである破骨細胞形成の観点から解析した．骨細胞様細胞株 MLO-Y4 に 組換え CCN2 タンパク質（rCCN2）を添加し，破骨細胞形成に重要な因子である RANKL 及び OPG の遺伝子発現レベルを解析すると，RANKL の遺伝子発現レベルに影響は見られなかったが, OPG の遺伝子発現レベルは rCCN2 の濃度に依存して減少した. 次に, MLO-Y4 細胞を介した破骨細胞形成に CCN2 がどのような影響を与えるのかを調べるために，rCCN2 を添加したコラーゲンゲル内で MLO-Y4 細胞を 3 次元培養し，そのコラーゲンゲル上にマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を播種した．GST 融合 RANKL で RAW 細胞を破骨細胞様細胞に誘導すると，rCCN2 で刺激された MLO-Y4 細胞上で RAW 細胞においては，対照群よりも破骨細胞形成に重要な因子である NFATc1 の産生量が増加した．一方，rCCN2 で刺激された MLO-Y4 細胞自身は対照群と比較して細胞突起形成に目立った変化を示さなかった．これらの結果から，CCN2 は骨細胞自身の細胞突起の伸張には影響を与えないものの，骨細胞から産生される OPG の産生量を抑制することで，破骨細胞形成を促進すると考えられる．（会員外共同研究者; Dr. Bonewald, L. F. ）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## CCN2 regulates osteoclastogenesis through the osteocyte functions

○Nishida T[1]，Kubota S[1,2]，Hattori T[1]，Takigawa M[2]

[1]Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

Our *in vitro* study revealed that bone formation was promoted by CCN family protein 2/connetive tissue growth factor（CCN2/CTGF）. In addition, we also found that both bone formation and bone remodeling were impaired in *Ccn2*-deficient bone tissues at E18.5. Thus, the aim of this study is to clarify that CCN2 regulates osteoclastogenesis during bone remodeling induced by osteocytes. Osteocytic cell line MLO-Y4 was treated with recombinant CCN2（rCCN2）, and real-time RT-PCR was performed using RANKL and OPG primers. The gene expression of RANKL did not change, but the OPG expression was decreased with rCCN2, dose-dependently. Next, we constructed 3D culture systems of MLO-Y4 cells into collagen gel including rCCN2. A mouse macrophage cell line, RAW264.7 was inoculated onto the gel and was treated with GST-RANKL. NFATc1, which is essential factor of osteoclastogenesis, was increased in RAW cells on the gel including MLO-Y4 cells and rCCN2. On the other hand, formation of cell processes of MLO-Y4 cells was not affected by rCCN2. These results suggest that although CCN2 does not affect the cell process formation of osteocytes, it decreased the gene expression of OPG in osteocytes, leading to the promotion of osteoclastogenesis.（Non-member co-author; Dr. Bonewald, L. F.）

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-E6 CCN2 と Rab14 の相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割 ～軟骨分化促進因子 CCN2 の新たな細胞内機能～

○星島 光博[1]，服部 高子[3]，青山絵理子[2]，西田 崇[3]，久保田 聡[3]，上岡 寛[1]，滝川 正春[2]

[1]岡山大 院医歯薬 矯正
[2]岡山大 院医歯薬 歯先端研センター
[3]岡山大 院医歯薬 口腔生化

CCN2 は軟骨に強い発現を示し，基質の合成促進能を有する分泌性の液性因子とされてきた．昨年までに我々は，軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 由来の cDNA ライブラリーから，CCN2 と結合する因子として Rab14 を単離し，細胞内で両者が共局在することを報告してきた．今回我々は，新たに CCN2 が IGFBP ドメインを介して Rab14 と結合することを明らかにした．また，Rab14 は細胞質内に存在し，エフェクター分子と結合する事で小胞膜上に会合し，分泌蛋白質のゴルジ体から分泌小胞への輸送に関与する分子として知られている．そこで，CCN2 と Rab14 の相互作用が軟骨細胞内の小胞輸送に及ぼす影響を調べた．HCS-2/8 細胞で *rab14* siRNA は，小胞体ストレス下で誘導される *bip* および *chop* の mRNA の発現レベルを有意に上昇させたが，*aggrecan* mRNA の発現レベルには影響しなかった．同様に *ccn2* siRNA は，*bip* および *chop* の mRNA の発現レベルを有意に上昇させ，*aggrecan* mRNA の発現レベルを低下させた．さらに，dominant negative form の Rab14 を HCS-2/8 細胞に過剰発現させると，プロテオグリカンの蓄積が野生型の Rab14 と比較して 75％以下に低下した．
これらのことから，CCN2 は Rab14 と IGFBP ドメインを介して細胞内で相互作用し，分泌蛋白質を含む小胞の輸送に関与している可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of interaction between CCN2 and Rab14 GTPase in vesicle trafficking in chondrocytes —Novel intracellular function of CCN2—

○Hoshijima M[1]，Hattori T[3]，Aoyama E[2]，Nishida T[3]，Kubota S[3]，Kamioka H[1]，Takigawa M[2]

[1]Dept Orthod, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[3]Dept Biochem Mol Dent Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pham Sci

CCN family 2/Connective tissue growth factor（CCN2）is strongly expressed in cartilage and modulates chondrocyte differentiation and proliferation by binding various molecules. The aim of this study is to elucidate role of interaction between CCN2 and Rab14 in chondrocytes.
We have reported the direct interaction between CCN2 and Rab14 in the cells and both similar cellular colocalization as spots distributed in the cytosol. Here we report that CCN2 binds to Rab14 through its IGFBP domain among the four domains in CCN2. Decrease in *rab14* or *ccn2* mRNA by siRNA enhanced the expression of *chop* and *bip* mRNA significantly. On the other hand, treatment of *ccn2* siRNA decreased *aggrecan* mRNA, but *rab14* siRNA did not change it. Furthermore, dominant negative form of the Rab14 protein overexpressed in HCS-2/8 cells decreased proteoglycan accumulation to less than 75% as compared to wild type form of the Rab14 protein overexpressed in the cells.
The Rab14 is known to be involved in vesicle trafficking between the golgi complex and endosomes. Our results suggest that intracellular CCN2 is associated with Rab14 on proteoglycan-containing vesicles during their transport from golgi to endosomes in chondrocytes.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F1 Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha のリン酸化を介した骨芽細胞分化促進および破骨細胞分化抑制の分子機構

○浜村　和紀，戸苅　彰史

愛院大　歯　薬理

【目的】タンパク質のミスフォールディング，UV，ウイルス感染などによって小胞体ストレスが誘導され，eukaryotic translation initiation factor 2 alpha（eIF2α）がリン酸化を受け，ATF4 や CHOP などの特定のタンパク質を除き，翻訳が抑制される．この eIF2α が骨芽細胞および破骨細胞においてどのような生理的役割をもつかについてはほとんど知られていない．また，この eIF2α の脱リン酸化阻害剤である salubrinal や guanabenz は，小胞体ストレスを緩和することが知られている．そこで，これらの小分子化合物を用いて，eIF2α のリン酸化の骨芽細胞および破骨細胞への関与を検討した.【材料および方法】eIF2α 脱リン酸化阻害剤である salubrinal や guanabenz を用いて，骨芽細胞（MC3T3-E1）では Alizarin Red S 染色，破骨細胞（RAW264.7 に RANKL 処理した）では TRAP 染色により分化能を評価した．また，eIF2α による骨芽細胞および破骨細胞の分化調節機構を明らかにするためマイクロアレーおよび quantitative real-time PCR を用いて検討した．【結果】eIF2α 脱リン酸化阻害剤を用いて，骨芽細胞および破骨細胞への分化の影響を検討した結果，これらの阻害剤が骨芽細胞への分化を促進し，破骨細胞への分化を抑制することを明らかにした．その機序として，eIF2α のリン酸化の上昇により，骨芽細胞では ATF4 を誘導し，破骨細胞では NFATc1 を抑制することを明らかにした．また，マイクロアレーの結果から，この NFATc1 の抑制に 2 つの AP-1 転写因子（c-Fos および JunB）が関与することが判明した．【結論】eIF2α のリン酸化を介して，骨芽細胞では，ATF4 の上昇により分化誘導が促進され，破骨細胞では，NFATc1 の抑制により分化誘導が抑制されることが明らかになった．このことより，eIF2α 脱リン酸化阻害剤である salubrinal や guanabenz が骨粗しょう症に対する新しい治療薬になりうる可能性が示唆された.

**【利益相反】**利益相反状態にはありません.

## Mechanisms for enhancement of osteoblastogenesis and suppression of osteoclastogenesis by phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha

○Hamamura K，Togari A

Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Purpose: Stress to the endoplasmic reticulum（ER stress）is induced by various stresses including protein misfolding, UV, and viral infection and leads to phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha（eIF2 alpha）. Cells exposured by ER stress are known to suppress general translation except for a particular set of proteins such as ATF4 and CHOP. Little is known about the role of eIF2 alpha mediated signaling in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. Using two small molecular compounds（salubrinal and guanabenz）that inhibit de-phosphorylation of eIF2 alpha, we evaluated involvement of phosphorylation of eIF2 alpha in differentiation of osteoblast and osteoclast. Material & Methods: We evaluated effects of salubrinal and guanabenz in osteoblast（MC3T3-E1）and osteoclast differentiation（RAW264.7 treated by RANKL）using Alizarin Red S and TRAP staining, respectively. To analyze molecular signaling pathways, microarray and quantitative real-time PCR were conducted. Results & Conclusion: Elevated phosphorylation of eIF2 alpha induced osteoblastogenesis thorough upregulation of ATF4 and suppressed osteoclastogenesis by inhibition of NFATc1. Also using genome-wide expression profiles, we predicted and validated an involvement of AP-1（c-Fos and JunB）in suppression of osteoclastogenesis. Correctively, this study suggest that inhibition of de-phosphorylation of eIF2 alpha might provide a novel therapeutic possibility for osteoporosis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F2 プロテインホスファターゼ PP2A Cα は骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する

○岡村　裕彦，寺町　順平，羽地　達次

徳島大　院医歯薬　口組

PP2A は細胞の分化・増殖やアポトーシスに関与するセリン/スレオニンプロテインフォスファターゼである．PP2A は触媒サブユニット（PP2A Cα）を中心に三量体を形成し，様々な蛋白質の脱リン酸化に関与する．今回我々は，骨芽細胞および脂肪細胞分化における PP2A Cα の役割について検討した．［方法］1．骨特異的にドミナントネガティブ PP2A Cα を発現したマウス（PP2A-Tg）の体重，骨量および骨髄内脂肪量を調べた．2．骨分化誘導培地で培養した MC3T3-E1 細胞において PP2A Cα の発現と PP2A 活性を調べた．3. PP2A Cα の発現を抑制した MC3T3-E1 細胞（shPP2A）を樹立し，リアルタイム PCR，ALP 染色，alizarin red 染色を用いて，骨芽細胞分化能を調べた．4．骨に必須の転写調節因子 Dlx5 および Runx2 と Osterix の転写活性との関連についてルシフェラーゼアッセイにより解析した．5. shPP2A 細胞と未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞を共培養し，リアルタイム PCR，Oil red O 染色，Triglyceride assay を用いて，脂肪細胞分化に与える影響について検討した．［結果と考察］PP2A-Tg マウスは野生型に比べて，体重，骨量および骨髄内脂肪量の増加が認められた．骨芽細胞分化に伴い PP2A Cα の発現および PP2A 活性が低下した．shPP2A 細胞では Osterix，Bone sialoprotein，Osteocalcin 等の骨分化マーカーの発現が増加し，骨芽細胞分化能が亢進した．Dlx5 および Runx2 は shPP2A 細胞で高発現しており，Osterix の転写活性を促進した．shPP2A 細胞と共培養した C3H10T1/2 細胞では脂肪分化マーカーの発現と細胞内トリグリセリド蓄積が促進された．以上の結果から，PP2A Cα は，骨関連因子の発現を介して骨芽細胞分化と骨形成を調節する重要な因子であることが分かった．さらに，骨芽細胞の PP2A Cα 発現は未分化間葉系細胞の脂肪細胞分化に関与すると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## PP2A Cα is an important factor for osteoblast and adipocyte differentiation

○Okamura H，Termachi J，Haneji T

Dept Histol and Oral Histol Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

The serine/threonine protein phosphatase 2A（PP2A）regulates many important physiological processes. In this study, we investigated the roles of a-isoform of PP2A catalytic subunit（PP2A Cα）in osteoblast and adipocyte differentiation. Transgenic mice that specifically express dominant negative PP2A Cα in osteoblastic cells showed higher cortical bone mineral density and increase in body weight and adipose tissue of tibia bone marrow. In vitro study, the expression and phosphatase activity of PP2A Cα decreased during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. Knockdown of PP2A Cα accelerated osteoblast differentiation with the upregulation of bone-related genes. Transcriptional activity of Osterix promoter region was higher in PP2A Cα-knockdown cells, which was controlled by transcription factors Dlx5 and Runx2. PP2A Cα-knockdown cells revealed higher ability to induce adipocyte differentiation and the expression of adipocyte marker genes in mesenchymal cells. Our results indicate that PP2A Cα plays important roles in the regulation of bone formation and osteoblast differentiation through the expression of bone-related transcription factors. PP2A Cα in osteoblasts is considered to be involved in controlling adipocyte differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F3 骨縫合部組織における機械的伸展刺激による骨芽細胞形成促進機構へのYAP/TAZの関与

○池亀　美華[1,2]，山本　敏男[1]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態
[2]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター

【背景】YAP/TAZは癌抑制シグナル経路であるHippo経路に関連する転写共役因子で，核へ移行して細胞増殖を促進する．近年，培養細胞において機械的刺激によるアクチン細胞骨格の再構成によりYAP/TAZが活性化され，細胞増殖や分化が調節されることが報告されている．以前我々は，骨縫合部組織に伸展刺激を加え骨芽細胞の増殖・分化を促進する実験系で，縫合部細胞のアクチンストレスファイバーが発達することを報告した．そこで同様の実験系を用い，組織内の細胞における機械的刺激によるYAP/TAZの核移行について検討した．【材料と方法】幼若マウス頭頂骨矢状縫合部に，0.2 gの伸展刺激を加え（0.2 g群），あるいは加えずに（0 g群），3または6時間培養した．培養後，凍結切片を作製し，抗YAP/TAZ抗体を用いて免疫組織化学を行った．採取直後の試料（0時間群）についても同様に検討を行った．【結果】YAP/TAZの核集積は，0時間群では，主に骨膜中の線維芽細胞様細胞で認められた．3時間0.2 g群では縫合部細胞は伸展方向に伸長され，骨膜中の細胞の他，縫合部内の線維芽細胞様細胞において，0 g群に比較してより多くの細胞で核集積が認められた．6時間0.2 g群では縫合部骨形成端で前骨芽細胞が増加し，その周囲の線維芽細胞様細胞の核に集積が認められたが，0 g群では縫合部細胞における核集積は少なかった．【考察と結論】伸展刺激により，骨縫合部では主に縫合部中心部や骨形成端周辺の未分化間葉系細胞でYAP/TAZの核移行が促進されると考えられた．以上より，伸展刺激によって促進される縫合部組織内の骨芽細胞形成促進機構には，YAP/TAZの核移行の促進が関与している可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of YAP/TAZ transcription co-activator with stimulated osteoblast formation by mechanical tensile stress in cranial sutures

○Ikegame M[1,2]，Yamamoto T[1]

[1]Dept Oral Morph, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

YAP and TAZ are transcription factors and the activation is regulated by the Hippo pathway. It is also regulated by actin stress-fiber formation associated with mechanical stress. YAP/TAZ nuclear translocation induces cell proliferation and differentiation. We previously reported that tensile-stress stimulated osteoblast differentiation and actin stress-fiber formation in mouse cranial sutures. To clarify the involvement of YAP/TAZ with this process, we examined nuclear accumulation of YAP/TAZ in cranial sutures by mechanical stimulation. Parietal bones from neonatal mice were cultured with（0.2 g）or without（0 g）tension on the mid-sagittal sutures. After the culture, we prepared cryosections from the samples for immunohistochemistry using anti-YAP/TAZ antibody. In 3h-0.2 g group, the YAP/TAZ nuclear accumulation was observed in the larger number of fibroblast-like cells in the middle of the suture than in 3h-0 g group. In 6h-0.2 g group, nuclear accumulation was observed in fibroblast-like cells in the vicinity of preosteoblasts in the osteogenic area and in the middle of the suture. Herein, we could show the stimulated nuclear accumulation of YAP/TAZ in the suture cells with tensile stress, mainly in the osteogenic layer. We suggest that the nuclear translocation of YAP/TAZ promoted by tension participates in the increased proliferation and differentiation of osteoblasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F4　長期的なオステオカルシンの経口投与による代謝の改善とその性差

○溝上　顕子，川久保-安河内友世，平田　雅人

九大　院歯　口腔細胞工

骨基質タンパク質であるオステオカルシン（OC）は，内分泌作用により血糖値や脂質代謝に重要な役割を果たしていることが最近の研究で明らかにされた．OC は，骨芽細胞内で合成されたのち，γ-カルボキシラーゼによってカルボキシル化され，その大部分は骨基質として骨に埋め込まれるが，一部は血中に放出されている．血中の OC のうち，3 つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されたもの（GlaOC）と低カルボキシル化状態のもの（GluOC）の 2 つの形態が存在している．内分泌作用を示すのは GluOC であり，糖・エネルギー代謝の調節，雄の生殖機能等に大きく関わることが報告されている．我々は，雌性マウスに対して長期間 GluOC を経口投与すると，空腹時血糖の低下，耐糖能の改善，および脂肪細胞の縮小が認められることを報告した．今回は，雄性マウスで同様の実験を行い，GluOC による代謝改善効果には性差があることを明らかにした．雄性マウスに GluOC を長期間投与すると，耐糖能およびインスリン抵抗性が悪化した．また，脂肪細胞の肥大化と血中アディポネクチンの低下が認められた．これらの所見は，高脂肪高ショ糖食で飼育したメタボリックシンドロームモデルマウスにおいてより顕著であった．GluOC によって血中テストステロン濃度が上昇したことから，精巣摘出術を施したマウスで同様の実験を行うと，雌性マウス同様に GluOC による糖代謝の改善が認められた．以上のことから，GluOC のエネルギー代謝改善効果には雌雄差があり，それは GluOC による血中テストステロン濃度上昇による可能性が高いことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Long-term oral administration of osteocalcin triggers insulin resistance in male mice

○Mizokami A，Kawakubo-Yasukochi T，Hirata M

Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Uncarboxylated osteocalcin（GluOC），a bone-derived hormone, regulates energy metabolism by stimulating insulin secretion, pancreatic beta-cell proliferation, and adiponectin expression in the adipocytes. We previously showed that long-term intermittent or daily oral administration of GluOC reduced the fasting blood glucose level, improved glucose tolerance, and increased the fasting serum insulin concentration as well as the beta-cell area in the pancreas, using female mice. In the present study, we performed similar experiments using male mice, and then it was found that long-term oral administrations of GluOC triggered in glucose intolerance, insulin resistance, and adipocyte hypertrophy in mice fed a high-fat high-sucrose diet. In addition, such administrations of GluOC increased circulating testosterone and decreased serum adiponectin level. These phenotypes disappeared when mice were orchidectomized, and restored again by testosterone supplement. These results indicate that gender difference was evident regarding the effect of GluOC on glucose homeostasis. Given that oral administration of GluOC could be a safe and convenient option for the treatment or prevention of metabolic disorders, the gender difference has to be taken into account in the further investigations.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F5　PRIP によるエネルギー代謝調節機構

○兼松　　隆

広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理

【目的】我々は，Ins(1,4,5)$P_3$結合性分子である phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)を見出し，PRIP 遺伝子欠損（*Prip*-KO）マウスを作製してこの分子の生理機能解明を目指してきた．*Prip*-KO マウスに高脂肪食負荷実験を行ったところ，野生型マウスに比べて摂餌量は多いにも関わらず脂肪蓄積が起きにくく痩せていた．本研究では，*Prip*-KO マウスのエネルギー代謝について検討を行った．【方法】カロリーメータを用いマウスのエネルギー代謝を測定した．また，褐色脂肪細胞のエネルギー代謝調節に関わる分子の発現やタンパク質のリン酸化レベルを解析した．【結果】通常食と高脂肪食のいずれの摂餌実験でも，*Prip*-KO マウスのエネルギー代謝は，野生型に比べ亢進しており直腸温も高かった．また，肝臓などに異所性の脂肪蓄積像は認めず，自発運動量も両遺伝子型間で差を認めなかった．よって，*Prip*-KO マウスではエネルギー代謝が亢進していることが示唆された．褐色脂肪細胞は，脂肪滴を分解してミトコンドリア内膜の uncoupling protein 1（UCP1）を活性化し非ふるえ熱産生する器官である．*Prip*-KO マウスの UCP1 発現量を測定したところ顕著に増加していた．また，*Prip*-KO マウスでは，脂肪分解に関わる分子 hormone-sensitive lipase（HSL）や perilipin 分子のリン酸化レベルが亢進しており脂肪分解活性が高く，恒常的に UCP1 活性が高いことが示唆された．【考察】褐色脂肪細胞における PRIP 遺伝子サイレンングは，恒常的に脂肪酸の遊離を促し UCP1 の活性化を介した非ふるえ熱産系を亢進するため，肥満に対する新たな治療戦略となると期待できる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Energy metabolism regulated by PRIP

○Kanematsu T

Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Phospholipase C（PLC）-related catalytically inactive protein（PRIP）is similar to phospholipase C-delta but lacks PLC activity. We reported that PRIP is a novel key modulator regulating lipolysis in adipocytes. *Prip*-KO mice displayed a lean phenotype. Here, we examined total energy expenditure to explain the phenotype using high-fat diet（HFD）-fed mice. *Prip*-KO mice showed resistance to HFD-induced obesity in spite of more food intake. Energy expenditure and body temperature were significantly increased in the *Prip*-KO mice compared with wild-type mice. Expression and activity of uncoupling protein 1, a thermogenic protein, was upregulated in *Prip*-KO brown adipocytes, which was triggered by the promotion of beta-adrenergic receptor-mediated lipolysis. The results indicate that PRIP is a modulator for fat lipolysis and thermogenesis in adipocytes, and thus PRIP silencing may be an anti-obesity therapy. Further comprehensive studies regarding PRIP signaling will help a better understanding of the etiopathology of obesity and feeding behavior, contributing to the potential development of new therapeutic targets aimed at tackling excess body fat accumulation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-F6　TGF-beta 誘導性 EMT における Stat3 の役割

○齋藤　正夫

山梨大　院医　生物化学

上皮間葉転換（EMT）はがん細胞の悪性形質獲得のひとつのステップである．TGF-beta は EMT を最も強力に誘導するサイトカインで，FGF などの増殖因子はこの EMT を劇的に促進することや，Ras に化性型の変異のあるがん細胞のみ，TGF-beta による EMT が惹起されることを既に報告している．一方，増殖因子受容体や Ras からのシグナルは TGF-$\beta$ シグナルを抑制することも知られているが，この協調作用は EMT 誘導に特異的現象である．そこで，本研究で，このシグナル特異性を検討した結果，Stat3 が非常に重要であることがわかった．また Stat3 の変異体を用いた実験から，これまで知られていない Stat3 の機能が TGF-$\beta$ 誘導性 EMT に深く関与することがわかった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## STAT3 integrates cooperative Ras and TGF-beta signals that induce Snail expression

○Saitoh M

Div Biological Chem Grad Sch Med Univ Yamanashi

The epithelial-mesenchymal transition（EMT）is a crucial morphological event that occurs during the progression of epithelial tumors. EMT can be induced by TGF-beta in certain kinds of cancer cells through the induction of Snail, a key regulator of EMT. We have previously found that TGF-beta remarkably induces Snail expression in cooperation with Ras signals; however, the underlying mechanism of this synergism has not yet been determined. Here, we demonstrate that STAT3 acts as a mediator that synergizes TGF-beta and Ras signals. Overexpression of STAT3 enhanced Snail induction, whereas siRNA-mediated knockdown of STAT3 inhibited it. The STAT3-YF mutant, which has Tyr 705 substituted with Phe, did not enhance Snail induction. Several STAT3 mutants lacking transcriptional activity also failed to enhance it; however, the putative STAT3 binding elements in the Snail promoter regions were not required for STAT3-mediated Snail induction. PIAS3 inhibited the enhanced Snail promoter activity induced by TGF-beta and Ras. The interaction between PIAS3 and STAT3 was reduced by TGF-beta in cells harboring oncogenic Ras, whereas TGF-beta promoted the binding of PIAS3 to Smad3. Therefore, these findings suggest that STAT3 enhances Snail induction when it is dissociated from PIAS3 by TGF-beta in cooperation with Ras signals.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G1　マウス顎顔面発生における静脈からのリンパ管内皮細胞の分化

○田谷　雄二，添野　雄一，白子　要一，青葉　孝昭，佐藤かおり

日本歯大　生命歯　病理

【目的】マウス胎仔のリンパ管発生は，胎生 9.5 日前後で体幹部主静脈から開始され，転写因子 Sox18/Prox1/CoupTF2 の制御下で，主静脈の内皮細胞からリンパ管内皮細胞への分化誘導と出芽・遊走を経て管腔形成する．本研究では，マウス胎仔の顎顔面領域におけるリンパ管の発生機序の解明を目的として，リンパ管内皮細胞分化の分子機構について検討した．【方法】ICR マウス胎仔（胎生 9.5～14.5 日）の顎顔面領域において，DNA マイクロアレイと IPA，ならびにリアルタイム RT-PCR により，リンパ管発生に関わる遺伝子発現について解析するとともに，リンパ管内皮細胞（Vegfr3・Lyve1・Ccl21）と分化誘導因子（Prox1・VegfC），静脈内皮細胞（CoupTF2・Pecam1）の特異抗体による多重免疫染色により，同領域でのリンパ管内皮細胞分化にともなった表現型の推移について解析した．【結果と考察】顎顔面領域では，Prox1 の上流にある *Sox18* は胎生 11.5～12.5 日，静脈分化の制御因子である *CoupTF2* は胎生 13.5 日，リンパ管内皮細胞の分化誘導に中心的な役割を果たす *Prox1* は胎生 14.5 日でそれぞれ発現ピークを示した．リンパ管内皮細胞の分化に寄与する *Vegfr3* の発現は構成的であったが，*VegfC* は胎生 11.5 日付近で高発現であり，*Lyve1*・*Podoplanin*・*Ccl21* は胎生 14.5～16.5 日で高い発現を示した．顎顔面領域の組織観察から，胎生 13.5 日前後から舌下部の静脈で Prox1(+)/CoupTF2(+)内皮細胞が出現し，表皮下や舌下部で遊走する Lyve1 陽性細胞がみられた．胎生 14.5 日では，Prox1(+)/CoupTF2(+)を示す一部の内皮細胞が静脈から出芽・遊走するのが観察され，胎生 15.5 日以降では Prox1(+)/CoupTF2(+)/Lyve1(+)内皮細胞で構成されたリンパ管形成が明瞭となった．以上のことから，顎顔面領域の少なくとも一部のリンパ管形成は同領域内で静脈内皮細胞からリンパ管内皮細胞に分化誘導されることによって生じることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Lymphatic differentiation from venous endothelial cells in the craniofacial region of embryonic mice

○Taya Y，Soeno Y，Shirako Y，Aoba T，Sato K

Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

We herein focused on the molecular regulation of lymphatic endothelial cell differentiation in the craniofacial region of embryonic mice. ICR mouse embryos from E9.5-18.5 were used to collect the tissues in the craniofacial region. Gene expression profiling was performed using DNA microarray and IPA analysis and was validated by qPCR. For histomorphological analysis, serial sections were multiple-immunolabeled with Vegfr3/Lyve1/Ccl21 (lymphatic endothelial cell (LEC) marker), Prox1/VegfC (lymphatic differentiation-inducing factor) and CoupTF2/Pecam1 (venous endothelial cell (VEC) marker). The gene expression analysis indicated that the expression level of *Sox18, CoupTF2* and *Prox1* was increased at E11.5-12.5, E13.5 and E14.5, respectively. *VegfC* was highly expressed at E11.5. Although *Vegfr3* was expressed constitutively, the peak expression levels of *Lyve1, Podoplanin* and *Ccl21* were shown at E14.5-16.5. An immunohistochemical analysis demonstrated that Prox1 was beginning to express at around E13.5 in a subpopulation of CoupTF2 (+) VEC of the veins that was located in the sublingual region. Their Prox1 (+)/CoupTF2 (+) LEC progenitors migrated away around the veins at E14.5. Lymphatic vessels constituted of Prox1 (+)/CoupTF2 (+)/Lyve1 (+) LEC were formed after E15.5. These findings suggest that part of lymphatic vessels in the craniofacial region may differentiate from the endothelial cells of veins in the sublingual region of embryos.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G2　口蓋発生における *Ofd1* の役割について

○渡部　桃子[1,2]，川崎真依子[1]，高木　律男[2]，前田　健康[1]，大峡　　淳[1]

[1]新潟大　院医歯　口腔解剖
[2]新潟大　院医歯　顎顔面口外

【目的】Oral-Facial-Digital syndrome type1（OFD1 症候群；口顔指症候群 1 型）は，顔面，口腔，指趾における異常を特徴とした疾患であり，口腔領域の異常の一つに口蓋裂がある．OFD1 症候群は伴性優性遺伝を示す遺伝性疾患であり，近年，その原因遺伝子として X 染色体上の *OFD1* が同定された．我々は *Ofd1* 欠損マウスを用い，口蓋発生における *Ofd1* の役割を検討した．【結果】*Ofd1* 欠損マウスは胎生初期に致死するため，上皮組織特異的 *Ofd1* 欠損マウス（*hemizygous Ofd1; K14Cre*），間葉組織特異的 *Ofd1* 欠損マウス（*hemizygous Ofd1;Wnt1Cre*）を作成し，口蓋の形態学的観察を行った．その結果，全ての *Ofd1;Wnt1Cre* マウスで口蓋裂を認めたのに対し，*Ofd1; K14Cre* マウスに口蓋裂は観察されなかった．さらに，*Ofd1;Wnt1Cre* マウスは口蓋突起が欠如しており，アポトーシスの亢進および Shh シグナル活性の著しい低下を認めた．一次繊毛は Shh シグナルへの関与が知られており，*Ofd1;Wnt1Cre* マウスと同様に，Shh シグナル活性を間葉組織特異的に欠損したマウス（$Smo^{fl/fl}$;*Wnt1Cre*）を作成し観察した結果，*Ofd1;Wnt1Cre* マウスに類似した口蓋突起の欠如による口蓋裂が認められた．【考察】間葉組織の *Ofd1* が口蓋突起形成に必須であること，*Ofd1* による口蓋突起形成は Shh シグナルを介することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The role of *Ofd1* in palatal development

○Watanabe M[1,2]，Kawasaki M[1]，Takagi R[2]，Maeda T[1]，Ohazama A[1]

[1]Div Oral Anat, Dept Oral Biosci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Oral Maxillofacial Surg, Dept Health Sci, Course for Oral Sci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent

"Introduction" An X-linked dominant inherited disease, Oral-facial-digital type I（OFD1）syndrome is characterized by many malformations in the face, oral, digits. Cleft palate is one of oral anomalies in OFD1 syndrome. Although *OFD1* was identified as the gene mutated in OFD1 syndrome patients, the role of *OFD1* in palatogenesis remains unclear. We analyzed the role of *Ofd1* in palate development using *Ofd1* mutant mice. "Results" Since null mutation of mouse *Ofd1* results in an early embryonic lethal, we generated mice with epithelial（*hemizygous Ofd1;K14Cre*）or mesenchymal（*hemizygous Ofd1;Wnt1Cre*）conditional deletion of *Ofd1*. Cleft palates were observed in *Ofd1;Wnt1Cre* mice, but not in *Ofd1;K14Cre* mice. Cleft palates were found to be caused by the lack of palatal shelves, which was accompanied by increased apoptosis and significantly reduced Shh signaling activity. In order to investigate the relationship between *Ofd1* and Shh signaling pathway in palate development, we generated mice with mesenchymal conditional deletion of an essential transducer of Shh signaling, *Smo*（$Smo^{fl/fl}$;*Wnt1Cre*）. $Smo^{fl/fl}$;*Wnt1Cre* mice showed similar cleft palate phenotypes to those in *Ofd1;Wnt1Cre* mice. "Conclusion" Our results indicated that mesenchymal *Ofd1* is  for initiation of palatal shelves, and *Ofd1* regulate palatogenesis through Shh signaling.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G3　胎生期マウスにおける咽頭筋形成期の MRFs の発現

○岸　　飛鳥，斉藤　　博，宇佐美晶信

奥羽大　歯　口腔解剖

【目的】咽頭筋は嚥下運動に関与する骨格筋の 1 つである．嚥下運動は生後すぐにおこなわれる哺乳に必要であり，胎児のうちから羊水の嚥下運動が行われることが知られている．骨格筋の形成過程は一様ではなく，部位により成長時期に違いがあることが報告されている．Myogenic regulatory factors（MRFs）は myf5，myoD，Myogenin，MRF4 からなり，骨格筋の細胞分化を制御する転写調節因子であることから，筋の分化のマーカとして用いられている．本研究では胎生期マウスの咽頭筋の形成過程を解明する目的のために，MRFs タンパクの発現変化を検索した．【方法】試料として胎生 11-15 日齢の ICR マウスを使用した．胎児摘出後，4%パラフォルム・りん酸緩衝液で固定した．通法に従いパラフィン切片を作成し，正中矢状断の連続切片を作成した．形態学的観察のため H-E 染色を行い，免疫組織化学的染色にて MRFs タンパク（Myf5，MyoD，Myogenin，MRF4）の発現を経時的に観察した．【結果および考察】咽頭では最初に Myf5 の発現が発現し，発現部位は咽頭の下部であった．Myf5 の発現領域は経時的に咽頭下部から咽頭上部へと広がりがみられた．また，MyoD，Myogenin，MRF4 については Myf5 に遅れて咽頭下部から発現し，経時的に咽頭上部への広がりをみせた．Myf5，MyoD は筋芽細胞の分化，Myogenin は筋管への分化，MRF4 は筋繊維の成熟を示すことから，咽頭の骨格筋は咽頭の下方より分化，成熟が始まり，経時的に上部へと成長が続くことが明らかとなった．咽頭筋は出生前に嚥下運動が行えるように成熟していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of MRFs during development of pharyngeal muscle in mouse fetus

○Kishi A，Saito H，Usami A

Div Oral Anat, Ohu Univ Sch Dent

The pharyngeal muscles are skeletal muscles that participate in swallowing, though the process of their development in unborn mice is unclear. In the present study, we examined the expression of myogenic regulatory factors（MRFs）, transcription factors that control skeletal muscle differentiation, as a marker of pharyngeal muscle differentiation in mouse fetuses. ICR mice at age of embryologic day 11-15 were used. H-E staining was performed for morphological observation, while, immunohistochemical staining was used to observe localized changes in MRF proteins. Myf5 protein was expressed first in the lower pharynx, then extended to the upper part. In the lower pharynx, the expressions of MyoD, myogenin and MRF4 were detected later than that of Myf5, though protein expression was similar to Myf5. Our results suggest that pharyngeal muscle development begins from the lower part. Furthermore, pharyngeal muscle maturity was started before birth.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G4 歯髄細胞由来スフェロイドは三次元培養下で機能的な神経細胞に分化した

○肖　黎[1]，佐伯　周子[2]，井出　良治[2]

[1]日本歯大　生命歯　薬理
[2]日本歯大　生命歯　生理

本研究は，ヒト歯髄細胞由来スフェロイドの神経分化能を調べた．神経細胞の同定は神経細胞マーカー，イオンチャネルの発現および電気生理学的な手法で行われた．ヒト歯髄細胞は Matrigel 上に播種されてから 24 時間後，自発的にスフェロイドを形成した．このスフェロイドを市販神経分化培地中に 1 か月以上に培養し続けると，神経幹細胞マーカーである Nestin の発現が認められた．また，グリア細胞マーカーである GFAP の発現も確認された．しかし，ニューロンマーカーである TUBB3 の発現が確認されておらず，パッチクランプ法で刺激による膜電位の変化も観察されなかった．つまり，スフェロイドはグリア細胞に分化することができるものの，成熟したニューロンに分化できなかった．それで，我々はスフェロイドをヒトケラチノサイト HaCaT と共培養した上，神経分化誘導を行った．3 週間後，歯髄細胞スフェロイドより遊走した細胞がナトリウム及びカリウムイオンチャネルを発現し，脱分極し，テトロドトキシン感受性がある成熟した神経細胞に分化したことが，分子イメージング法およびパッチクランプ法等電気生理学的な測定法で確認された．さらに，フローサイトメトリーおよびリアルタイム定量 RT-PCR 法で調べた結果，共培養のスフェロイドは単独培養のスフェロイドより Nestin，TUBB3 を高く発現したことが分かった．これらの結果によると，歯髄細胞由来スフェロイドは HaCaT 細胞との共培養下で機能的な神経細胞に分化する能力があることが証明された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Dental pulp cells-derived spheroids differentiated into functional neuronal cells under three-dimensional culture conditions

○Xiao L[1]，Saiki C[2]，Ide R[2]

[1]Dept Pharm, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[2]Dept Phys, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

In this study, the potential for neuronal differentiation of human dental pulp cells-derived spheroids（DPC-SPHDs）was assessed. Neuronal differentiation was confirmed by the expression of lineage-specific markers, ion channels and electrophysiology. Human dental pulp cells spontaneously formed spheroids when they were inoculated on matrigel in neuronal inductive medium for about 24 hours. When the DPC-SPHDs were further cultivated for about 4 weeks, some cells expressed neuronal lineage markers GFAP, O4, Nestin and TUBB3. However, these cells were negative for electrophysiological test even after 24 weeks of neuronal induction suggesting that they have limitation to be differentiated into functional neuron. We then three-dimensionally co-cultivated DPC-SPHDs with human keratinocytes HaCaT under the same conditions for about three weeks. Flow cytomentry and qRT-PCR（Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR）showed that co-cultivated DPC-SPHDs expressed Nestin and TUBB3 at higher levels than DPC-SPHDs alone. Patch clamp technique indicated that co-cultivated DPC-SPHDs exhibited the capacity to produce a tetrodotoxin-sensitive（membrane）depolarization. Ion channel assay showed that co-cultivated DPC-SPHDs express sodium and potassium channels. Our results suggest that DPC-SPHDs have the ability to differentiate into functional neuron when they were three-dimensionally co-cultivated with HaCaT cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G5 温度制御式反復温熱刺激は PC12 細胞の神経細胞分化を誘導する

○工藤　忠明[1]，金高　弘恭[2]

[1]東北大　院歯　口腔生理
[2]東北大　院歯　歯学イノベーション

本研究の目的は，温度制御式反復温熱刺激（TRTS）によるラット PC12 神経様細胞の神経突起形成制御を検討することであった．TRTS を行うため加熱プレートを使用し，温度が変化する加熱プレートと培地温度との関係を観察した．増殖もしくは分化誘導培地に播種された PC12 細胞には，加熱プレートを用いて，2 つの異なった温度設定にて TRTS 処理（最大 18 時間/日）が行われた（加熱プレートの表面温度：摂氏 39.5 および 42 度）．その後，細胞増殖や神経突起の程度，もしくはアセチルコリンエステラーゼ（AChE）活性を評価した．また，TRTS の効果をもたらす機序を解析するため，我々は次の阻害剤を用いて細胞内シグナル伝達経路の変化を検討した：TrkA 阻害剤 GW44175，p38 阻害剤 SB203580，MEK 阻害剤 U0126 およびその不活性アナログ U0124．結果，摂氏 39.5 度の TRTS 処理は，細胞増殖試験において細胞増殖率を減少させなかった一方で，神経突起を有する PC12 細胞の数や AChE 活性を増加させた．さらに，U0126 および SB203580 は，U0124 や GW441756 とは異なり，TRTS 依存性神経突起伸長を大幅に抑制した．これらの結果は，TRTS が神経突起形成を誘導することや，ERK1/2 や p38 シグナル伝達経路の両方が PC12 細胞における TRTS 依存性神経突起形成に必要であることを示唆する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Temperature-controlled repeated thermal stimulation induces neuronal differentiation in PC12 cells

○Kudo T[1]，Kanetaka H[2]

[1]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Liaison Cent for Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

This study aimed to examine the regulation of neuritogenesis by temperature-controlled repeated thermal stimulation（TRTS）in rat neuron-like PC12 cells. A heating plate was used to apply TRTS, and the correlation of culture medium temperature with varying surface temperature of the heating plate was monitored. Plated PC12 cells were exposed to TRTS at two different temperatures via heating plate（preset surface temperature of the heating plate, 39.5 or 42 degrees Celsius）in growth or differentiating medium for up to 18 h/day. We then measured the extent of growth, neuritogenesis, or acetylcholine esterase（AChE）activity. To analyze the mechanisms underlying the effects of TRTS, we examined changes in intracellular signaling using the following: TrkA inhibitor GW441756; p38 inhibitor SB203580; and MEK inhibitor U0126 with its inactive analog, U0124. While a TRTS of 39.5 degrees Celsius did not decrease the growth rate of cells in the cell growth assay, it did increase the number of neurite-bearing PC12 cells and AChE activity. Furthermore, U0126, and SB203580, but not U0124 and GW441756, considerably inhibited TRTS-induced neuritogenesis. These results suggest that TRTS can induce neuritogenesis and that participation of both the ERK1/2 and p38 signaling pathways is required for TRTS-dependent neuritogenesis in PC12 cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## O2-G6 神経細胞分化におけるリゾリン脂質アシル転移酵素の働き

○田部　士郎[1,2]，引地　尚子[3]，有吉　　渉[1]，沖永　敏則[1]，西原　達次[1]

[1]九歯大　感染分子
[2]九歯大　顎顔面外科
[3]九歯大　口腔機能支援

【目的】近年，生体膜グリセロリン脂質の脂肪酸組成の多様性や非対称性に関与するリゾリン脂質アシル転移酵素群が発見された．今回，神経へ分化する細胞を用いて，分化過程における同酵素群の役割について検討した．【方法】マウス胚性腫瘍細胞由来の P19C6 細胞を神経細胞に分化させ，リゾリン脂質アシル転移酵素群の遺伝子発現を RT-PCR で解析した．続いて，神経細胞分化に伴い高発現した酵素をノックダウンさせ，酵素活性測定，神経分化マーカーの遺伝子・タンパクの発現や形態学的・機能的変化を検討した．【結果】P19C6 細胞が神経細胞に分化するのに伴い，数種類のリゾリン脂質アシル転移酵素群の遺伝子発現が増加した．神経分化に伴い高発現した LPEAT1（リゾホスファチジルエタノールアミントランスフェラーゼ 1）をノックダウンさせた P19C6 細胞で，神経分化マーカーの遺伝子発現とタンパク発現が減少し，神経突起伸張の抑制が認められた. また, P19C6 細胞を神経細胞に分化させた際に発現する電位依存性カルシウムチャネル依存性の細胞内カルシウムの上昇が抑制された．【考察】リゾリン脂質アシル転移酵素の一つである LPEAT1 が，神経細胞分化に伴い増加し，神経突起の安定性と神経機能の維持に影響している可能性があることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The role of lysophospholipid acyltransferases in neuronal differentiation

○Tabe S[1,2]，Hikiji H[3]，Ariyoshi W[1]，Okinaga T[1]，Nishihara T[1]

[1]Div Infect and Mol Biol, Kyushu Dent Univ
[2]Div Oral and Maxillac Surg, Kyushu Dent Univ
[3]Dept Oral Func Management, Kyushu Dent Univ

［Purpose］Lysophospholipid acyltransferases（LPLATs）, which are involved in the diversity and asymmetry of the fatty acid composition of glycerophospholipids in biological membrane, have been recently discovered. In the present study, we examined the role of these enzymes in the neuronal differentiation.［Materials and methods］P19C6 cells, which were derived from murine embryonic tumor cells, were differentiated into neuronal cells. Gene expression of LPLATs in these cells was analyzed by RT-PCR. Subsequently, gene and protein expression of neuronal differentiation markers, and the morphological and functional changes were analyzed in cells transfected with LPLAT siRNA during neuronal differentiation.［Results］Gene expression of one of LPLATs, lysophosphatidylethanolamine transferase 1（LPEAT1）was enhanced during neuronal differentiation. Knockdown of LPEAT1 decreased gene and protein expression of the neuronal differentiation markers, and inhibited neurite outgrowth and the action of voltage-dependent calcium channels.［Conclusion］LPEAT1 expression was enhanced during neuronal differentiation, suggesting that this enzyme may play a meaningful role in the maintenance of morphology and function of neuron.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-1　鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）の分子形態学的解析

○武藤　麻未[1]，木村　俊介[2]，吉沢　早織[1]，岩永　敏彦[2]，飯田順一郎[1]

[1]北大　院歯　矯正
[2]北大　院歯　解剖　組織

マウスの鼻腔奥には鼻咽頭関連リンパ組織-nasopharynx associated lymphoid tissues（NALT）が存在する．NALT はヒトのワルダイエル咽頭輪に相当し口腔，上気道の免疫応答の制御に働く．リンパ濾胞を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し，抗原を取り込みリンパ球へと受け渡す．このような粘膜免疫応答の開始の仕組みは NALT と同等の器官である腸管パイエル板で主に研究が進められてきた．しかしながら口腔と上気道における解析は進んでいない．そこで本研究では NALT における M 細胞の形態的ならびに分子学的解析を行った．その結果 GP2，Tnfaip2 両陽性細胞が NALT M 細胞であること，Tnf スーパーファミリーの一員である RANKL が NALT M 細胞の分化の開始に重要であることを明らかにした．GP2，Tnfaip2 の発現並びに RANKL による分化制御機構は腸管 M 細胞と共通のものであった．本研究は腸管 M 細胞と NALT M 細胞が同種の細胞であることを分子レベルで明らかにした初の報告である．今後，口腔や鼻咽頭における抗原物質の上皮透過機構を理解する上で重要なものとなると予想される．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Morphological and molecular characterization of microfold cells in nasopharynx-associated lymphoid tissue

○Mutoh M[1]，Kimura S[2]，Yoshizawa S[1]，Iwanaga T[2]，Iida J[1]

[1]Dept Ortho, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Lab Histo Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent

Mouse nasopharynx（or nasal）-associated lymphoid tissue（NALT）located at the base of the nasal cavity is a site for induction of mucosal immune responses against airway antigens. The follicle-associated epithelium（FAE）covering the luminal surface of NALT is characterized by the presence of microfold cells（M cells）. M cell is a specialized epithelial cell that delivers luminal antigens to lymphocytes underneath epithelium. Although recent studies are uncovering the molecular aspects of M cell in intestinal Peyer's patch, little is known about NALT M cell. Here, we show that NALT M cells express glycoprotein 2（GP2）, Tnfaip2, Spi-B and Ccl9, which are fundamental molecules of Peyer's patch M cell. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（RANKL）is a strong inducer of M cells in the intestine. We found that RANKL is expressed by stromal cells underneath NALT FAE, and RANKL administration increased the number of M cells, suggesting that RANKL regulates the differentiation of NALT M cell. Mouse NALT is considered as an equivalent of human Waldeyer's ring. Our research will contribute to understanding mucosal immune responses in the nasopharynx and nasal cavity.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-2 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤

○吉本　怜子[1]，合島怜央奈[2]，吉住　潤子[3]，木附　智子[3]，檀上　　敦[4]，山下　佳雄[4]，城戸　瑞穂[5]

[1]九大　院歯　歯周病，[2]佐賀大　医　組織　神経解剖，[3]九大　院歯　顔面口腔外科，[4]佐賀大　医　歯科口腔外科，[5]九大　院歯　分子口腔解剖

【目的】シェーグレン症候群(SS)患者は，眼球および口腔乾燥症状を主訴とするが，中には，臨床的に唾液減少が認められないにも拘わらず，口腔内の痛覚過敏を訴える者が存在する．これまでSSについては，唾液腺の障害についての研究が多いが，粘膜上皮に着目し組織学的な検討を行った研究は見当たらない．私たちは，SS患者の生検病理組織検査において粘膜上皮内に水腫性変性が散在することに着目し，唾液腺の障害のみならず，粘膜上皮組織における障害が病態に影響を与えている可能性を考え，免疫系細胞浸潤と唾液腺病変の関連および他の臨床的データとの関係を解析した．【方法】九州大学の倫理委員会の承認の下，SS患者の口唇腺生検の余剰組織のHE染色を行った．さらに上皮細胞の細胞間接着や細胞骨格制御に関わる事が知られているカルシウムイオンチャネルTransient Receptor Potential Vanilloid 4（TRPV4）およびマクロファージなどの炎症性細胞について免疫染色を行った．対照群として粘液嚢胞患者の組織を用いた．【結果と考察】SSと診断された患者の口唇粘膜上皮には水腫性変性が散在し，上皮内および上皮下結合組織には多数のマクロファージ浸潤が認められた．マクロファージの上皮層内への浸潤数は口腔内乾燥感や灼熱感のある群で有意に多かった．サクソンテストによる刺激唾液の量と水腫性変性の頻度とは相関が認められなかったことから，粘膜の乾燥に起因する現象ではないことが示唆された．また，マクロファージは口唇腺組織にも浸潤を認めたことから，粘膜上皮の変性は唾液腺病変と関連している可能性がある．さらに，TRPV4発現は粘膜上皮全層に認められたが，特に正常粘膜上皮の有棘細胞層に顕著であった．さらに，口唇腺にもTRPV4発現が認められた．TRPV4発現は変性部位においては減少していた．TRPV4は細胞間接着の調節や水分子の移動に関与しているとの報告があり，水腫性変性との関連も疑われる．**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Degeneration and macrophage infiltration of labial mucosal epithelium in xerostomia patients

○Yoshimoto R[1]，Aijima R[2]，Yoshizumi J[3]，Kitsuki T[3]，Danjo A[4]，Yamashita Y[4]，Kido M[5]

[1]Dept Periodontol, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ，[2]Dept Anat and Physiol, Saga Med Sch，[3]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ，[4]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Saga Med Sch，[5]Dept Mol Cell Biol and Oral Anat, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ

［Purpose］One of the main features of Sjogren's syndrome is decreased secretion of saliva. However, burning sensation complained by SS patients may not always be associated with reduced saliva. Although there have been accumulating evidences about glandular lesion of SS, reports concerning histological mucosal changes are few. Since we found hydropic degeneration among oral epithelia in biopsy samples from SS patients, we hypothesized that changes in oral mucosa may also affect SS's pathophysiology. ［Materials & Methods］Under the approval of the Kyushu University Institutional Review Board for Clinical Trials and for Human Genome/Gene Research, we obtained labial mucosa from SS and mucocele patients. We analyzed histopathological changes and clinical findings. ［Results & Conclusions］Mucosal epithelium of SS patients showed scattered hydropic degeneration and infiltration of substantial number of macrophages. Intraepithelial macrophage infiltration was prominent in the group of patients complained burning sensation. The increased number of intraepithelial macrophages did not correlate statistically with decreased saliva flow, suggesting that it does not result from oral dryness. Furthermore, mucosal epithelia and labial glands expressed TRPV4, but hydropic degenerated epithelia expressed little. Since TRPV4 is reported to associate with cell-cell adhesion and water efflux, decreased TRPV4 may play a part in epithelial degeneration. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-3 歯髄処置経験を有するヒト乳歯歯根吸収面にみられる破歯細胞の核数について

○八木原　澄[1]，土門　卓文[2]，八若　保孝[1]

[1]北大　院歯　小児障害者
[2]北大　院歯　口腔機能解剖

【目的】乳歯の歯根吸収に関与する破歯細胞は多核の巨細胞であることが知られている．これまでに当教室ではヒト健全乳歯の生理的歯根吸収面にみられる破歯細胞の核数について観察し，その大部分が単核を含む比較的少数の核を有する細胞であることを明らかにしてきた．今回，我々は歯髄処置経験の有無に着目し，歯髄処置後，生理的交換期に至るまで臨床的に症状がなく経過した乳歯の歯根吸収面にみられる破歯細胞の核数について検索した．【方法】北海道大学病院小児・障害者歯科専門外来において，局所麻酔下にて抜去された歯髄処置経験を有する生理的交換期に達した乳歯を，抜去後ただちに10％中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した．破歯細胞の存在を確認するために，アゾ色素法を用いてTRAP染色を行い，実体顕微鏡にて歯根吸収面にTRAP陽性細胞が観察される乳歯を試料とした．試料は5％ EDTA溶液にて4℃，6か月間脱灰し，通法に従い，脱水，パラフィン包埋し，歯根吸収面に対し垂直方向に，厚さ4マイクロメートル間隔で連続切片を作製した．得られた切片はTRAP・メチルグリーン染色後，光学顕微鏡で観察した．【結果】象牙質上に吸収窩を形成し，TRAP陽性を示す200個の破歯細胞の核数を計測した結果，破歯細胞1個当たりの核数の平均値は20.8，中央値は14，最頻値は12であった．また，累積度数分布グラフから，10個以下の核をもつ細胞は全体の36％，50個以下は全体の93％を占めていた．【考察】これまでに我々が報告したヒト健全乳歯歯根吸収面にみられる破歯細胞1個当たりの核数の平均値5.4，中央値5，最頻値3，10個以下の核を持つ細胞の割合は93％という結果と比較し，今回の結果は細胞1個当たりの核数は有意に大きい値を示した．これらの結果から，歯根吸収面にみられる破歯細胞の核数の差異には，歯髄処置経験の有無が一要因として関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The distribution of number of nuclei of odontoclasts in human deciduous teeth with endodontic treatments

○Yagihara S[1]，Domon T[2]，Yawaka Y[1]

[1]Dept Dent for Children and Disabled Persons, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent
[2]Dept Oral Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent

Previously we have revealed that the most of odontoclasts in human deciduous teeth without endodontic treatments have 10 or fewer nuclei. The present study aims to determine the number of nuclei of odontoclasts in human deciduous teeth with endodontic treatments.

After extraction of deciduous teeth of pediatric patients, the teeth were fixed, decalcificated and embedded in paraffin. The specimens were serially sectioned into 4 micrometer sections. The sections were stained with TRAP（tartrate-resistant acid phosphatase）and methyl green and were observed by light microscopy. The number of nuclei in 200 odontoclasts forming lacunae on teeth were observed. The cumulative frequency of number of nuclei of odontoclasts showed that the mean number was 20.8 and the median was 14. Thirty six percent of cells had 10 or fewer nuclei and 93% had 50 or fewer nuclei.

The number of nuclei of odontoclasts in teeth with endodontic treatments showed larger value than that in teeth without endodontic treatments. These results suggest that endodontic treatments may be one of factors of the differences in the number of nuclei of odontoclasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-4 機械的荷重によるインプラント周囲骨のオステオネットワークと生体アパタイトの優先配向の変化

○佐々木宗輝[1]，黒嶋伸一郎[1]，中野　貴由[2]，澤瀬　　隆[1]

[1]長崎大　院医歯薬　インプラント
[2]大阪大　院工　生体材料

［緒言］骨細胞は骨基質中で骨細胞同士や骨芽細胞と細胞性ネットワークを形成し，機械的負荷に対する骨組織の反応をコントロールしている．近年，骨基質中の生体アパタイト結晶の配向性が骨に加わる応力により変化する事が報告された．しかしながら，インプラントを介した応力が骨細胞・骨細管系や生体アパタイト結晶の配向性に与える影響は明らかになっていない．そこで我々はインプラントを介した機械的応力が骨基質に与える影響を明らかにすることを目的に，骨細胞・骨細管系の超微細構造と生体アパタイト結晶の配向性を検索した．［材料と方法］日本白色家兎の脛骨近心端に，陽極酸化された Ti-6Al-4V 合金歯科用インプラントを埋入し，埋入後 12 週から 50N，3 Hz，1800 サイクルの負荷を週に 2 日，8 週間与えた．屠殺後，一塊として摘出されたインプラントと脛骨を浸漬固定後，通法に従いレジン包埋を行った．レジン包埋試料は，走査型電子顕微鏡と微小領域 X 線回折装置による観察を行った．［結果と考察］荷重群では骨細胞数と骨細胞当たりの細胞突起数の増加が認められ，また，インプラント長軸に対する生体アパタイト結晶の優先配向角度が優位に変化した．一方，生体アパタイト結晶の配向性は，非荷重群では骨細胞の長軸と配向性がほぼ一致しているのに対して，荷重群では骨細胞の長軸と配向性が一致していなかった．以上から機械的荷重によって骨細胞・骨細管系が発達する事が認められた．一方，非荷重群で認められた生体アパタイト結晶の配向性と骨細胞との規則性は認められなかったことから，荷重群ではインプラント周囲骨組織が機械的荷重によって活発なリモデリングが行われているものと考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Altered osteocyte network and preferential alignment of biological apatite c-axis around loaded implants in rabbits

○Sasaki M[1]，Kuroshima S[1]，Nakano T[2]，Sawase T[1]

[1]Dept Appl Prosth, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Div Mater and Manu Sci, Grad Sch Eng, Osaka Univ

［Introduction］Osteocyte network plays an important role in responding to mechanical loading. It has been demonstrated that crystallographic orientation of biological apatite（BAp）in bone matrix is associated with mechanical strength of bone. However, the effect of mechanical loading on bone around implant is unclear. The aim of this study was to investigate ultrastructural osteocyte morphology and BAp via loaded implants. ［Materials and Methods］Anodized Ti-6Al-4V alloy dental implants were placed in the proximal tibia metaphysic of rabbits. Twelve weeks after surgery, mechanical loading was applied along the long axis of the implant（50 N, 3 Hz, 1,800 cycles, 2 days/week）. Eight weeks after the initiation of load, bone including implants were dissected. Scanning electron microscopy and microbeam X-ray diffractometer were used to perform the quantitative analyses for osteocyte morphology and crystallographic orientation of BAp. ［Results and Conclusions］In loading group, osteocyte numbers and cell processes were significantly increased. Angle of preferential alignment of BAp to implant long axis was significantly changed. The long axis of osteocyte was consistent with preferential alignment of BAp in control group. Therefore, the lacuno-canalicular system developed by mechanical loading, suggesting that continuous bone remodeling would occur in bone around loaded implants.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-5　シンバスタチンを用いた iPS 細胞凝集体による骨誘導能

○大川　博子[1,2]，河阪　幸宏[1]，新部　邦透[1]，矢谷　博文[2]，江草　　宏[1,2]

[1]東北大　院歯　分子　再生補綴
[2]大阪大　院歯　クラウンブリッジ

**【目的】**本研究の目的は，シンバスタチンを用いて作製した iPS 細胞の石灰化凝集体による骨誘導能を検討することである．**【方法】**マウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞（mGF-iPSCs）を，シンバスタチン含有骨芽細胞分化誘導培地にて 28 日間培養し，骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を RT-PCR 解析および Alizalin Red 染色により評価した．また，骨芽細胞への分化誘導過程においてシンバスタチンが mGF-iPSCs に及ぼす影響を，SSEA-1 および AnnexinV 抗体を用いたフローサイトメトリー解析にて検討した．さらに，GF-iPSCs あるいは GFP 恒常発現マウス iPS 細胞（GFP-iPSCs）の三次元細胞凝集体を作製し，シンバスタチン含有骨芽細胞分化誘導培地にて 30 日間培養後，免疫不全ラット頭蓋骨欠損部へ移植した．移植 28 日後の骨組織再生を，組織切片観察およびマイクロ CT 撮影を用いた画像解析により評価した．**【結果】**シンバスタチンは，mGF-iPSCs の骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を有意に促進した．また，骨芽細胞への分化誘導過程でシンバスタチンは SSEA-1 および AnnexinV 陽性を示す未分化 mGF-iPSCs のアポトーシスを濃度依存的に促進した．シンバスタチンを用いて作製した細胞凝集体の移植部位には腫瘍形成は認めず，皮質骨と同等の骨密度を有する骨組織が形成された．GFP-iPSCs 凝集体を移植した部位に形成された皮質骨には，GFP 陽性と骨細胞マーカーであるスクレロスチン陽性を示す骨細胞を認めた．**【結論】**シンバスタチンは iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導過程で骨芽細胞の分化を促進するとともに未分化な細胞をアポトーシスに誘導することから，iPS 細胞の移植先における腫瘍形成を抑制しながら骨組織再生を可能にすることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Osteoinductivity of iPS cell constructs using Simvastatin

○Okawa H[1,2]，Kosaka Y[1]，Niibe K[1]，Yatani H[2]，Egusa H[1,2]

[1]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent

**Objectives:** To investigate osteoinductivity of the iPS cell（iPSC）constructs which were fabricated using simvastatin. **Methods:** Expression of osteogenic marker genes and mineralized matrix formation of mouse gingival fibroblast-derived iPS cells（GF-iPSCs）during osteogenic induction were evaluated by real-time RT-PCR analysis and Alizarin Red staining. Effects of simvastatin on GF-iPSCs during osteogenic induction were evaluated by flow-cytometry analysis using SSEA-1 and AnnexinV antibodies. Three-dimensional iPSC constructs were fabricated from GF-iPSCs or GFP expressing iPSCs（GFP-iPSCs）, and cultured in osteogenic medium with simvastatin for 30 days. The iPSC constructs were transplanted into the rat calvarial bone defects, and bone formation at the 4th week was assessed by histological and $\mu$CT analyses. **Results:** Expression of osteogenic marker genes and calcification of iPSCs were significantly enhanced by simvastatin. Simvastatin enhanced apoptosis of undifferentiated cells（SSEA-1 and AnnexinV positive cells）during osteogenic induction. Calvarial bone defects were regenerated by the iPSC constructs approximately equivalent to the original calvaria without teratoma formation. GFP- and sclerostin-positive osteocytes were observed in the cortical bone at the transplanted site of GFP-iPSC constructs. **Conclusion:** Simvastatin promotes osteogenic differentiation of iPSCs and apoptosis of undifferentiated cells during osteogenic induction, which may facilitate bone regeneration without tumor formation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-6　骨粗鬆症モデルマウスを用いた下顎骨と脛骨の形態計測

○森田　純晴，小高　研人，笠原　正彰，松永　　智，阿部　伸一

東歯大　解剖

【目的】骨粗鬆症は，骨密度の低下と骨質の劣化により骨強度が低下する疾患と定義されるが，成因は様々である．中でも，原発性骨粗鬆症は閉経後骨粗鬆症や男性骨粗鬆症などに分類されるが，老化や閉経後のホルモン低下は単独では起こらず，しばしば複合的に骨粗鬆症の要因になっていると考えられる．しかし，これらの要因を切り離して考えることは難しく，加齢に伴う骨粗鬆症と閉経後骨粗鬆症の複合発症における病態は不明な点が多く残されている．特に，顎骨は骨粗鬆症の影響を受けにくいといわれているが諸説あるため，他の長管骨と比較，精査する必要がある．そこで本研究では，老化促進モデルマウス P6 系統を用いてそれぞれの骨粗鬆症における単独発症・複合発症モデルを作製し，歯槽骨と脛骨における骨梁構造特性の相違について検討を行った．
【方法】試料として，老化促進モデルマウス P6 系統（SAMP6），コントロールとして R1 系統（SAMR1）を 16 週齢で 10 体ずつ用いた．これらのマウスに卵巣摘出（OVX）を行い，17 週齢で屠殺した群と 20 週齢で屠殺した群に分けた．本研究は，東京歯科大学倫理委員会の承認を受けて行われた（承認番号 260103）．採取した脛骨と下顎骨の試料をマイクロ CT で撮像し，骨形態計測法を用いた解析を行った．
【結果】脛骨の骨形態計測結果は，17 週齢においては SAMR1 に比べ SAMP6 が有意に低く，20 週齢では有意差を認めなかった．一方顎骨では，17 週齢で有意差がなく，閉経後骨粗鬆症が進行した 20 週齢において，SAMP6 が SAMR1 と比較して有意に骨量が低いという結果が得られた．
【考察】有歯顎骨において加齢にともなう骨粗鬆症の発症は軽減されるが，加齢にともなう骨粗鬆症と閉経後骨粗鬆症の複合発症時には，顎骨においても骨密度の低下と骨質の低下をきたし，症状が増悪する可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Morphometric analysis of tibia and mandible in osteoporotic mouse models caused by ovariectomy and senescence-accelerated mice

○Morita S，Odaka K，Kasahara M，Matsunaga S，Abe S

Dept Anat, Tokyo Dent Coll

Recent research on osteoporosis has led to a number of advances in our understanding of its pathophysiology and treatment. However, a consensus is yet to be reached on how osteoporosis affects the jaw. The present study sought to identify changes in the mandibular cancellous bone of osteoporotic mice by assessing the trabecular structure in their mandible and tibia. The senescence-accelerated mouse strain P6（SAMP6）was used as the experimental model, whereas the senescence-accelerated mouse strain R1（SAMR1）served as control. They were received ovariectomy（OVX）in 16 weeks, and sacrificed in 17 weeks and 20 weeks. Bone morphometric analysis was performed by taking a series of micro-computed tomography（micro-CT）scans. As a result, bone volume fraction（BV/TV）in the tibia of the SAMP6 mice aged 17 weeks were significantly lower than those of the SAMR1 mice. Otherwise in 20 weeks, there was no significant difference. In the mandible, there was no significant difference in 17 weeks, but in 20-week-old mice were significantly lower than SAMR1 mice. These findings may suggest that relevant load-bearing teeth protect the alveolar bone structure, but possibility that the symptoms progress when onset postmenopausal osteoporosis and osteoporosis associated with aging at same time.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-7 レクチン様酸化 LDL 受容体-1（LOX-1）欠損は定常状態の破骨細胞形成を促進するが，LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す

○伊東　順太，林田千代美，大山　洋子，佐藤　卓也，羽毛田慈之

明海大　歯　口腔解剖

【背景・目的】歯周病などの炎症性骨破壊を伴う疾患や矯正治療における歯の移動は，局所での炎症に起因し破骨細胞（OC）による骨吸収が増大することで進行する．本研究は生理的骨吸収および炎症性骨吸収に対する酸化脂質受容体 LOX-1 の役割の解明を目的とする．【方法】4～8 週齢の LOX-1 欠損（KO）および野生型（WT）マウスの骨形態計測および sRANKL と M-CSF による *in vitro* OC 形成を行った．更に，*in vivo* の LPS 誘導炎症性骨吸収モデルを用いた炎症性骨吸収に対する LOX-1 の役割を検討した．同時に OC 前駆細胞（OCpre）と分離骨芽細胞（OB）の共存培養系から，炎症性骨吸収への LOX-1 の関与について検討した．【結果・考察】成長期の LOX-1 KO マウス大腿骨では，骨吸収パラメーターの増加に伴い，WT マウスと比較して海綿骨量が減少した．また，LOX-1 KO の sRANKL と M-CSF による *in vitro* の OC 形成は，WT に比べ増加した．これらは LOX-1 KO の OC における細胞融合関連タンパク質 Atp6v0d2 および DC-STAMP の細胞膜での蓄積が WT OC に比べて増加したこととの関連が示唆された．一方，LPS を投与し炎症性骨吸収を誘導すると，LOX-1 KO マウスでは RANKL 発現上昇が WT マウスに比べ低下し，それと並行して骨吸収上昇も低下した．さらに，WT OB と WT OCpre の共存培養において IL-1$\beta$ と $PGE_2$処理で大きく促進した OC 形成は，LOX-1 KO OB と WT OCpre の共存培養で減少した．これと一致して，OB の IL-1$\beta$ と $PGE_2$処理または LPS による RANKL 発現が WT に比べ LOX-1 KO OB で低下した．これらは炎症部位での RANKL 発現が LOX-1 に依存していることを示すと同時に，LOX-1 依存性 RANKL 発現細胞の 1 つとして骨芽細胞が考えられた．【結論】本研究は LOX-1 が定常状態における破骨細胞形成を促進するが，LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示すことを明らかにした．本研究から LOX-1 は生理的破骨細胞形成および炎症性骨吸収のいずれにおいても重要な受容体であることが明らかとなった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Lectin-like ox-LDL receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state

○Ito J，Hayashida C，Ohyama Y，Sato T，Hakeda Y

Div Oral Anat, Meikai Univ Sch Dent

Inflammatory bone diseases are attributed to increased bone resorption by augmented and activated bone resorbing osteoclasts in response to inflammation. The inflammation produces not only diverse proinflammatory cytokines but also reactive oxygen species that modify many biological compounds including lipids. Lectin-like low-density lipoprotein receptor-1（LOX-1）, which is a key molecule in the pathogenesis of multifactorial inflammatory atherosclerosis, was down-regulated with osteoclast differentiation. Here we show that LOX-1 negatively regulates osteoclast differentiation by suppressing the cell-cell fusion of preosteoclasts. Consistently, *LOX-1*-deleted（*LOX-1*$^{-/-}$）mice decreased trabecular bone mass because of the elevated bone resorption. Conversely, when calvaria was inflamed by local lipopolysaccharide（LPS）-injection, the inflammation-induced bone destruction accompanied by the elevated expression of osteoclastogenesis-related genes was reduced by *LOX-1* deficiency. Moreover, the increased expression of RANKL by the inflammation was also abrogated in *LOX-1*$^{-/-}$ mice. Osteoblasts, a major producer of RANKL, also expressed LOX-1. When isolated osteoblasts and osteoclast precursors were co-cultured with proinflammatory agents, IL-1b and prostaglandin $E_2$, the osteoclastogenesis was decreased in the co-culture of *LOX-1*$^{-/-}$ osteoblasts and wild-type osteoclast precursors, in parallel with the down-regulation of osteoblastic RANKL expression. Collectively, LOX-1 abrogation results in resistance to inflammatory bone destruction, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-8 ラット咬筋神経損傷後の三叉神経運動核におけるミクログリアとアストロサイトの動態

○小倉　秀[1,2]，本間　志保[1,3]，脇坂　聡[1]，古郷　幹彦[2]

[1]大阪大　院歯　口腔解剖 1
[2]大阪大　院歯　口腔外科 1
[3]梅花女大　看護保健　口腔保健

末梢神経損傷が様々な感覚・運動障害を引き起こすことは知られている．末梢神経損傷はニューロンだけでなく周囲のグリア細胞にも影響を及ぼすことは近年の研究でも立証され，ニューロンとグリア細胞間，グリア細胞間同士の相互作用が損傷後の機能障害に重要な役割を担っているのではないかと考えられている．本研究では，ラット咬筋神経切断後の三叉神経運動核（Vmo）におけるグリア細胞（ミクログリア，アストロサイト）の動態について検討した．生後 6 週令の SD 系ラットに対し，片側の咬筋神経切断術を施行し，ミクログリアのマーカーとして Iba1，アストロサイトのマーカーとして GFAP を免疫組織化学的に検索した．Iba1 陽性細胞は正常動物では Vmo に均一に認められるが，神経切断後は損傷ニューロンの近くに集積した．損傷後の Iba1 陽性細胞は枝分かれした形状からアメーバ様の形状に変化し，数も増加し，損傷後 3〜5 日で最高値に達し，損傷 28 日にはほぼ正常な状態まで回復した．一方，GFAP 陽性細胞は正常動物の Vmo ではまばらに存在し，神経切断後から数が増加し損傷 5〜7 日で最大に達した．損傷ニューロン周囲の GFAP 陽性細胞は，正常と比較して細胞突起が長くなっていた．損傷後の Vmo での GFAP 陽性細胞の変化は，損傷 28 日でも認められた．以上の結果より，神経損傷によりミクログリアとアストロサイトは共に形態的変化を引き起こし，それぞれの形態変化には時間差が存在することが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Behavior of microglia and astrocyte in trigeminal motor nucleus following masseteric nerve injury in the rat

○Ogura H[1,2]，Honma S[1,3]，Wakisaka S[1]，Kogo M[2]

[1]Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]First Dept Oral Maxillofacial Surgery, Osaka Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Oral Health Sci, Fac Nursing Health Care, Baika Women's Univ

It is known that peripheral nerve injury causes various sensory and motor dysfunctions. Evidences are accumulating that peripheral nerve injury damages not only neurons but also surrounding glial cells, indicating neuronal-glial and glial-glial interactions may play important roles for injury-evoked dysfunctions. In the present study, we examined the behavior of glial cells in the trigeminal motor nucleus following transection the masseteric nerve（MassNx）in the rat. Unilateral MassNx was applied to 6-week-old Sprague-Dawley rats, and immunohistochemistry for Iba1, a marker for microglia, and GFAP, a marker for astrocyte, was performed. Iba1-immunoreactive（-IR）microglia were evenly distributed in the normal animals, and accumulated near the injured neurons following MassNx. They changed their morphology from ramified type to ameboid type, and increased in number, reaching the maximal level at 3-5 days following injury, and returned almost normal at 28 days post-injury. GFAP-IR astrocytes were found sparsely in the normal animals, and their number increased after transection with a maximal level around 5-7 days. GFAP-IR astrocytes around the injured neurons extended their processes. These changes were observed even 28 days after MassNx. The present results indicate that peripheral injury evoked the morphological changes in both microglia and astrocytes under different time course.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-9　ラット口腔顔面領域における TRPM8 陽性神経線維の分布

○矢島　健大[1]，佐藤　　匡[2]，市川　博之[2]

[1]東北大　院歯　歯科保存
[2]東北大　院歯　口腔器官構造

【目的】Transient receptor potential melastatin-8（TRPM8）は感覚神経節の小型ニューロンに存在し，8～25℃の冷刺激やメントール刺激で活性化し，冷覚や痛覚をもたらす．舌や咽頭などに分布していることが知られているが，その他口腔顔面領域での分布は詳しく知られていない．本研究では，口腔顔面領域における TRPM8 の分布について分析した．
【材料と方法】歯肉，口蓋，切歯乳頭，口唇，歯根膜，顎関節，大唾液腺，咀嚼筋について TRPM8 の免疫染色を行った．痛覚の伝達に関与する calcitonin gene-related peptide（CGRP）の免疫染色も行い比較すると共に，TRPM8 と CGRP との蛍光二重免疫染色を行った．また TRPM8 陽性神経線維の由来を知るため，逆行性トレーサーである Fluorogold（FG）を歯肉と切歯乳頭に注入し，三叉神経節における TRPM8 と CGRP の関係を調べた．
【結果】歯肉，切歯乳頭，口蓋粘膜，口唇では TRPM8 陽性神経線維が認められた．歯肉では外縁上皮や歯肉稜で豊富に認められた．一方，CGRP 陽性神経線維は付着上皮で豊富に観察された．切歯乳頭では上皮や味蕾に TRPM8 や CGRP を含む神経線維が存在していた．歯根膜，顎関節，大唾液腺，咀嚼筋においては CGRP 陽性神経線維のみ観察された．分析した全ての組織において TRPM8 と CGRP との共存は認められなかった．FG を用いた実験により，歯肉や切歯乳頭で TRPM8 陽性神経線維は，三叉神経節の小型ニューロン由来であることが明らかとなった．
【考察】TRPM8 陽性神経線維は歯肉・口蓋・口唇に認められ，これらは三叉神経節由来であることが示唆された．三叉神経系において，CGRP は外部受容器と内部受容器に発現し，TRPM8 は外部受容器にのみ発現すると考えられる．さらに TRPM8 は口腔粘膜や顔面皮膚からの冷刺激・侵害刺激・化学的刺激の伝達に関与することが推測された．
【会員外共同研究者】齋藤正寛・島内英俊（東北大）細川浩（京都大）近藤照義（九州保健福祉大）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures

○Yajima T[1]，Sato T[2]，Ichikawa H[2]

[1]Div Operative dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Transient receptor potential melastatin-8（TRPM8）is a cold and menthol receptor which is located in the sensory ganglia. In the trigeminal ganglion, many small neurons contain TRPM8. In this study, immunohistochemistry for TRPM8 was performed on oral and craniofacial structures to know distribution and function of TRPM8 in the trigeminal sensory system. TRPM8-immunoreactive（-IR）nerve fibers were abundant in the gingiva and incisive papilla. In the gingiva, TRPM8-IR nerve endings were detected beneath and within crestal and outer epithelia. However, only a few TRPM8-IR nerve fibers were detected in junctional or sulcular epithelia. In the incisive papilla, TRPM8-IR nerve fibers were located beneath and within taste buds. TRPM8-immunoreactivity was also expressed by some taste bud cells in the papilla. Lips, periodontal ligaments and salivary glands as well as masticatory muscles and temporomandibular joints were mostly devoid of TRPM8-IR nerve fibers. Double immunofluorescence study indicated different distribution patterns of nerve fibers containing TRPM8 and calcitonin gene-related peptide in all the examined tissues. In addition, retrograde tracing method indicated that TRPM8-IR nerve fibers in the gingiva and incisive papilla originate from small sensory neurons in the trigeminal ganglion. TRPM8 may be correlated to cold, nociceptive and chemoreceptive transmission in the oral mucosa.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-10 p46JNK2の構成的活性は脂肪分化前期におけるC/EBPδの発現に必須である

○楠山　譲二[1,2]，坂東健二郎[3]，大西　智和[2]，仙波伊知郎[1]，松口　徹也[2]

[1]鹿児島大　院医歯　口腔病理，[2]鹿児島大　院医歯　口腔生化，[3]明海大　歯　口腔生物再生医工

【目的】我々はこれまでにMAPKファミリー分子に属するキナーゼであるJNK（c-jun N-terminal kinase）が，骨芽細胞の分化後期に重要な役割を果たすことを報告した．しかし脂肪分化におけるJNKの機能については不明な点が多い．そこでJNKの脂肪分化における役割とその分子メカニズムについて解析を行った．【方法と結果】マウス脂肪前駆細胞株3T3-L1およびC57BL/6マウス由来間葉系幹細胞の両系を，脂肪分化培地（インスリン，デキサメタゾン，IBMX含有）にて分化誘導し，JNK活性を評価したところ，JNKのリン酸化レベルは脂肪分化前期に高く維持されていた．また分化前期にJNK阻害剤を施すと，脂肪分化開始に重要な転写因子であるC/EBPδの発現度が特異的に抑制され，脂肪滴形成や脂肪分化マーカー遺伝子であるFabp4やPPARγ2の発現は減少した．しかし分化後期においては，JNK阻害剤による分化への影響は認められなかった．またJNK特異的フォスファターゼであるDUSP16のノックアウトマウス由来間葉系幹細胞を脂肪分化誘導すると，野生型に比較して分化度が亢進した．次に脂肪分化におけるATFファミリー分子の機能を解析したところ，分化前期に発現が高いATF2と，分化後期に発現が上昇するATF4がJNKによる発現調節を受けていた．特にATF2はC/EBPδのプロモーター領域の-1849～-1840に存在するATF結合部位を介して，JNKシグナルによるC/EBPδの転写制御を担うことが分かった．更に脂肪前駆細胞にはJNK1/2およびp46/p54の4つの異なったアイソフォームが発現しており，各アイソフォームのTet-on発現誘導システムとsiRNAによるノックダウンを用いた解析によって，p46JNK2が脂肪分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった．【結論】p46JNK2シグナルの構成的活性は，ATF2を介しC/EBPδの発現を上昇させることで，脂肪分化の開始に重要な役割を果たしている可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Constitutive activation of p46JNK2 is indispensable to induce the C/EBPdelta expression in the initial stage of adipogenic differentiation

○Kusuyama J[1,2], Bandow K[3], Ohnishi T[2], Semba I[1], Matsuguchi T[2]

[1]Dept Oral Pathol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [3]Dept Oral Biol and Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent

We previously reported that JNK (c-jun N-terminal kinase) activity is essential for the late stage differentiation of osteoblasts. However, the role of JNK in adipogenesis is not fully understood. In this study, we found that the adipogenic differentiation, represented by lipid droplet appearance and the gene expression of Fabp4 and PPARgamma2, was inhibited by JNK inactivation in 3T3-L1, mouse adipo-progenitor cell line, and mesenchymal stem cells isolated from C57BL/6 mice. JNK inhibition specifically suppressed the gene expression of C/EBPdelta, which is crucial transcriptional factor in the initial stage of adipocyte differentiation. In contrast, JNK inactivation did not affect later differentiation events. Conversely, enhanced lipid droplet appearance was observed by inducible overexpression of p46-JNK2 in an isoform-specific manner. Primary adipoblasts derived from DUSP16, a JNK-specific phosphatase, knockout mouse exhibited the promotive effect on the adipogenesis. The expressions of ATF2, highly induced in early stage of adipogenic differentiation and ATF4, gradually induced in late stage, were regulated by JNK activation. Notably, transcriptional control of C/EBPdelta through JNK signaling was mediated by ATF2 binding to -1849/-1840 of the C/EBPdelta promoter region. Our study demonstrated that constitutive activation of p46JNK2-ATF2 is indispensable to induce the C/EBPdelta expression in the initial stage of adipogenic differentiation. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-11 進行性骨化性線維異形成症(FOP)の ALK2 変異体の活性化機構における FKBP12 と BMPII 型受容体の役割

○町谷亜位子[1,2]，藤本　舞[1,2]，須田　直人[2]，片桐　岳信[1]

[1]埼玉医大　ゲノム　病態生理
[2]明海大　歯　矯正

[目的]進行性骨化性線維異形成症(FOP)は，全身の骨格筋組織内に異所性骨化を生じる稀な遺伝性疾患である．FOP の異所性骨化は，BMP に対する I 型受容体 ALK2 の細胞内ドメインのアミノ酸変異で発症する．FOP の異所性骨化は筋損傷によって惹起されることから炎症反応や免疫応答に関わる分子が変異 ALK2 の活性化に関与すると考えられている．免疫抑制剤 FK506 の結合タンパク質である FKBP12 は，細胞内で I 型受容体と結合し，シグナル伝達を抑制する．FOP の変異 ALK2 は，立体構造の変化により FKBP12 との親和性が低下することで活性化される可能性が提唱されている．そこで本研究では，FKBP12 との結合ドメインが変異した ALK2 変異体を用いて，FKBP12 による ALK2 の活性調節機構について解析を行った．[方法・結果]95%以上の FOP 患者が有する典型的な ALK2 の R206H 変異体と，FKBP12 との結合部に変異を有する P197_F198del_insL 変異体の活性に対する FKBP12 の影響を検討した．R206H 変異体が誘導する BMP 活性(リン酸化 Smad1/5，BMP 特異的ルシフェラーゼレポーター活性，および ALP 活性の誘導)は，FKBP12 との共発現で抑制された．一方，P197-F198del_insL 変異体が誘導する BMP 活性は，FKBP12 によってほとんど抑制されなかった．R206H 変異体と FKBP12 の結合は，野生型 ALK2 よりも弱く，P197_F198del_insL 変異体ではほとんど結合しなかった．II 型 BMP 受容体で変異 ALK2 を活性化した場合，FKBP12 の共存下でも抑制は見られなかった．[考察]FKBP12 は ALK2 の活性を抑制し，結合ドメインに変異を有する P197_F198del_insL 変異体では抑制が解除された．しかし，P197_F198del_insL 変異体を有する FOP 症例も，典型的 FOP 症例と同様に筋損傷後に異所性骨化を生じた．これは，FOP の異所性骨化に FKBP12 以外の機序が関与することを示唆する．II 型受容体は，FKBP12 存在下でも両 ALK2 変異体を活性化したことから，II 型受容体による活性化が FOP の異所性骨化に重要と考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Roles of FKBP12 and BMP typeII receptors in BMP signaling by mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva（FOP）

○Machiya A[1,2]，Fujimoto M[1,2]，Suda N[2]，Katagiri T[1]

[1]Div Pathophysiol, Res Center for Genomic Med, Saitama Med Univ
[2]Div Orthod, Dept Human Development and Fostering, Meikai Univ Sch Dent

Fibrodysplasia ossificans progressiva（FOP）is a rare hereditary disorder characterized by postnatal progressive heterotopic ossification（HO）in skeletal muscle. FOP is caused by gain-of-function mutations of ALK2, which is a type I BMP receptor. Because acute HO is induced by muscle trauma in FOP, inflammatory reactions and immune responses are suggested to be involved in the HO. FKBP12, a binding protein of an immunosuppressor, FK506, represses BMP signaling via direct binding to the type I receptors. It was suggested that the mutant ALK2 responsible for FOP activate intracellular signaling due to a decrease in the binding affinity to FKBP12 by the mutations. In the present study, we examined a role of FKBP12 in the activation of ALK2. FKBP12 bound to a typical mutant ALK2 in FOP, R206H, and suppressed its activity. In contrast, FKBP12 showed neither binding to P197-F198del_insL, nor inhibition of its activity. Co-expression of type II BMP receptors activated both mutants ALK2 even in the presence of FKBP12. Our findings suggest that BMP type II receptors cancel the FKBP12-dependent inhibition of ALK2 and activate the mutant ALK2 to induce HO in FOP.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-12 Zolerdronic acid は TGF-β 刺激による歯肉線維芽細胞の受容体発現に伴う Smad- 経路を介した線維化機構を阻害する

○小松ゆう子[1,2]，衣斐　美歩[3]，帖佐　直幸[2]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，杉山　芳樹[1]，石崎　明[2]

[1]岩医大　歯　口外
[2]岩医大　歯　生化
[3]岩医大　薬　分子細胞薬理

【目的】悪性腫瘍の骨転移および種々の骨疾患に対し zoledronic acid（ZA）に代表される bisphosphonates（BPs）は広く用いられている．一方で，BPs 投与を受けている患者が歯科治療を契機に骨髄炎様症状を生じたとの報告が相次ぎ，BPs-related osteonecrosis of the jaw（BRONJ）と呼ばれている．しかしながら，BRONJ の病態発現における分子メカニズムは未だ不明である．そこで，我々は ZA 投与による TGF-β1 刺激による創修復に関与する線維化への影響を検証することを目的とした．
【方法】歯肉線維芽細胞（HGFs）を用い，ZA の影響を検証するために，TGF-β1 刺激による筋線維芽細胞への分化および，細胞遊走能について評価した．
【結果と考察】 我々の実験において，BPs の臨床投与時の血中濃度に準じた薬剤濃度下で，TGF-β1 刺激時の 1）筋線維芽細胞のマーカー発現の減少，2）細胞遊走能の減弱，3）MCP-1 発現の低下，が得られた．この結果より，ZA は TGF-β1 刺激による HGFs の線維化機構において，TGF-β タイプⅠレセプターの発現に伴う Smad-　経路を介した細胞内シグナル伝達経路に作用することが示唆された．我々の研究により示された新たな BPs の作用点は，BRONJ 治療における分子ターゲットを模索する一助となると考えられる．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Zolerdronic acid suppresses TGF-β-induced fibrogenesis by HGFs through the down-regulation of its receptor expression and inhibition of Smad-dependent signaling

○Komatsu Y[1,2]，Ibi M[3]，Chousa N[2]，Kyakumoto S[2]，Kamo M[2]，Sugiyama Y[1]，Ishisaki A[2]

[1]Div Oral Surg, Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Iwate Med Univ
[2]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ
[3]Div Mol and Cell Pharmacol Sch Pharmaceutical Sci, Iwate Med Univ

***Purpose*** Nitrogen-containing bisphosphonates（BPs）as zoledronic acid（ZA）is used for the widespread treatment of cancer bone metastasis. However, patients who have received ZA are recently suffered from the BP-related osteonecrosis of the jaw（BRONJ）. Here, we investigated how ZA at Cmax affects the TGF-β1-induced signal transduction, and fibrogenic activity of Human gingival fibroblasts（HGFs）.
***Materials & Methods*** We evaluated whether ZA affects the TGF-β1-induced myofibroblast differentiation of HGFs and their own migratory activity.
***Results & Conclusion*** We found that ZA at Cmax significantly suppressed 1）the TGF-β1-induced expressions of myofibroblasts markers, 2）the TGF-β1-induced their own migratory activity, and 3）expression of MCP-1 which are critical for the progression of fibrogenesis. Thus, ZA suppresses the TGF-β1-induced fibrous tissue formation by HGFs through the down-regulation of TGF-β type I receptor expression and the resultant inhibitions of the Smad-dependent signal transductions. Our findings provide new insights into the finding out of drug targets at molecular level for the treatment of BRONJ.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-13 BHD 複合体分子 FNIP2 タンパクの量的制御機構は mTORC シグナル活性を制御する

○永嶌　勝之[1,2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，緒方佳代子[1]，長岡　良礼[1,2]，岡部　幸司[1]

[1]福歯大　院歯　生理
[2]福歯大　院歯　口腔外科

【目的】Fibrofolliculoma，腎腫瘍，肺嚢胞の 3 徴が知られる Birt-Hogg-Dube（BHD）症候群は，頭頸部では多発性皮膚丘疹を呈する常染色体優性の遺伝性疾患である．近年，BHD 症候群の原因分子群として FLCN，FNIP1 および FNIP2/MAPO1 から構成される BHD 複合体が同定された．BHD 複合体は癌抑制遺伝子として知られ，腫瘍形成に重要な AMPK や mTOR 等のエネルギー代謝シグナルの活性への関与が示唆されているが，その分子メカニズムは不明である．今回我々は，その分子制御機構を明らかにするために，栄養状態の変化における BHD 複合体と mTORC 活性の関係に着目し検討を行った．【方法と結果】1）細胞を栄養飢餓で培養すると，mTORC シグナルの不活性化と共に BHD 複合体のうち FNIP2 の経時的上昇が認められた．栄養飢餓後のアミノ酸刺激により mTORC シグナルの活性化と共に FNIP2 の発現は減少した．2）この FNIP2 発現の変化はユビキチン-プロテアソーム経路の Skp1-cullin-F-box 型（SCF）ユビキチンライゲース（b-TRCP）により制御されていた．3）$SCF^{b-TRCP}$の抑制により，FNIP2 の発現は安定化すると共に，mTORC シグナルは抑制された．また，FNIP2 発現の抑制は mTORC シグナルを活性化した．4）細胞が栄養飢餓状態になると，FNIP2 発現と共に FLCN がリソソームに局在し，逆にアミノ酸刺激により FNIP2 発現が減少すると mTOR のリソソームへの局在が認められた．【考察】以上の結果から，アミノ酸刺激により FNIP2 が分解され BHD 複合体のリソソームへの結合能が減弱すると，mTOR がリソソームに誘導され mTORC1 シグナルが活性化されることが示唆された．今後は本分子モデルの腫瘍形成における役割について明らかにしていきたいと考えている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Birt-Hogg-Dube（BHD）complex play critical roles in energy state dependent mTOR activition by triggering the b-TRCP- and CK1a-Dependent Degradation of FNIP2

○Nagashima K[1,2]，Fukushima H[1]，Okamoto F[1]，Ogata K[1]，Nagaoka Y[1,2]，Okabe K[1]

[1]Sec Cell Physiol, Dept Physiological Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll
[2]Sec Oral Surg, Dept Oral Maxillofacial Surgery, Fukuoka Dent Coll

Birt-Hogg-Dube（BHD）syndrome is a genetic disorder that can cause susceptibility to kidney cancer, renal and pulmonary cysts, and fibrofolliculomas in head and neck area. Folliculin（FLCN）and FLCN-interacting proteins 1 and 2（FNIP1, FNIP2）are identified as the BHD complex for tumor suppressor in kidney cancer and its dis-function is found in BHD syndrome. Recent studies indicating the critical signal competition between loss of BHD complex function and elevated mTOR signaling pathway activity are found in human cancers. However, the competing molecular mechanism how the mTOR signaling pathway is regulated by BHD complex remains largely elusive. In this study, we found the protein stability of FNIP2 is regulated by $SCF^{b-TRCP}$ and its regulation mechanism is critical for mTOR signaling activity. FNIP2 phosphorylation by CK1 in response to amino acid stimulation generates a phosphodegron that binds b-TRCP. Failure to degrade FNIP2 leads to reduced mTOR activity, reduced S6 kinase activity, and reduce the cell growth. This work expands the current understanding of mTOR regulation by revealing a negative feedback loop involving BHD complex and energy state dependent turnover of FNIP2 proteins, suggesting that mis-regulation of the FNIP2 destruction pathway might contribute to aberrant activation of mTOR in diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-14　ブタ乳歯歯根周囲組織に存在する TGF-β の作用

○島崎　絵美[1]，唐木田丈夫[2]，大井田新一郎[2]，朝田　芳信[1]，山越　康雄[2]

[1]鶴見大　歯　小児歯科
[2]鶴見大　歯　生化

永久歯交換前の乳歯の生理的歯根吸収には破歯細胞が関与しているが，この細胞の産生機序についてはまだ不明な点が多い．【目的】我々は，乳歯歯根周囲組織における生理活性物質の分離精製，同定および in vitro での破歯細胞分化誘導実験を行い，生理的歯根吸収における調節機構を解明することを試みた．【方法】生後約 5ヶ月のブタより歯根吸収の見られる第一乳切歯と非吸収の第一乳切歯を摘出し，歯頸部から根尖部を 3 つの領域（R1～R3）に切断したものを硬組織粉砕機にて粉砕し試料とした．各資料をグアニジン溶液にて抽出を行い，得られたタンパク抽出物（R1-G, R2-G, R3-G 画分）についてタンパク質およびプロテアーゼの分布の相違を調べた．また各画分中に含まれるヒト歯根膜由来培養細胞（PDL 細胞）に対してアルカリホスファターゼ活性を上昇させる生理活性物質を同定した．さらにマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いて破歯細胞への分化誘導実験を行い，TRAP アッセイにて分析を行った．【結果および考察】吸収乳切歯および非吸収乳切歯から得られた R1-G, R2-G, R3-G 画分の電気泳動像には差が見られなかったが，吸収乳切歯では 70kDa 付近のマトリックスメタロプロテアーゼが歯頸部から根尖部にかけて活性が減弱していた．また各画分からは生理活性物質として TGF-β1 が検出され，この活性は非吸収乳切歯よりも吸収乳切歯の R1-G, R2-G，画分で高く，歯根吸収が最も行われている吸収乳切歯の R3-G 画分では著しく低下していた．さらに破歯細胞分化誘導実験においても，吸収乳切歯 R3-G 画分が著しく TRAP 活性が低下していた．以上のことから，吸収乳切歯歯頸部では TGF-β1 による破歯細胞への分化促進が起こり，根尖部では分化が起きにくいことが考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Action of TGF-beta 1 in root-surrounding tissues of porcine milk teeth

○Shimazaki E[1]，Karakida T[2]，Oida S[2]，Asada Y[1]，Yamakoshi Y[2]

[1]Dept Pediatr Dent, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

Odontoclast is involved in the physiological root resorption of milk teeth, although it is unclear about its production mechanism. Our objectives: are（1）to identify the bioactive substance in root-surrounding tissues of milk teeth, and（2）to elucidate its role for the production of odontoclast. Methods: Porcine milk teeth with or without the root resorption were surgically extracted and separated three regions（R1-R3）from tooth cervical area to apical area. Each of samples was extracted with guanidine（R1-G, R2-G and R3-G）after pulverizing and characterized by SDS-PAGE. The ability of each sample to enhance alkaline phosphatase activity was assayed in human periodontal ligament cells. Furthermore, the odontoclastic differentiation potency of each sample in RAW264.7 cells was determined by TRAP assay. Results: No significant differences were observed on SDS-PAGE. TGF-β1 was identified as the bioactive substance in all samples. Comparing with the milk teeth without root resorption, the TGF-β1 activity was increased in R1-G and R2-G of the milk teeth with root resorption. In contrast, the TGF-β1 activity in R3-G was remarkably decreasing as well as TRAP activity. Conclusion: The present study suggests that the differentiation induction into odontoclast occurs at tooth cervical area, but not much at apical area.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-15　ブタ歯髄および象牙質中の TGF-β1 の存在様式について

○丹羽　堯彦[1]，山本　竜司[2]，山川駿二郎[3]，長野　孝俊[1]，大井田新一郎[2]，五味　一博[1]，山越　康雄[2]

[1]鶴見大　歯　保存Ⅱ
[2]鶴見大　歯　生化
[3]鶴見大　歯　保存Ⅱ

象牙質には細胞分化増殖因子であるトランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF-β1）が含まれていることが知られているが，その存在様式については明らかにされていない．【目的】我々は歯髄および象牙質中の TGF-β1 の遺伝子発現，活性化，タンパク質相互作用を明らかにすることを試みた．【方法】生後約 5 か月のブタ永久第二大臼歯歯胚を取り出し，歯髄および象牙芽細胞から total RNA を調製して TGF-β1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて調べた．さらに歯髄からタンパク質を抽出し，ヘパリンクロマトグラフィー（HC）にて分離した．また，臼歯はエナメル質を削り取った後，象牙質を硬組織粉砕機にて粉末試料とし，この試料に対してギ酸-塩酸で脱灰を行い，脱灰不溶物に対して酢酸-食塩溶液（AN），トリス-食塩溶液，グアニジン溶液を用いて連続的にタンパク質を抽出した．歯髄および象牙質から得られた各画分より TGF-β1 活性を検出し，相互作用をしているタンパク質を特定した．さらに潜在型 TGF-β1 の活性化に関与する象牙質中のプロテアーゼを調べた．【結果および考察】歯髄および象牙芽細胞共に TGF-β1 の遺伝子発現が認められた．歯髄から HC にて得られた 5 つのタンパク画分（P1-P5）のうち 100 mM NaCl にて溶出される P3 画分に TGF-β1 活性が検出され，この画分には象牙質シアロタンパク質（DSP）が多く含まれていた．また象牙質試料では AN 画分中に TGF-β1 活性が検出され，この画分中に含まれる DSP および象牙質リンタンパク質（DPP）の溶出パターンに一致していた．さらに潜在型 TGF-β1 は象牙質中のエナメリシン（MMP-20）によって活性化されることが判明した．このことより TGF-β1 の活性化には MMP-20 が関与し，TGF-β1 の活性維持には DSP 及び DPP が関与していることが考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## TGF-beta 1 in porcine pulp and dentin

○Niwa T[1]，Yamamoto R[2]，Yamakawa S[3]，Nagano T[1]，Ooida S[2]，Gomi K[1]，Yamakoshi Y[2]

[1]Dept Perio, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[3]Dept Endo, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

The transforming growth factor-β1（TGF-β1）is resident in the dentin extracellular matrix, although its function is unclear. Our objectives are（1）to investigate the expression of TGF-β1 gene,（2）to characterize proteins interacting with TGF-β1,（3）and to find the activator for TGF-β1, in pulp and dentin. Methods: Pulp tissue, odontoblasts and dentin samples were prepared from developing pig incisors. The expression of TGF-β1 gene in pulp and odontoblasts was evaluated by a quantitative real-time PCR. Fractions containing TGF-β1 in pulp tissue were isolated by Heparin chromatography testing for alkaline phosphatase-stimulating activity in human periodontal cells（ALP-HPDL system）. Dentin sample containing TGF-β1 was extracted with an acetic acid/NaCl（AN extract）after the demineralization. TGF-β1-binding proteins in AN extract were purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography（RP-HPLC）. For activation experiment, a recombinant latent-TGF-β1 was incubated with dentin proteases and characterized by ALP-HPDL system. Results and Discussion: The expression of TGF-β1 gene was detected in both pulp and odontoblasts. TGF-β1 in pulp was coeluted with DSP by Heparin chromatography. In dentin sample, the trace amount of TGF-β1-bound-DSP and -DPP was purified. The latent-TGF-β1 was activated by MMP-20 in dentin. These findings suggest that TGF-β1 interacts with DPP and DSP after the activation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-16 ブリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略―唾液浸漬モデルによる検討―

○飯塚　純子[1]，谷口　紀江[2]，高垣　裕子[3]，向井　義晴[1]

[1]神奈川歯科大　う蝕制御修復，[2]神奈川歯科大　放射線応用，[3]神奈川歯科大　院歯

【目的】白斑病巣には唾液由来のタンパク質等の有機物が侵入し，それらが再石灰化の進行を妨げている可能性が指摘されている．本研究では，エナメル質表層下脱灰病巣に安静時唾液を浸透し白斑病巣を再現した後ブリーチングを施し，その後再石灰化を行いブリーチング剤の再石灰化促進効果を Transversal Microradiography（TMR）にて評価した．【材料と方法】ウシエナメル質片を研磨，試験面を規定し 5 群に分けた．1）D 群：エナメル質片を脱灰緩衝液に 37 ℃で 10 日間浸漬して表層下脱灰病巣を作製した．2）DS 群：1）と同様の病巣を作製後，氷冷下にて採取した安静時唾液（0.02% NaN3 添加）に 37℃で 28 日間浸漬した．唾液の交換は月・水・金曜日に交換をした．3）DR 群：1）と同様に病巣を作製した後，再石灰化溶液に 37 ℃で 28 日間浸漬した．なお，再石灰化溶液は毎週交換した．4）DSR 群：2）と同様に唾液に浸漬後，再石灰化溶液に浸漬した．5）DSBR 群：2）と同様に唾液に浸漬後，35%過酸化水素を主成分とするオフィスブリーチング剤を適用，その後再石灰化溶液に浸漬した．各群処理後，薄切片を切り出し，TMR 撮影を行った．ミネラルプロファイルからミネラル密度およびミネラル喪失量（IML）を測定した．統計分析は，one-way ANOVA ならびに Tukey の検定（$p<0.05$）を用いた．【結果および考察】D 群では典型的な表層下脱灰病巣が確認でき，DR，DS および DSR 群では，再石灰化は生じていたが DR および DSR 群間に有意差は認められなかった．一方 DSBR 群は DR，DS および DSR 群と比較し有意な IML の減少が認められた．本結果は唾液自体には再石灰化効果はあるが，病巣に侵入するとハイドロキシアパタイトの結晶生長を抑制すること，またそれをブリーチング処理することで結晶周囲の有機質を除去し再石灰化を促進する可能性を示唆した．本実験結果より，オフィスブリーチング剤はホワイトニングを兼ねた再石灰化誘導法となり得ると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Remineralization strategy for enamel subsurface lesions after bleaching therapy―Evaluation using saliva infiltration model―

○Iizuka J[1]，Taniguchi M[2]，Takagaki Y[3]，Mukai Y[1]

[1]Dept Cario Rest, Kanagawa Dent Univ，[2]Dept Radiol Sci, Kanagawa Dent Univ，[3]Div Mol Cell Biol Miner Tissues, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ

Salivary macromolecules infiltrate white/brown spot enamel lesions and adsorb onto hydroxyapatite. Some calcium-binding proteins hinder remineralization of these lesions. We prepared bovine subsurface lesions by acid followed by human saliva. We examined whether bleaching agents can 1）remove salivary components bound to the lesions and 2）induce remineralization.

Our five experimental groups are: baseline lesions immersed in demineralization buffer（D）; D immersed in saliva（DS）; D immersed in remineralization buffer（DR）; DS further immersed in remineralization buffer（DSR）; DS treated with in-office bleaching agent followed by remineralization buffer（DSBR）. Mineral profiles and integrated mineral loss（IML）were analyzed by transversal microradiography. Data were analyzed by one way ANOVA and post-hoc Tukey test（significance set at $p < 0.05$）.

The IMLs of DS, DR and DSR were lower than in D. The IML of DSR was not significantly different from that of DR, whereas that of DSBR was significantly lower than those of other groups. While saliva by itself may remineralize the enamel lesion, salivary proteins penetrating deep into the lesion suppress hydroxy apatite crystal growth and the bleaching treatment removes such proteins and promotes crystal growth.

In-office bleaching agent may be useful in treating enamel lesions for removing proteins bound to the lesions. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-17 IL-1β 誘導オートファジー関連遺伝子 Atg5 は Wnt5 シグナルを介してマウス ES 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する

○檜山　太希[1]，尾関　伸明[1]，山口　秀幸[1]，川合　里絵[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]

[1]愛院大　歯　歯内治療
[2]愛院大　薬　生体機能

**【研究目的】**これまでに我々は，純化 ES 細胞由来象牙芽細胞における Matrix metalloproteinase（MMP）-3 が，IL-1β 誘導 Wnt5 シグナルを介して細胞増殖を制御することを報告した．近年，根尖性歯周炎の進行や加齢化歯髄細胞において，オートファジー関連遺伝子の LC3 や Atg5 の動態変化により，オートファジーの活性化が報告されている．本研究では，炎症時におけるマウス ES 細胞由来象牙芽細胞中の Atg5, LC3 および Atg12 の新規な生理的役割を明らかにするため，各種 siRNA を用いて詳細な検討を行った．**【材料および方法】**純化マウス ES 細胞由来象牙芽細胞に IL-1β を添加し，Real time-PCR 法と Western-blot 法により，オートファジー関連遺伝子群の mRNA ならびにタンパク質発現を評価した．Wnt5, MMP-3, Atg5, LC3 および Atg12 に対する各々の siRNA により，象牙芽細胞の増殖過程に関与するシグナルカスケードの検索を行った．**【結果】**象牙芽細胞において，IL-1β 誘導 Wnt5, MMP-3, Atg5, LC3 および Atg12 の遺伝子発現，タンパク質発現の亢進および，MMP-3 活性上昇が認められた．Wnt5, MMP-3 および Atg5 siRNA 処理により，IL-1β による細胞増殖の抑制とアポトーシス細胞死が惹起された．シグナルカスケードの検索により，IL-1β による細胞増殖は Atg5 → Wnt5 → MMP-3 を介して制御されることが明らかとなった．**【考察および結論】**マウス ES 細胞由来象牙芽細胞における IL-1β 誘導の細胞増殖は，炎症反応の比較的早期にオートファジー関連遺伝子 Atg5 と Wnt5 シグナルを介して誘導された MMP-3 により制御されることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Interleukin-1beta-induced Atg5 regulates the proliferation of mouse embryonic stem cell-derived odontoblastic cells by the Wnt5 signaling pathway

○Hiyama T[1]，Ozeki N[1]，Yamaguchi H[1]，Kawai R[1]，Mogi M[2]，Nakata K[1]

[1]Dept Endo, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent
[2]Dept Medicinal Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ

**Purpose:**We previously established a method for the differentiation of induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells into alpha2 integrin-positive odontoblast-like cells. We also reported that Wnt5 in response to interleukin（IL）-1beta induces matrix metalloproteinase（MMP）-3-regulated cell proliferation in these cells. Our findings suggest that MMP-3 plays a potentially unique physiological role in the generation of odontoblast-like cells under an inflammatory state. Here, we examined whether up-regulation of autophagy-related gene（Atg）5 by IL-1beta was mediated by Wnt5 signaling, thus leading to increased proliferation of odontoblast-like cells. **Materials & Methods :** Real-time PCR, western blotting, an MMP-3 activity assay and cell proliferation were used in this study. **Results:** IL-1beta increased the mRNA and protein levels of Atg5, microtubule-associated protein 1 light chain（LC3）and Atg12. Treatment with siRNAs against Atg5, but not LC3 and Atg12, suppressed the IL-1beta-induced increase in MMP-3 expression and cell proliferation. Our siRNA analyses combined with western blot analysis revealed a unique sequential cascade involving Atg5, Wnt5a and MMP-3, which resulted in the potent increase in odontoblastic cell proliferation. **Conclusion:** These results demonstrate the unique involvement of Atg5 in IL-1beta-induced proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblast-like cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-18　患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立

○小野寺晶子[1]，齋藤　暁子[1]，篠-落合　宏美[1]，大高真奈美[4]，大木　章生[2]，長谷川大悟[3]，柴原　孝彦[3]，末石　研二[2]，中西　真人[4]，東　　俊文[1]

[1]東歯大　生化
[2]東歯大　矯正
[3]東歯大　口腔顎顔面外科
[4]産業技術総合研

【目的】iPS 細胞はその増殖能と多分化能から再生医療の移植細胞のソースとしてだけでなく，治療法の確立されていない遺伝性疾患に対する病態再現や創薬への応用にも期待されている．今回，我々は Runx2 を原因遺伝子とする鎖骨頭蓋骨異形成症（CCD）患者，PTCH1 を責任遺伝子とする基底細胞母斑症候群（NBCCS）患者の 2 つの症候群患者から得た線維芽細胞を用い iPS 細胞を誘導した．【方法及び結果】本研究は本学倫理審査委員会にて承認済みである（承認番号 533,527,575）．同意を得た CCD 患者 2 症例，NBCCS 患者 4 症例よりそれぞれ口腔粘膜を採取し，遊走してきた線維芽細胞へレトロウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター SeVdp（KOSM）302L を用いて Oct3/4，Sox2，Klf4，c-Myc の 4 因子を導入し，iPS 細胞を樹立した．これらの iPS 細胞は Oct3/4，Nanog などの未分化マーカーの発現と，テラトーマ形成による三胚葉分化を示した．骨芽細胞分化誘導における薬剤の効果を検討した．【結論】本研究では 2 症候群 6 症例より iPS 細胞を樹立した．iPS 細胞は無限増殖性をもち，かつ多分化能を有するのでさまざまな条件下において互いの遺伝子の発現を比較し，病態解析，創薬，再生医療など有用性の高い iPS 細胞を確立した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of iPS cells derived from cleidocranial dysplasia syndrome and basal cell nevus syndrome primary oral tissue fibroblast

○Onodera S[1]，Saito A[1]，Shino－Ochiai H[1]，Ohtaka M[4]，Ooki A[2]，Hasegawa D[3]，Shibahara T[3]，Sueishi K[2]，Nakanishi M[4]，Azuma T[1]

[1]Dept Biochem, Tokyo Dent Coll
[2]Dept Oral Orthodont, Tokyo Dent Coll
[3]Dept Oral Surgery, Tokyo Dent Coll
[4]AIST

［Purpose］Patient-specific induced pluripotent stem cells（iPSC）derived from somatic cells provide a unique tool for study of human genetic diseases, as well as a source for cell replacement therapies and drug development. Cleidocranial dysplasia syndrome（CCD）and Basal cell nevus syndrome（NBCCS）are both autosomal dominantly inherited disease. To elucidate those syndrome's mechanism, we established induced pluripotent stem cells（iPSCs）from these patients and investigate gene expressions of Runx2 related genes and Hedgehog related genes.［Methods and Results］This study has already been approved by the university ethics committee（approval number 533,527,575 ）. CCD fibroblasts were derived from a CCD patient who was diagnosed with a nonsense mutation of Runx2, after the subject provided written informed consent. NBCCS fibroblasts were derived from NBCCS patients diagnosed with a frameshift and splicing variant. We generated iPSC lines from fibroblasts obtained from this CCD and NBCCS patient using a retrovirus vector and sendai vector SeVdp（KOSM）302L. These iPS cell lines expressed ES cell makers such as Oct3/4, Nanog. Pluripotency was also confirmed by the in vivo teratoma formation assay.［Conclusion］Patient-specific hIPSC may provide a useful tool for studying mechanism of these syndromes and could pave the way to develop new therapies for these genetic diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-19 神経堤由来細胞に発現するRhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は口蓋形成に必須である

○大島　睦子[1,2]，山田　　篤[1]，鈴木　　大[1]，槙　宏太郎[2]，上條竜太郎[1]

[1]昭和大　歯　口腔生化
[2]昭和大　歯　矯正

口蓋裂は，頭蓋顎顔面領域において最も多く発症する先天性疾患である．遺伝的および環境的要因に関して様々な報告がされているが，未だ不明な点が多い．本研究では，胎生期の器官形成に重要なRhoファミリー低分子量Gタンパク質の1つであるCdc42に着目し，口蓋形成過程における機能解析を行った．口蓋形成に重要な神経堤由来細胞で特異的に組換え酵素Creを発現するP0-Creトランスジェニックマウスと Cdc42 floxマウスの交配により Cdc42遺伝子コンディショナルノックアウトマウス(Cdc42 cKOマウス)を作製した．その結果，生後0日齢のCdc42 cKOマウスは短頭の特徴的な顔貌を呈しており，顔面裂，口蓋裂および頭蓋内出血の表現型が認められた．また，口蓋裂にともなう哺乳障害が認められ，生後2-3日で致死となった．骨格標本の解析より，上顎骨および口蓋突起の形成に不全が認められた．マウス胎生期における口蓋形成過程は，胎生10.5日齢頃より発生する内側鼻突起および外側鼻突起と上顎突起および下顎突起の癒合形成後，胎生12.5日齢より上顎突起から生じる口腔突起同士が正中部で癒合し，胎生15.5日齢までに口蓋が形成される．走査型電子顕微鏡解析および組織染色解析より，胎生15.5日齢におけるCdc42 cKOマウスは口蓋突起の伸長に異常があり，その後の正中部の癒合および舌の下方移動が認められなかった．以上の結果より，神経堤由来細胞においてCdc42は口蓋形成過程を含む頭蓋顎顔面領域の形成において重要な遺伝子であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Cdc42 expressed in neural crest cells are essential during palatal development

○Oshima M[1,2]，Yamada A[1]，Suzuki D[1]，Maki K[2]，Kamijo R[1]

[1]Dept Oral Biochem, Showa Univ Sch Dent
[2]Dept Ortho, Showa Univ Sch Dent

Craniofacial deformities with multifactorial etiologies such as cleft palate represent some of the most frequent congenital birth defects seen in human. Cdc42, a Rho small GTPase protein, is known to play critical roles in organogenesis of various tissues. To investigate the physiological functions of Cdc42 during craniofacial development, we generated cranial neural crest-derived cell-specific inactivated Cdc42 mutant mice（Cdc42fl/fl; P0-Cre）. Most of the Cdc42fl/fl; P0-Cre neonates were viable at birth, though they appeared weaker and no milk was found in their stomachs, and all died within a few days because of suckling and breathing disorders. Cdc42fl/fl; P0-Cre neonates had characteristics of a short face and intracranial bleeding. For anatomical analysis, we demonstrated that these mice had abnormal calcification of the craniums, including frontal, parietal, and interparietal bone, as also seen in micro-computed tomography images. Furthermore, Cdc42fl/fl; P0-Cre neonates demonstrated a cleft palate and there was no fusion of the secondary palate. Histological analyses of Cdc42fl/fl; P0-Cre embryos showed a failure of palatal shelf elongation for the process of palate closure. In conclusion, our results suggested that Cdc42 is crucial for facial and palatal organogenesis during craniofacial development.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-20 培養幹細胞を併用した象牙質顆粒の骨補填材としての動態評価

○奥野公巳郎[1,2]，川木　晴美[2]，田中　雅士[1]，小栗　健策[1]，河野　　哲[1]，神谷　真子[2,3]，
高山　英次[2]，吉田　隆一[1]，近藤　信夫[2]

[1]朝日大　歯　歯内療法
[2]朝日大　歯　口腔生化
[3]朝日大　営　化学

我々は自己由来の生体材料として象牙質に注目し，根尖封鎖への応用を検討して，象牙質顆粒が根尖部で強固な硬組織様の凝塊を誘導することを報告してきた．今回我々は象牙質顆粒に幹細胞を併用した骨補填材について検討するため，3 種の体性幹細胞（ヒト骨髄由来幹細胞，ヒト歯髄由来幹細胞，ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた培養系で象牙質の生理学的機能を評価し，さらにヌードマウス皮下への埋植実験により生体内での動態について検討した．その結果，象牙質は他の人工骨補填材と比較して 3 種の幹細胞の増殖を有意に促進した．また，その効果はオートクレーブ滅菌後の象牙質でもみられた．次に骨補填材と幹細胞を共に培養し凝集複合体を作製した後の骨芽細胞への分化評価でも象牙質は ALP 活性および骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を促進した．これらの凝集複合体あるいは骨補填材のみを埋植した実験から，幹細胞凝集複合体埋植群では，いずれの幹細胞を用いた場合でも骨芽細胞のマーカーである osterix 陽性細胞が多数みられ，その多くがヒト核陽性であった．一方で，増殖細胞のマーカーである Ki-67 陽性細胞は象牙質顆粒・歯髄由来幹細胞凝集複合体埋植群で顕著に観察された．以上より，象牙質顆粒は幹細胞の骨芽細胞様細胞への分化において，比較に用いた人工補填材に匹敵する分化促進能を示した．また，歯髄由来幹細胞は骨髄由来幹細胞と同様に，その一部が埋植後の組織で骨芽細胞様細胞に分化し，さらに一部は増殖能を有して生存していると考えられ，骨再生療法への細胞源として有望であることが示唆された．以上より，骨補填材顆粒のみを用いるよりも，あらかじめ細胞を培養した骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を移植材として用いると新生骨形成が促進される可能性が示され，象牙質と歯髄由来幹細胞を自家移植が可能な骨補填材料として利用することは，抜去歯の活用法として有望であることが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evaluation of dentin particles combined with stem cells as a bone substitute

○Okuno K[1,2]，Kawaki H[2]，Tanaka M[1]，Oguri K[1]，Kawano S[1]，Kamiya M[2,3]，Takayama E[2]，
Yoshida T[1]，Kondoh N[2]

[1]Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

As biochemical components of calcified hard tissues, dentin and bone represent similar constituents. We focused on autogenous dentin, as a biomaterial; we have reported that dentin fillings conferred amenable sealing effects, and they could be used as an apical barrier of root canals. In this study, we evaluated effects of dentin particles as a bone substitute. Our results demonstrated that dentin particles induced differentiations of human bone marrow stem cells（hBMSCs）, dental pulp stem cells（hDPSCs）, and adipose tissue stem cells（hASCs）into osteoblastic cells; dentin enhanced alkaline phosphatase（ALP）mRNA expression and the activity, and osteoblastic differentiation markers. Dentin also induced a proliferation marker, Ki67 in these cells. These effects of dentin were comparable to those of HA-based bone substitute particles. Using in vivo experiments, we showed that dentin particles functioned as a good scaffold for stem cells. In vivo osteoconductive assessments demonstrated that osteocalcin positive cells were remarkably observed in dentin and stem cell complexes in transplanted tissues, in which human nuclei positive signals were also detected. TRAP positive cells were remarkably observed in dentin transplanted tissue. These findings suggested that dentin particles played important role in transplanted stem cells to differentiate into osteoblast-like cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-21　CCN4/WISP-1 は TGF-b3 誘導性軟骨細胞分化を正に制御する

○吉岡　裕也，大野　充昭，窪木　拓男

岡山大　院医歯薬　インプラント

CCN ファミリーは様々な組織発生や分化への関与が報告されており，その中でも CCN2 や CCN3 は骨芽細胞・軟骨細胞分化において重要な役割を担っていることが知られている．また，我々の研究グループはこれまでに CCN4 が骨芽細胞分化を正に制御していることを報告してきた．しかし，CCN4 が軟骨細胞分化や軟骨再生における役割は未だ明らかではない．そこで本研究では CCN4 が軟骨細胞分化における役割，およびそのメカニズムを解明にすることとした．はじめに，in vitro において，アデノウイルスベクターを用い CCN4 を強制発現させたヒト骨髄由来間葉系間質細胞（hBMSCs）をマイクロマス培養法にて培養した．その結果，CCN4 を強制発現した hBMSCs では TGF-b3 刺激により誘導された SMAD2/3 のリン酸化が増強され，軟骨細胞分化は促進された．また，この細胞で siRNA にて CCN4 の発現を抑制すると，TGF-b3 誘導性 SMAD2/3 のリン酸化および軟骨細胞分化は抑制された．次にそのメカニズムを明らかにするため，CCN4 を強制発現または発現抑制した hBMSCs と TGF-b3 の結合性を免疫学的手法を用い検討した．その結果，hBMSCs 表面の CCN4 の量が，TGF-b3 の細胞表面への結合性を制御していることが明らかとなった．また，CCN4 と TGF-b3 が結合することを免疫沈降法を用いて確認した．次に，関節軟骨欠損の治癒における CCN4 の関与を明らかにするため，6 週齢の Ccn4 欠損（KO）マウスおよび野生型（WT）マウスの関節軟骨中央に直径約 400 um の欠損を作製し，4 週後に治癒状態を組織学的に評価した．その結果，WT マウスの軟骨欠損部位に軟骨が一部再生している像が観察されたが，KO マウスでは認められなかった．以上より，CCN4 は TGF-b3 の hBMSCs への結合性を制御することで，軟骨細胞分化を正に制御していることが明らかとなった．また，CCN4 が軟骨細胞分化に関与していることから，KO マウスにおいて関節軟骨欠損の治癒が阻害された可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## CCN4/WISP-1 up-regulates the TGF-b3-induced chondrogenesis

○Yoshioka Y，Ono M，Kuboki T

Dept Oral Rehabil, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

The CCN family of proteins play important roles in development and homeostasis of bone and cartilage. To understand the role of CCN4 in chondrogenesis, human bone marrow stromal cells（BMSCs）were transduced with CCN4 adenovirus（adCCN4）or siRNA of CCN4（siCCN4）in the presence or absence of transforming growth factor-b3（TGF-b3）. Overexpression of CCN4 enhanced TGF-b3-induced SMAD2/3 phosphorylation and chondrogenesis of hBMSCs in in vitro analysis using micromass culture model. In contrast, knockdown of CCN4 inhibited the TGF-b3-induced SMAD2/3 phosphorylation and synthesis of cartilage matrix in hBMSCs. Immunoprecipitation-western blot analysis revealed that CCN4 bound with TGF-b3 and regulated the affinity of TGF-b3 to bind to hBMSCs. In vivo analysis confirmed a significant decrease in the gene expression level of chondrocyte markers in the cartilage samples from Ccn4-KO mice, compared to those from wild type（WT）control. To investigate the regenerative properties of the articular cartilage in Ccn4-KO mice, articular cartilage defects were surgically performed in the knee joints of young mice, and the results showed that the cartilage was partially repaired in WT mice, but not in Ccn4-KO mice. In conclusion, these results show that CCN4 has a positive influence on chondrogenic differentiation by modulating the effects of TGF-b3.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-22　親水化チタン基盤上でのヒト骨髄由来幹細胞の動態解析

○新谷　耕平[1,2]，川木　晴美[2]，神谷　真子[2,3]，高山　英次[2]，土井　　豊[4]，堀田　正人[1]，近藤　信夫[2]

[1]朝日大　歯　歯冠修復，[2]朝日大　歯　口腔生化，[3]朝日大　営　化学，[4]朝日大　歯　理工

チタン製インプラントへの紫外光照射は，親水性の復元と表面汚染物質除去に効果的であり，早期に骨結合すると言われている．我々はこれまでに真空紫外光（VUV）照射によりチタン基盤表面の親水化が短時間で行われることを報告してきた．本研究ではVUV照射後のチタン基盤上でヒト骨髄由来幹細胞（hBMSC）を培養し，細胞の接着形態，増殖，骨芽細胞能について検討した．さらに，VUV照射後の基盤を保存する条件についても検討した．チタン基盤（厚さ2 mm，直径10 mm）は，鏡面研磨後に＃1000のSiCペーパーで30分間研磨したものを用いた．VUV照射は波長172 nmのエキシマ光を用い大気中で行った．VUV照射の時間を変化させ，チタン基盤の親水性の変化を接触角の測定により検討した．この結果から照射時間を30分とし，VUV照射後チタン基盤を空気中，蒸留水，生理食塩水，リン酸緩衝液（PBS）に1か月および3か月間保存した後，親水性を評価したところ，照射後3か月PBS保存したチタン基盤の接触角は照射直後のチタン基盤と同等の値を示した．さらに，種々の保存状態の基盤上でヒト骨髄由来幹細胞（hBMSC）を培養し，接着後の細胞の形態観察および細胞増殖と骨芽細胞への分化について評価した．VUV照射後の基盤を種々の条件下で1ヶ月間保存し，その上でhBMSCを培養した結果，PBSで保存した基盤上では，hBMSCの伸展，および増殖はVUV照射直後の基盤と同等であった．また，14日間培養後のhBMSCのALP活性評価でもPBS保存した基盤上では他の保存条件の基盤上よりも顕著なALP活性染色性を示し，照射直後の基盤と同等の結果を得た．さらに，PBSで保存したチタン基盤では，細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子mRNA発現量も促進されていた．以上より，VUV照射後のチタン基盤をPBS溶液中に保存することで，照射直後に匹敵する親水性ならびに細胞活性が保たれたことから，VUV照射チタン基盤の保存液としてPBSが有効であることが示唆された．**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Physiological behavior of human bone marrow stem cell activities on the hydrophilic titanium disks

○Shintani K[1,2]，Kawaki H[2]，Kamiya M[2,3]，Takayama E[2]，Doi Y[4]，Hotta M[1]，Kondoh N[2]

[1]Dept Operative Dent, Asahi Univ Sch Dent，[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent，[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin，[4]Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent

We have reported that Vacuum ultraviolet（VUV）treatment could effectively enhance hydrophilicity of titanium surface due to its high energy. Titanium disk were VUV-irradiated in air with excimer light（172 nm）and stored under various conditions as in air, distilled water, saline, and phosphate buffered saline（PBS）for 1 or 3 months, and evaluated which condition is better to maintain the photo-induced superhydrophilicity. The contact angle, as an adverse index of superhydrophilicity, decreased steeply after VUV-irradiation and no further significant decrease in the contact angle was observed after the 5-min irradiation. The titanium disc stored in PBS maintained its superhydrophilicity even after 3 months. In addition, we evaluated the human bone marrow-derived stem cells（hBMSDs）spread on the titanium disks stored in PBS for a month; and demonstrated that they presented the same physiological characteristics, i.e. spindle-shaped morphology, proliferation rate and alkaline phosphatase activity, as those on the freshly irradiated discs. These findings indicated that storing irradiated titanium materials in PBS would be favorable for maintaining initial superhydrophilicity of the products.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-23　変動磁場刺激に対するマウス骨芽細胞様細胞の遺伝子解析

○福澤　　蘭，尾澤　昌悟，小島　規永，武部　　純

愛院大　歯　有床義歯

【目的】歯科補綴臨床において永久磁石の応用は進んでいるが，生体の中でも特に骨に対する変動磁場の影響は，従来から高い関心がもたれてきた．しかし，磁場に対する生体反応については，その安全性も含めて未だ不明な点も多い．そこで，本研究では磁場が生体の中で個々の細胞等の微小環境に影響を与え，遺伝子レベルで変化をおこす可能性があるという仮説をたて，骨芽細胞様細胞に対して，磁場刺激による遺伝子の変化を，マイクロアレイの手法を用いて，網羅的に捉え検討した．【方法】細胞はマウス骨芽細胞様細胞株である MC3T3E-1 細胞を使用した．この細胞株を 12well-plate に 1well あたり $1\times10^4$個となるよう播種し，37 度，5% $CO_2$インキュベーター内で培養した．実験材料は変動磁界発生装置を使用し，曝磁条件として，超低周波強磁場 0.4 T，0.17 Hz に 6 時間曝露させた．曝磁直後の対照群および曝磁群の MC3T3-E1 細胞からトータル RNA を抽出し，遺伝子解析を行った．解析結果を基に特定された遺伝子のリアルタイム PCR を行った．【結果と考察】マイクロアレイ解析から，曝磁により有意に発現した遺伝子は，主にイオントランスポーターや細胞膜に関与する機能を持つ solute carrier family 30 member 1（slc30a1）であった．リアルタイム PCR の結果，slc30a1 は対照群と曝磁群の両者間で有意な差が認められ，曝磁群の発現量が高く認められた．ALP は 3 日目，7 日目で，対照群よりも曝磁群において発現量は高くなった．曝磁により slc30a1 が活性化され，亜鉛イオンやカルシウムイオンの輸送に関与して，対照群よりも早期の段階で増殖，分化に至り，骨形成に促進的に働く可能性が高いものと考えられる．以上のことから MC3T3-E1 細胞において 磁場刺激は遺伝子レベルで変化を起こし，早期に増殖を刺激し，分化を促進している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## High throughput gene analysis of mouse osteoblastic cells on magnetic fields

○Fukuzawa R，Ozawa S，Kojima N，Takebe J

Dept Removable Prosthodontics, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

［Purpose］A hypothesis of this study is that the magnetic field influences on a gene level of the cells. Changes of gene expression of mouse osteoblastic cells were accessed by microarray analysis.

［Materials & Methods］In this study, MC3T3-E1 cells were used and a changing strength and frequency of extremely low magnetic field（ELMF）was set to 0.4 T and 0.17 Hz for 6 hours respectively. After the ELMF exposure, total RNAs of the control and the exposed groups were extracted, microarray analysis, and real-time PCR of specific genes identified based on the analysis result.

［Results & Conclusion］From the microarray analysis, a gene which significantly elevated by ELMF exposure was solute carrier family 30 member 1（slc30a1）. From a real-time PCR result of slc30a1, a significant difference was recognized between the control group and the exposed groups, and the expression of slc30a1 was unregulated by the exposure. These results suggested that ELMF exposure activated slc30a1 gene which could participate in the transportation of zinc and calcium ions. Therefore, it is suggested that the magnetic field stimulation caused changes at a gene level in MC3T3-E1 cell, stimulated cell growth in early stage, and promoted differentiation consecutively.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-24　iPS 細胞由来骨補填材料の開発

○山本　治毅[1]，萱島　浩輝[1]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]

[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ
[2]東北大　院歯　分子　再生補綴

【目的】我々は iPS 細胞が有する“無限の増殖能”および“骨基質の産生能”という性質に着目し，iPS 細胞を骨補填材に有効な成分を産生するツールとして用いる技術を着想した．本研究の目的は，iPS 細胞に骨基質成分を大量に産生させる培養方法を検討し，凍結乾燥により不活化した iPS 細胞由来骨補填材（iPS 骨補填材）を評価することである．【材料および方法】マウス iPS 細胞の胚様体を振盪しながら骨芽細胞分化誘導培地中で培養し，得られた iPS 細胞凝集体の乾燥質量，カルシウム量の測定，および FT-IR を用いた成分解析を行った．iPS 細胞凝集体における骨芽細胞特異的遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析し，培養上清中の骨形成蛋白質（BMP）2 を ELISA 法で定量した．また，iPS 骨補填材の抽出液が，マウス間葉系幹細胞（MSC）の骨芽細胞分化に及ぼす影響を Alizalin Red 染色で検討した．さらに，ラット頭蓋骨に形成した欠損部に iPS 骨補填材を填入し，術後経過を組織切片観察（HE 染色）および $\mu$CT 画像解析により評価した．【結果】分化誘導過程における振盪培養は，iPS 細胞凝集体の乾燥質量，カルシウム量，骨芽細胞特異的遺伝子の発現および BMP2 の産生を有意に促進した．FT-IR の結果，iPS 細胞凝集体の成分を表すスペクトルは骨組織に特徴的なピークを示した．Alizalin Red 染色の結果，iPS 骨補填材は MSC の骨芽細胞分化を著明に促進した．iPS 骨補填材を頭蓋骨欠損部に移植した 10 週間後には，垂直的な厚みをもった皮質骨様の骨組織の形成を認めた．また，填入部位に形成された新生骨の骨密度は経時的に増加した．【結論】iPS 細胞を振盪培養下で骨芽細胞へ分化誘導することで，骨組織に近い成分を有する細胞凝集体を得る事ができ，これを不活化した材料は骨補填材として有用である可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Fabrication of bone graft materials using iPS cells

○Yamamoto H[1]，Kayashima H[1]，Yatani H[1]，Egusa H[1,2]

[1]Dept Fixed, Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objectives: iPS cells（iPSCs）can be infinitely expanded and guided to differentiate into osteogenic cells. The objective of this study is to fabricate iPSC-derived bone graft materials（iPSC-BGM）. Methods: Mouse iPSCs were cultured in osteogenic induction medium with shaking culture followed by inactivation by freeze-drying. The dry weight, calcium deposition, expression of osteogenic marker genes（real-time RT-PCR）and production of bone morphogenetic protein（BMP）-2（ELISA）in the iPSC constructs before inactivation were evaluated. The elemental composition of the iPSC constructs were investigated by FT-IR analysis. Mineralization of mouse mesenchymal stem cells（MSCs）in the medium containing elution from the iPSC-BGM was assessed by Alizarin Red staining. The new bone formed in rat calvarial defects filled with the iPSC-BGM was histologically assessed. Results: The dry weight, calcium deposition, expression of osteogenic marker genes and BMP2 of the iPSC constructs were increased by the shaking culture. FT-IR spectra of the iPSC constructs were similar to that of bone. Calcification of MSCs was enhanced by the elution from the iPSC-BGM. The defect was vertically regenerated with the cortical bone at the 10th week. Conclusion: These results suggest that iPSC-BGM would be suitable for vertical bone regeneration.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-25 炭酸含有アパタイト骨補填材を用いた骨再生評価

○高橋　潤[1,2]，川木　晴美[2]，近藤　雄三[1]，神谷　真子[2,3]，高山　英次[2]，土井　豊[4]，田辺俊一郎[1]，永原　國央[1]，近藤　信夫[2]

[1]朝日大　歯　インプラント
[2]朝日大　歯　口腔生化
[3]朝日大　営　化学
[4]朝日大　歯　理工

歯科インプラント治療の現場では骨量不足を補うための骨補填材の需要が増している．しかしながら既存の骨補填材では組織再生後も残存するなどの問題点があり，自家骨移植の代替材となりうる人工骨補填材の開発が急務である．このような背景から，我々は骨アパタイトと同等の炭酸イオンを含む炭酸含有アパタイト(CA)を開発した．そしてCA上で培養したラット骨髄由来間質細胞，ラット頭蓋冠由来骨芽細胞の増殖分化に，いくつかの分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）の経路が関与していることを見出し報告してきた．そこで今回は各種骨補填材の緻密体顆粒をラット大腿骨あるいはヌードマウス皮下に移植して，移植後のCAと周囲組織の応答について検討した．その結果，ラット大腿骨骨欠損モデルを用いた組織学的な検討から，CAおよび水酸化アパタイト(HA)を填入した群では，7日目には顆粒を足場に母床骨から細胞が進入し，顆粒の周囲に骨様の組織が形成されており，3週間後では新生骨の形成が顕著であった．さらに蛍光免疫染色を行った結果，CAを填入した組織では，新生骨と顆粒の間にオステリックスおよびリン酸化p38が共に陽性の細胞が多数認められた．また，マウス皮下移植後の組織の検討では，他の材料に比べ，移植したCA周囲で硬組織様組織の形成が顕著であり，オステオカルシン陽性細胞が多数みられた．また，TRAP染色による破骨細胞様細胞の検出ではCA移植群でTRAP陽性細胞が顕著に検出された．以上より，CAはHAおよび$\beta$-TCPと比較して，骨欠損部あるいは皮下組織において組織由来の未分化細胞の足場として優れており，骨芽細胞への分化を促進し骨再生に有用な材料であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evaluation of bone regeneration by carbonate apatite as a bone substitute

○Takahashi J[1,2], Kawaki H[2], Kondo Y[1], Kamiya M[2,3], Takayama E[2], Doi Y[4], Tanabe T[1], Nagahara K[1], Kondoh N[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Implantol, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin
[4]Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent

Our previous studies showed that sintered carbonate apatite (CA) was a favorable materials as bioresorbable bone substitute. In this study, we investigated the usability of CA particles as a bone substitute *in vivo*. We performed two experiments. Effects of CA on the bone regeneration were evaluated in rat femoral bone defect model. In addition, CA particles were also transplanted subcutaneously into immunocompromised mice, and assessed the histological characteristics. As a result of osteoconductive assessment, new bone was notably observed on the CA particles in rat bone defect models after 3 weeks of the implantation. Osteoblastic markers, osterix or osteocalcin positive cells were remarkably observed in CA-transplanted tissues both of rat models and mouse subcutaneous models. TRAP positive cells were also observed in CA transplanted tissues, as comparable to those in commercially available artificial bone substitute. Our data suggested that, as a bone substitute, CA particles played an important role, and were usable material for repair of bone defects.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-26 ヒアルロン酸は生物学的活性により C28/I2 細胞の MMP13 発現を抑制する

○古田　絢也[1,2]，沖永　敏則[1]，有吉　　渉[1]，西原　達次[1]

[1]九歯大　院歯　感染分子生物
[2]九歯大　院歯　顎顔面外科

関節滑液や関節軟骨などに多く含まれる細胞外マトリックスの構成成分ヒアルロン酸には，潤滑作用や緩衝作用といった Biomechanical な保護作用に加えて，生物学的作用により抗炎症作用，疼痛抑制作用などを有することが報告されており，変形性関節症（OA）や関節リウマチ（RA）症例における関節腔内注入療法に応用されている．しかしながらヒアルロン酸の生物学的機能に関する詳細なメカニズムについては不明な点が数多く残されている．ヒト軟骨細胞株 C28/I2 を使用し，Tumor necrosis factor-$\alpha$（TNF$\alpha$）および，ヒアルロン酸存在下に培養を行い，マトリックス分解酵素である Matrix metalloproteinase 13（MMP13）の遺伝子発現およびタンパク分泌を検討した．さらに刺激後の細胞よりタンパクを抽出し，Western blotting を用いて細胞内シグナル分子の活性化を検討した．real-time RT-PCR の結果では TNF$\alpha$ による MMP13 の発現誘導に対し，ヒアルロン酸は抑制的に作用した．TNF$\alpha$ 刺激による培養上清に分泌される MMP13 濃度もヒアルロン酸の併用により減少した．このヒアルロン酸による MMP13 の発現抑制は CD44 中和抗体の前処理により解除された．また Western blotting の結果から，TNF$\alpha$ により JNK, c-Jun, c-Fos タンパクのリン酸化が観察され，ヒアルロン酸併用群では JNK, c-Jun のリン酸化が抑制された．TNF$\alpha$ 刺激による MMP13 の発現誘導を介した関節マトリックスの破壊に対してヒアルロン酸拮抗受容体 CD44 を介して抑制的に作用すること，そしてその抑制メカニズムとして JNK，および c-Jun タンパクのリン酸化抑制が関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Hyaluronic acid inhibits TNF-alpha-induced MMP13 expression in human chondrocyte

○Furuta J[1,2]，Okinaga T[1]，Ariyoshi W[1]，Nishihara T[1]

[1]Div Infect and Mol Biol, Kyushu Dent Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral-Maxillac Surg, Kyushu Dent Univ Grad Sch Dent

Aggrecan degradation is considered to play a clinical role in the progression of osteoarthritis（OA）. Matrix metalloproteases（MMPs）are zinc-dependent endopeptidases, and degrade aggrecan in OA cartilage. The aim of this study was to clarify the mechanisms of MMP13 expression induced by TNF-alpha in human chondrocyte（C28/I2 cells）by high molecular weight hyaluronan（HA）, a therapeutic agent used for OA. C28/I2 cells were incubated with TNF-alpha and HA. In some experiments, the cells were pre-incubated with the CD44 function-blocking monoclonal antibody prior to addition of TNF-alpha and HA. HA suppressed MMP13 mRNA and protein secretion induced by TNF-alpha. Pre-incubated with the anti-CD44 monoclonal antibody recovered the inhibitory effect of HA on expression of MMP13 mRNA induced by TNF-alpha. Western blotting analysis revealed that TNF-alpha-induced phosphorylation of JNK and c-Jun protein were diminished by HA, suggesting that HA plays an important role as a regulatory factor in cartilage degradation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-27　口腔扁平上皮癌細胞における圧受容による増殖制御機構

○吉本　尚平[1]，森田　浩光[3]，中村　誠司[2]，平田　雅人[1]

[1]九大　院歯　口腔細胞工
[2]九大　院歯　顎顔面腫瘍制御
[3]福歯大　総合歯科

口腔扁平上皮癌細胞では上皮成長因子受容体（EGFR）が過剰に発現しており，細胞増殖に重要な働きをしていると考えられている．そのため，口腔扁平上皮癌治療の標的分子として臨床応用されている．一方，腫瘍組織内では，癌細胞の高い細胞増殖能により持続的な組織内圧の上昇が起こっており，細胞増殖への圧の関与も無視できない．そこで，口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-3）用いて圧受容に関する実験を行い，高浸透圧により活性化された nuclear factor of activated T-cells 5（NFAT5，転写因子）が EGFR の細胞膜移行とそれによる細胞増殖の亢進に関わっているという結果を得た．10％の血清を含む 5.5 mM グルコース含有の培地（浸透圧：300 mOsM）にマンニトールを添加し，高浸透圧刺激（350 mOsM）を行うと，HSC-3 において NFAT5 の発現亢進とともに EGFR の細胞内から細胞膜への移行が観察された．また高浸透圧刺激により約 2 倍の BrdU の取り込み亢進が認められ，細胞増殖速度が上昇している事が示唆された．この細胞増殖速度の亢進は，EGFR 阻害剤である CP380736（10 μM）およびチロシンキナーゼ阻害剤である genistein（10 μM）の添加により抑制された．さらに shRNA を用いた NFAT5 のノックダウン実験を行うと，ノックダウン細胞では，上記の高浸透圧刺激に伴う EGFR の細胞膜移行・細胞増殖速度の亢進はともに抑制された．上記の結果から，口腔扁平癌細胞では，腫瘍内圧亢進による NFAT5 の発現亢進を介して EGFR の細胞膜移行が促進され，細胞増殖を促進していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Possible mechanism of positive pressure-induced cell proliferation in oral squamous cell carcinoma

○Yoshimoto S[1]，Morita H[3]，Nakamura S[2]，Hirata M[1]

[1]Lab Mol Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Sec Oral and Maxillac Oncol, Div Maxillac Diag Surg Sci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[3]Sect General Dent, Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll

Epidermal growth factor receptor（EGFR）is highly expressed in oral squamous cell carcinoma（SCC）and plays a critical role for cell proliferation. Therefore, EGFR is clinically recognized as a molecular target of oral cancer therapy. On the other hand, it could be possible that an intra-tumoral pressure, constitutively increase due to high proliferative ability of SCC, is involved in cancer growth. Here we report that hyper-osmotic challenge to human tongue squamous carcinoma cells（HSC-3）triggered upregulation of nuclear factor of activated T-cells 5（NFAT5）, and thus translocation of EGFR from cytosol to plasma membrane, followed by cell proliferation. EGFR were translocated to the plasma membrane accompanied with NFAT5 up-regulation by changing medium from normal（300 mOsM）to hyper-osmotic condition（350 mOsM）, as assessed by fluorescent immunocytochemistory and Western blot. BrdU assay revealed that cell proliferation was accelerated twice by hyper-osmotic challenge. The acceleration of BrdU intake activity was suppressed by CP380736（10 μM）, an EGFR inhibitor, or genistein（10 μM）. Furthermore, NFAT5-knocked down HSC-3 cells by shRNA showed that the events triggered by hyper-osmotic challenge were significantly suppressed. These results suggest that NFAT5 regulates oral SCC proliferation through plasma membrane translocation of EGFR by intra-tumoral positive pressure.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-28　TPD52 ファミリータンパクの遺伝子発現制御の検索

○本橋　宏美，椋代　義樹

昭和大　歯　口腔外科

【目的】Tumor Protein D（TPD）ファミリータンパクは TPD52，53，54，55 の 4 つより成る新規のタンパクファミリーである．特に TPD52 の mRNA は長い 3'-UTR（非翻訳領域）を持ち，AU リッチ配列（ARE:AUUUA）を多く含む．この特徴的な構造に着目し TPD ファミリー 52，53，54 遺伝子の 3'-UTR の転写後制御機構の役割について検索した．【材料および方法】扁平上皮癌細胞および正常細胞を用いて核 Run on assay，RT-qPCR 法，RNA degradation assay を行い TPD52，53，54 の総 RNA 量，mRNA の転写活性および半減期の測定を行った．さらに増殖因子（TGF-b，EGF）又は miR34a，miR122 mimic を導入し，同様の実験を行った．次に CMV プロモーター下流の GFP 遺伝子の 3' 末端に TPD52 ファミリーの 3'-UTR を繋いだキメラ遺伝子を作成し，SAS 細胞にトランスフェクションし GFP の発現を FACS を用いたレポーターアッセイにて測定した．【結果】TPD52，53，54 遺伝子の総 RNA 量と mRNA の転写活性は，発現量と活性が同じ傾向を示したが，TPD52 の半減期は細胞依存的に異なった．増殖因子により TPD52 の転写活性は著しく上昇したが逆に半減期は短くなった．miR34 mimic を導入すると同様の結果がみられたが，miR122 mimic 添加では TPD52 の半減期に影響を与えなかった．FACS では GFP-TPD52，53，54 の 3'-UTR キメラ遺伝子の発現量は各々の 3'-UTR の依存性に変化を示し，TPD52 が特に GFP の発現を強めた．RNA degradation assay より RNA の安定性に TPD ファミリーの 3'-UTR は寄与していることが明らかとなった．【結論】TPD ファミリー遺伝子の mRNA の安定性において 3'-UTR が関与し，GFP-TPD52，53，54 の 3'-UTR キメラ遺伝子の発現量の違いは各々の 3'-UTR の構造の違いによるものだと考えられる．以上より TPD ファミリー遺伝子の 3'-UTR が転写後遺伝子発現制御を受けていることが明らかになった．会員外演者：代田達夫，近藤誠二（昭和大学歯学部口腔外科学講座）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The 3'-UTR of TPD family mRNA is post-transcriptional regulation on its gene expression

○Motohashi H，Mukudai Y

Dept Oral Surgery, Sch Dent, Showa Univ

Objectives: Tumor Protein D（TPD）family includes TPD52, 53, 54 and 55. Three prime untranslated regions（3'-UTR）of TPD family mRNAs are relatively longer compared to coding ones. That of TPD52 quite long lapping tag 3.5 kbs, thereby the roles of the 3'-UTR on post transcriptional gene expression, was investigated. Methods: Several cancer and normal cells were subjected to total RNA qPCR, nuclear run on assay, and RNA degradation assay, for TPD52, 53, 54 genes. 3'-UTR cDNAs of TPD family mRNA were ligated to the 3'-end of GFP gene at the downstream. Each vector was transfected into cells and GFP measured by Flowcytometry（FACS）. In addition, half-lives of the chimeric genes were measured by qPCR. Result: Total RNA qPCR, nuclear run on assay and RNA degradation assay showed that total RNA and transcriptional activity of TPD family gene almost accord with the total gene expression. However, the half-life of TPD52 mRNA depended on stimulations of growth factors more than TPD53 and 54 did. FACS analysis provided that those alternation of the expression of reporter genes were related to the RNA stability. Conclusions: 3'-UTR of TPD family genes are suggested to play an important role in post-transcriptional regulation of the gene expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-29 マウス口腔扁平上皮癌の悪性形質獲得に伴う脾細胞の抗腫瘍免疫応答の変化

○鷲見　成紀[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，伊藤　宏衣[1,2]，足立　充隆[1,2]，稲垣　俊弘[1,2]，村松　泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤　信夫[2]

[1]朝日大　歯　口腔外科
[2]朝日大　歯　口腔生化
[3]朝日大　営　化学

【目的】我々は，マウス口腔扁平上皮癌細胞（OSCC）株 Sq1979 を同系統マウスに移植し宿主免疫系への影響を検討してきた（第 55,56 回歯科基礎医学会学術大会）．本研究では悪性 形質の異なる種々の Sq1979 サブクローンを移植したマウス脾細胞のサイトカイン産生能などの免疫応答を比較し，悪性形質の変化が抗腫瘍免疫に及ぼす影響を検討した．【方法】C3H マウス頬粘膜由来扁平上皮癌細胞株 Sq1979（理研 BRC），および Sq1979 移植マウスより樹立したサブクローン Sq233 系列（原発巣由来）と L 系列（L2, L3, L5, L6：リンパ節転移巣由来）を，C3H マウス（雄/6 週齢）側腹皮下に移植し，3〜4 週後に脾細胞を採取した．脾細胞を，抗 CD3 抗体を用いて 48 時間試験管内で刺激培養し，上清中に分泌されたインターフェロン γ（IFN-γ）とインターロイキン-10（IL-10）の濃度を ELISA 法にて測定した．腫瘍の悪性度は，生着率，腫瘍成長速度，死亡率などから総合的に判定した．【結果と考察】L 系列 OSCC 移植群は Sq1979 や Sg233 系列に比較して高い移植生着率，成長速度，死亡率を示した．これらの悪性形質は，L 系列のサブクローン間でも差異が認められ，L5 と L6 が最も悪性度が高いと判断された．脾細胞の IFN-γ の産生能はすべての OSCC 細胞株移植群で対照群に比較して低下したが，その低下率は L5，L6 移植群が最も大きかった．一方，IL-10 産生能は L3，L5，L6 移植群では，IFN-γ と同様有意に低下したのに対し，Sq1979，Sq233 系列および L2 移植群では上昇傾向を示した．以上の結果，OSCC の悪性化に伴い，脾細胞の IFN-γ 産生能が低下したが，IL-10 産生の制御は全く異なることから，OSCC は悪性形質に応じて異なる抗腫瘍免疫回避機構を獲得することが示唆された．現在，その分子機構の解明のため，刺激脾細胞の遺伝子発現を検討中である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Transition of antitumor immunity depending on the developed malignancies of implanted mouse oral squamous cell carcinoma cells

○Sumi S[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Ito H[1,2], Adachi M[1,2], Inagaki T[1,2], Muramatsu Y[1], Sumitomo S[1], Kondoh N[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

We have studied antitumor immunity of C3H mice inoculated with syngeneic mouse oral squamous cells (OSCC), Sq1979. In order to evaluate effects of malignant phenotypes of OSCCs upon immunity activity, we examined cytokine-producing capability of anti CD3 antibody-stimulated spleen cells from mice inoculated with parental Sq1979 cells, (from RIKEN BRC), a sub-clone from a transplanted primary tumor tissue (Sq233 cells) or those from metastatic lymph nodes (L2, L3, L5, and L6 cells). Among the inoculated sub-clones, L5 and L6 cells demonstrated higher transplantability, growth rates and mortality than the L2 and L3 cells. Our results demonstrated that IFN-gamma-producing capability of spleen cells from L cells-bearing mice was reduced compared to that from Sq1979 and Sq233-bearing mice; especially, the reducing rates were much higher among the samples from L5 and L6-bearing mice. IL10-producing capability was also reduced in spleen cells from L3, L5, and L6-bearing mice; however rather enhanced in spleen cells from Sq1979, 233 and L3 cells-bearing mice compared to control mice, respectively. These results suggest that antitumor immunity of OSCC-bearing mice is differentially controlled depending on their developed malignancies.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-30 マウス口腔扁平上皮癌細胞株(Sq1979)の液性因子による間葉系細胞(10T1/2)を介した c-c motif chemokine 2(Ccl2)発現の誘導

○伊藤 宏衣[1,2]，足立 充隆[1,2]，神谷 真子[2,3]，川木 晴美[2]，高山 英次[2]，稲垣 俊弘[1,2]，鷲見 成紀[1,2]，村松 泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤 信夫[2]

[1]朝日大 歯 口腔外科
[2]朝日大 歯 口腔生化
[3]朝日大 営 化学

【目的】癌による免疫系制御には間葉系間質細胞が重要な役割を果す．C3H マウス口腔扁平上皮癌細胞(OSCC)株 Sq1979 は同系マウス由来の線維芽細胞（10T1/2）と伴に抗 CD3 抗体刺激脾細胞と共培養するとその IFN-γ 産生能を有意に抑制したが，Sq1979 移植マウスのリンパ節転移巣より樹立したサブクローン（L-5）を同様に共培養しても抑制作用は観察されなかった．(稲垣他，第 55 回 歯科基礎医学会，投稿準備中)．Sq1979 特異的な 10T1/2 を介した Th1 型免疫反応の制御機構を解明するために，Sq1979 で活性化している遺伝子を同定し 10T1/2 との共培養系における発現変化を観察した．
【方法】 L 細胞に比べ Sq1979(理研 BRC)で発現の高い遺伝子を cDNA マイクロアレイ法（SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent）と定量的 PCR 法（SYBR Premix EX Taq, TaKaRa）を用いて同定した．Sq1979 および L-5 を 10T1/2 と接触，または Transwell（Corning)を介した非接触環境で共培養し遺伝子発現の変化を観察した．
【結果と考察】Sq1979 では L 細胞群に比べ Saa3，Lcn2，Fxyd2，Il1f6 および Ccl2 mRNA 発現が上昇していた．一方，10T1/2 はこれら mRNA を全く発現せず，共培養すると Sq1979 の Saa3，Lcn2，Il1f6T 発現を顕著に抑制した．興味深いことに Sq1979 と非接触共培養した 10T1/2 には Ccl2 発現が誘導されたが，Fxyd2 は誘導されなかった．L-5 を 10T1/2 と非接触で共培養しても Ccl2 発現の誘導は起きなかった．従って，Ccl2 発現は Sq1979 特異的な液性因子を介して 10T1/2 にも誘導されることが判明しその機能を検討している．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Induction of c-c motif chemokine 2（Ccl2）in mesenchymal cells（10T1/2）by humoral transmission of mouse oral squamous cell carcinoma cells（Sq1979）.

○Ito H[1,2]，Adachi M[1,2]，Kamiya M[2,3]，Kwaki H[2]，Takayama E[2]，Inagaki T[1,2]，Sumi S[1,2]，Muramatu Y[1]，Sumitomo S[1]，Kondoh N[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

Mesenchymal stroma cells contribute for tumor-promoting immune suppression. C3H mouse mesenchymal cells, 10T1/2, suppressed IFN-gamma-producing capability of mouse spleen cells stimulated by anti CD3 + antibody. This suppressive effect of 10T1/2 cells was enhanced in the co-culture with oral squamous cell carcinoma（OSCC)，Sq1979 cells（RIKEN BRC)；however, was not enhanced in that of L cells, established from lymphnode metastases of Sq1979. In this report, we screened specifically elevated mRNAs in parental Sq1979 cells, using microarray analysis（SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent)and real time PCR methods(SYBR Premix EX Taq, TaKaRa)．We also observed the expression in the co-cultures of 10T1/2 with Sq1979 or L-5 cells using Transwell（Corning)．Our results demonstrated that the expression of Saa3, Lcn2, Fxyd2, Il1f6 and Ccl2 mRNAs was higher in Sq1979 than in L cells, while they were not expressed in 10T1/2 cells. Furthermore, the expression of Saa3, Lcn2 and Il1f6T was suppressed in the co-culture with 10T1/2. Interestingly, the expression of Ccl2 was induced in 10T1/2 co-cultured with Sq1979 without direct cell contacts, demonstrating that soluble factor(s) from Sq1979 induced the expression in 10T1/2. The mechanism of humoral regulation, and functional significance of ccl2 is now investigated.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-31 マウス口腔扁平上皮癌の悪性化にともなう脾細胞のサイトカイン産生能の改変機構

○稲垣 俊弘[1,2]，神谷 真子[2,3]，川木 晴美[2]，髙山 英次[2]，伊藤 宏衣[1,2]，鷲見 成紀[1,2]，足立 充隆[1,2]，住友伸一郎[1]，村松 泰徳[1]，近藤 信夫[2]

[1]朝日大 歯 口腔外科
[2]朝日大 歯 口腔生化
[3]朝日大 営 化学

【目的】我々はマウス口腔扁平上皮癌（OSCC）細胞株 Sq1979 と同系統マウス脾細胞を用いた in vitro 共培養系を確立し，OSCC が T 細胞受容体刺激をうけた脾細胞のインターフェロン（IFN）-γ 産生能を改変することを報告した（稲垣ら 第 55 回，56 回歯科基礎医学会学術大会）．本研究では悪性度の異なる種々の OSCC 株が刺激脾細胞の各種サイトカイン産生能に与える影響を比較検討した．【方法】C3H マウス頬粘膜由来扁平上皮癌細胞株（Sq1979，理研 BRC）と Sq1979 移植マウスの腫瘍原発巣より樹立したサブクローン（Sq 系列：Sq1979-1，Sq1979-2，Sq233）および転移リンパ節より樹立したサブクローン（L 系列：L3，L5，L6）を用いた．OSCC 存在下で同系統マウス脾細胞を抗 CD3 抗体にて 48 時間刺激培養し，分泌されるサイトカインの産生量を ELISA 法にて測定した．同様の実験を Transwell（Corning 社製）を用いた非接触共培養下で行い液性因子の関与を検討した．【結果と考察】刺激脾細胞の IFN-γ 産生量は，悪性度の高い L5-および L6 の接触共存下で顕著に上昇したが，悪性度の低い Sq 系 OSCC 株共存下では軽度の上昇を認めるのみであった．非接触条件下で同様の共培養を行った場合には IFN-γ 産生量の上昇は認められず，本作用には脾細胞との接触が必要であると考えられた．一方，刺激脾細胞からのインターロイキン（IL）-10 の産生量は，すべての OSCC 株共存下で減少し悪性度との相関は認められなかった．脾細胞との接触・非接触条件下でも差異は認められなかったので，本作用は液性因子を介して引き起こされることが示された．以上の結果から，悪性度の高い L 系列 OSCC は刺激脾細胞との直接接触および液性因子を介して，Th1 型免疫反応を促進することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Modulatory effects of progressive phenotypes of mouse OSCC cells on cytokine-producing capability of host spleen cells

○Inagaki T[1,2]，Kamiya M[2,3]，Kawaki H[2]，Takayama E[2]，Ito H[1,2]，Sumi S[1,2]，Adachi M[1,2]，Sumitomo S[1]，Muramatsu Y[1]，Kondoh N[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

We have investigated the modulatory effects of mouse oral squamous cell carcinoma（OSCC）on the immune response of spleen cells in vitro. We, herein, evaluated the OSCC cells with different malignant phenotypes in their impacts on cytokine producing-capability of spleen cells stimulated by anti CD3-antibody. A mouse OSCC cell line（Sq1979 from RIKEN BRC), its sub-clones established from primary lesion of transplanted mice with Sq1979（Sq-series cells）and those from metastatic lymph nodes（L-series cells）were used for this study. IFN-gamma production by stimulated spleen cells was significantly elevated in the presence of L-series cells; however, the rise was low level in the presence of Sq-series cells. The promoting effect of L-series cells was not observed under the contactless condition between OSCCs and spleen cells using Transwell system, demonstrating that, at least, cell-to-cell contact was necessary for this effect. On the other hand, the IL-10-producing capability of spleen cells was suppressed by all OSCCs used under the contactless condition, demonstrating the involvement of humoral factor in this suppression. These results suggest that progressive phenotypes of OSCC cells modulate anti-tumor immune response of spleen cells with direct cell contacts and soluble factor.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-32　歯の石灰化における TRPM7 の役割

○緒方佳代子[1,2]，岡　　暁子[2]，福島　秀文[1]，岡本富士雄[1]，永嶌　勝之[1]，尾崎　正雄[2]，岡部　幸司[1]

[1]福歯大　細胞生理
[2]福歯大　成育小児歯

【目的】歯の石灰化の分子機構に関しては未だ不明なことが多い．今回我々は，$Ca^{2+}$や$Mg^{2+}$等のミネラル輸送を担う陽イオンチャネルでありながら，酵素としてのキナーゼドメインを併せ持つユニークな”Chanzime”TRPM7 に着目し，歯の石灰化における役割について検討を行った．【方法と結果】(1)マウスの全身における TRPM7 の発現部位を in situ hybridization および real time PCR を用いてスクリーニングした結果，他の組織に比べ歯において非常に高い発現を認めた．(2) TRPM7 発現の免疫組織学的な解析により，胎生 16.5 日齢以降の歯胚の歯乳頭およびエナメル器に発現を認め，さらに発生が進むと，TRPM7 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に高い発現を認めた．(3)エナメル芽細胞株 SF2 及び象牙芽細胞株 mDP 細胞を用いて検討した結果，両細胞株とも高い TRPM7 の発現を認めると共に，パッチクランプ法にて TRPM7 様イオン電流も検出された．(4) shRNA を用いた SF2 及び mDP 細胞の TRPM7 ノックダウンにより，先述の TRPM7 様電流量が減弱した．さらに石灰化誘導の培養において TRPM7 発現を抑制すると，VonKossa 染色の減弱，つまり石灰化の抑制が認められたが，一方で ALP 染色は影響を受けなかった．(5)TRPM7 分子のキナーゼドメインの機能解析のために，キナーゼ機能を欠失した TRPM7 キナーゼ変異マウスを用いて，歯の組織学的解析およびマイクロ CT 解析を行ったところ，変異マウスの切歯エナメル質に形成不全が観察された．【結論】以上のことから，TRPM7 は，エナメル芽細胞および象牙芽細胞に特徴的に発現しているチャネル蛋白であり，エナメル質形成，象牙質形成における石灰化過程で重要な役割を持つことが示唆された．非会員共同研究者：圓谷智之，片桐千秋，松下正之（琉球大学医学部　分子・細胞生理）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Elucidating the role of the dominant expression TRPM7 in tooth and its calcification

○Ogata K[1,2]，Oka K[2]，Fukushima H[1]，Okamoto F[1]，Nagashima K[1]，Ozaki M[2]，Okabe K[1]

[1]Sec Cell Physiol, Dept Physiological Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll
[2]Sec Pediatr Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll

TRPM7 is an unusual bi-functional protein containing an ion channel covalently linked to a protein kinase domain. Here, we report the TRPM7, predominantly expressed in ameloblast and odontoblast, play the pivotal role in calcification of dentin and enamel formation. Screened the TRPM7 expression profile by in situ hybridization and tissue specific q-PCR analysis was shown that the predominant expression of TRPM7 mRNA in teeth to compare with other organs. In immunohistochemical analysis, TRPM7 was started to express in differentiated ameloblast and odontoblast from the bell stage. In lower incisor, TRPM7 expression of ameloblasts was seen throughout the entire process of amelogenesis. To exam the functional role of TRPM7 in calcification, we performed knockdown TRPM7 in ameloblast (SF2)/odontoblast (mDP) cell lines using shRNA system. TRPM7 shRNA suppressed the expression of TRPM7 and TRPM7-like ionic current in SF2 and mDP. After cultured each cells with osteogenic differentiation medium, staining of von Kossa was clearly diminished, but ALP activity was not changed by TRPM7 depletion. Lastly, in vivo analyze of TRPM7 K1648R mice which loss-of kinase function of TRPM7 revealed critical role in this mechanism. These results demonstrate the crucial importance of TRPM7 function during mineralization of both enamel and dentin formation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-33 象牙芽細胞における store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）（$Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$（CARC）channels）の発現

○木村　麻記，佐藤　正樹，小島　佑貴，東川明日香，鴅田みゆき，小倉　一宏，望月　浩幸，田崎　雅和，澁川　義幸

東歯大　生理

象牙質形成や感覚受容機構における象牙芽細胞の $Ca^{2+}$ シグナリングは，細胞外刺激誘発性 $Ca^{2+}$ 流入と，細胞膜 G タンパク質共役型受容体活性化によるイノシトール 3 リン酸（$IP_3$）生成，あるいはリアノジン感受性細胞内ストアからの $Ca^{2+}$ 放出によって調節される．細胞内 $Ca^{2+}$ ストアにおける $IP_3$ 受容体活性と，細胞内 $Ca^{2+}$ のリアノジン受容体への結合は，ストアから $Ca^{2+}$ 放出を誘発する．$Ca^{2+}$ 放出により増加した細胞内 $Ca^{2+}$ は，$Ca^{2+}$ ストア（小胞体）膜上の $Ca^{2+}$-ATPase（sarcoendoplasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase（SERCA））によってストア内に再び取り込まれる（refilling）が，$Ca^{2+}$ 放出によってストア内 $Ca^{2+}$ が枯渇（store depletion）すると，細胞膜上の $Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$（CARC）channels（あるいは store-operated $Ca^{2+}$ channels（SOCs））を介し細胞外から $Ca^{2+}$ が流入する（store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE））（以後，SOCE で統一）．我々は以前，象牙芽細胞に SOCE が生じる事を報告したが（Shibukawa and Suzuki, 2003），その詳細な活性化過程，活性化分子機構，薬理学的特性は不明のまま残してきた．そこで本研究では，象牙芽細胞における SOCE の薬理学的特性を検討した．新生仔ラット切歯から歯髄スライス標本を作製し，象牙芽細胞マーカーに陽性を示す細胞を得た．この急性単離象牙芽細胞から fura-2 を用いた細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定を行った．細胞外 $Ca^{2+}$ 非存在下で，$Ca^{2+}$ ストア上の SERCA を阻害する thapsigargin を投与すると一過性に $[Ca^{2+}]_i$ が増加した．$[Ca^{2+}]_i$ が静止レベル付近まで戻った後，2.5 mM $Ca^{2+}$ を含む Krebs 溶液を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した．その増加は SOCE 阻害薬の投与により抑制された．象牙芽細胞において $Ca^{2+}$ ストア内の $Ca^{2+}$ の枯渇は SOCE を活性化することが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）（$Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$（CRAC）channels）in rat odontoblasts

○Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Tazaki M, Shibukawa Y

Dept Physiol, Tokyo Dent Coll

$Ca^{2+}$ signaling in dentin formation and/or sensory transduction in odontoblasts involves two closely coupled components: $Ca^{2+}$ release from the intracellular $Ca^{2+}$ stores and/or external stimuli-induced $Ca^{2+}$ influx from the extracellular medium. The internal mobilization of $Ca^{2+}$ is mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors or by ryanodine receptors on the $Ca^{2+}$ stores（$IP_3$- and ryanodine-sensitive $Ca^{2+}$ stores）. In a previous study, we reported that store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）was activated in response to depletion of $Ca^{2+}$ stores in odontoblasts（Shibukawa and Suzuki, 2003）. However, the detailed process and molecular mechanism for activation as well as pharmacological properties of SOCE remain unclear. In this study, we investigated the pharmacological properties of SOCE in odontoblasts. Odontoblast marker protein-positive cells were acutely isolated from the incisors of newborn Wistar rats, and intracellular free calcium concentration（$[Ca^{2+}]_i$）was measured by fura-2 fluorescence. In the absence of extracellular $Ca^{2+}$, thapsigargin, a sarcoendoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase（SERCA）inhibitor, induced transient increases in $[Ca^{2+}]_i$. After $[Ca^{2+}]_i$ returned to the near-resting levels, subsequent application of 2.5 mM extracellular $Ca^{2+}$ increased $[Ca^{2+}]_i$. The $[Ca^{2+}]_i$ increases were suppressed by SOCE inhibitors. The results suggested that the depletion of $Ca^{2+}$ stores activates SOCE in odontoblasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-34　マウス歯周炎モデルにおける歯周組織の機械痛覚に対する CXCR4 の関与

○長嶋　秀和[1]，篠田　雅路[2]，菅野　直之[1]，佐藤　秀一[1]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　歯周病
[2]日本大　歯　生理

【目的】一般に慢性炎症性疾患では痛みが持続することが多いにもかかわらず，なぜ歯周炎では痛みがなく炎症が進行するのか不明である．歯周炎の病原菌である *P. gingivalis*（*P.g.*）の病原因子として繊毛蛋白（Fimbriae）が知られており，免疫細胞に発現するケモカイン受容体の一つである CXCR4 に Fimbriae が結合することにより炎症性サイトカインの放出が抑制されることが報告されている．また，炎症性サイトカインは末梢の侵害受容器の興奮性を増強し，その結果として疼痛をもたらすことが知られている．このため，歯周炎では CXCR4 を介したメカニズムによって痛みが引き起こされないという仮説を立てた．本研究では，臼歯の絹糸結紮後 *P.g.* を播種することによって歯周炎モデルマウスを作製し，CXCR4 がいかなるメカニズムで歯周炎による歯周組織の痛み抑制に関与するかを解明することを目的とした．【方法】C57BL/6 マウス（7w，♂）の上顎第二臼歯周囲を 5-0 絹糸にて結紮し *P.g.* を播種（*P.g.* 群），または上顎第二臼歯頬側歯肉に Complete Freund's adjuvant（CFA）を注射した（CFA 群）．浅麻酔下にて上顎第二臼歯頬側歯肉に機械刺激を与え，頭部引込め反射閾値（HWT）を経日的に測定した．さらに，*P.g.* 群に対し上顎第二臼歯頬側歯肉に CXCR4 抗体を連続投与し（100 μg/day），機械刺激に対する HWT の変化を解析した．【結果および考察】*P.g.* 群では，上顎第二臼歯頬側歯肉への機械刺激に対する HWT に変化は見られなかったが，CFA 群において HWT が有意に低下した．*P.g.* 群において上顎第二臼歯頬側歯肉への CXCR4 抗体の連続投与により，処置後 2，4 日後に逃避反射閾値が有意に低下した．以上の結果から，歯周病原菌の感染による歯周炎では CXCR4 を介したシグナルが機械痛覚の抑制に関与する可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of CXCR4 in mechanical sensitivity of periodontitis-mice

○Nagashima H[1]，Shinoda M[2]，Sugano N[1]，Sato S[1]，Iwata K[2]

[1]Dept Periodont, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Periodontitis is the chronic inflammatory disease in which alveolar bone loss occurs gradually without periodontal pain. However, it is unclear why periodontal pain is not caused during persistent inflammatory reaction in periodontal tissue. It is known that chemokine releases from immune cells are blocked by CXCR4 signaling, which assume that CXCR4 is involved in pain modulation in periodontal inflammation. We therefore examined the role of CXCR4 on mechanical sensitivity of periodontitis-mice. A 5-0 silk ligature was tied around the maxillary second molar and *P. gingivalis*（*P.g.*）was applied to the tied ligature（*P.g.* group), or complete Freund's adjuvant（CFA）was injected into the maxillary gingival tissue（CFA group). The head withdrawal threshold to mechanical stimuli（MHWT）applied to the maxillary gingival tissue was measured. The MHWT was also measured with/without successive CXCR4 neutralizing antibody administration into the maxillary gingival tissue in *P.g.* group. The MHWT in *P.g.* group did not change, whereas the MHWT was significantly decreased in CFA group. The successive administration of the CXCR4 neutralizing antibody decreased the MHWT in *P.g.* group. These results suggest that CXCR4 signaling in periodontal tissue is involved in pain relief in periodontitis-mice.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-35 KK-Ay 糖尿病モデルマウスにおける唾液腺機能低下

○宗政　翔[1]，向坊　太郎[1]，近藤　祐介[1]，楠田優一郎[1]，宮城　勇大[1]，正木　千尋[1]，細川　隆司[1]，中本　哲自[1,2]

[1]九歯大　口腔再建リハ
[2]松本歯大　歯科補綴

［目的］口腔乾燥症は口腔環境に大きな影響を及ぼし，患者 QoL 低下させる．糖尿病は口腔乾燥症と関連があるとされるが，その詳細なメカニズムについては不明な点が多い．本研究では 2 型糖尿病モデルマウスの唾液分泌機能を評価することで，糖尿病が口腔乾燥症を引き起こすメカニズムを解明することを目的とした．［方法］糖尿病モデルマウスとして KK-Ay マウスを，コントロールとして C57Bl/6J マウスを用いた．唾液腺機能の評価には，Ex vivo マウス顎下腺灌流モデルを用いて Carbachol（CCh: 0.3 $\mu$M）刺激による唾液分泌量および唾液中イオン濃度（$Na^+$，$Cl^-$）を測定した．腺房細胞と導管細胞それぞれの面積は Hematoxylin-Eosin 染色像から解析した．さらに，細胞内シグナリングの評価として分散細胞を用いた $Ca^{2+}$ イメージングを行い，CCh 刺激による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を評価した．［結果と考察］KK-Ay マウスではコントロールと比べ有意に CCh 刺激時唾液分泌量が低下し，唾液中の $Na^+$ および $Cl^-$ 濃度は有意に低値を示した．組織学的な解析から，KK-Ay マウスでは導管細胞面積が上昇していたが，腺体の重量も大きく，腺房細胞量は KK-Ay とコントロールマウスの間に有意な差はなかった．細胞内 $Ca^{2+}$ の上昇は KK-Ay マウスにおいて有意に低値を示した．以上の結果より，糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウスでは細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇が抑制され，それにより唾液分泌能が低下していること，また導管細胞の増加が唾液中 $Na^+$ および $Cl^-$ 濃度の低下に関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Salivary dysfunction in diabetic KK-Ay mouse model

○Munemasa T[1], Mukaibo T[1], Kondo Y[1], Kusuda Y[1], Miyagi Y[1], Masaki C[1], Hosokawa R[1], Nakamoto T[1,2]

[1]Dept Oral Reconstruction and Rehabilitation, Kyusyu Dent Univ
[2]Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ

Objectives: Xerostomia has been reported to be closely associated with diabetes. We have analyzed salivary gland function in a diabetes mouse model to explore how diabetes induces xerostomia. Methods: In this study, we used the KK-Ay mouse as the diabetes model and the C57/Bl6J mouse as the control. To assess salivary gland function, we measured the saliva from perfused submandibular gland, acinar and ductal areas using Hematoxylin-Eosinin staining, intracellular $Ca^{2+}$ increase in dispersed acinar cells. Results: The amount of saliva secreted in the KK-Ay mouse was significantly lesser than control mouse. The concentrations of $Na^+$ and $Cl^-$ were also significantly reduced in the saliva of the KK-Ay mouse. However, ductal area of the submandibular gland in the KK-Ay mouse increased, whereas acinar volume remained the same in both mouse models as the weight of the gland increased in the KK-Ay mouse. The increase in the level of intracellular $Ca^{2+}$ was significantly less in the KK-Ay mouse. These results demonstrate that submandibular fluid secretion diminished in KK-Ay diabetic mice because of the inhibition of intracellular $Ca^{2+}$ increase. Ductal volume increased in the KK-Ay mouse, possibly leading to a decrease in the concentrations of $Na^+$ and $Cl^-$ in the secreted saliva.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-36 *in vitro* 振動刺激負荷装置の開発と振動刺激が培養骨芽細胞分化に及ぼす影響

○太田　岳，千葉　美麗，林　治秀

東北大　院歯　口腔生理

【目的】我々は，歯周組織への機械的な振動刺激負荷により歯科矯正学的歯の移動速度が促進されることを報告した．しかしながら，本現象のメカニズムの詳細はいまだ不明な点が多い．本研究は，*in vitro* 振動刺激負荷装置を開発し，振動刺激のパラメータが骨芽細胞分化に及ぼす影響を検証する．

【方法】ピエゾ素子により周波数および加速度を制御する *in vitro* 振動負荷装置を開発し，タイプ I コラーゲンでコーティングしたシリコーン膜製の培養面中央に加速度 1.0-175 m/s$^2$，周波数 30-90 Hz，垂直振幅 0-2.5 mm の正弦波振動を負荷した．ストレインゲージ法を用いて細胞培養面の振動様相を動ひずみ計にて実測し，ひずみの分布を調べた．さらに，ロゼット解析にて最大および最小ひずみの方向を求めた．次に，骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用い，振動刺激を 10 分間負荷した．24 時間後，骨形成マーカー遺伝子と *Gapdh* の発現をリアルタイム PCR 法によって解析した．

【結果】(1) 振動により培養表面に発生するひずみは加速度の増加に伴い線形に上昇し，周波数の増加に伴い減少した．ひずみの大きさは，時間を横軸とする正弦波形で，位置によって逆位相を示し，中央を通る主ひずみの方向が観察された．(2) 骨芽細胞は，周波数 60 Hz，加速度 5.0 m/s$^2$ の振動条件下で，*Runx2*，*Osterix*，*Type I collagen*，*Alkaline phosphatase* の遺伝子発現がコントロール群に対して有意に上昇（$p<0.05$）し，一方，加速度 1.0 m/s$^2$の条件下では有意な差は見られなかった．

【結論】我々は，負荷した振動刺激の周波数，加速度による培養表面の動的ひずみ様相と分布が明らかな振動周波数と加速度を正確に制御する振動負荷装置を開発し，細胞培養表面上のひずみ計測を $\mu$ ストレインレベルで確立した．また，振動刺激による骨芽細胞の分化誘導には，周波数のみならず加速度が重要なパラメータであることが示唆された．

**【利益相反】** 利益相反状態にはありません．

## Induction of osteogenic differentiation stimulated by vibration

○Ota T，Chiba M，Hayashi H

Div Oral Physiol, Tohoku Univ, Grad Sch Dent

Although vibrational stimulation has been shown to accelerate orthodontic tooth movement, the mechanism involved remains unclear. In this study, we developed an *in vitro* vibrational loading system with regulated frequency and acceleration in order to investigate the effects of vibration on osteoblasts. The directions of the maximum and minimum principal strains and the strain distribution on the surface of a cell culture silicone membrane were determined using the strain gauge method. After successfully establishing vibrational conditions over the range of 1.0-175 m/s$^2$ and 30-90 Hz, mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells were subjected to vibrational stimulation for 10 minutes. Twenty-four hours after stimulation, the cellular gene expression was analyzed using real-time polymerase chain reaction. We found that the strain increased lineally with the magnitude of acceleration and that opposite phases of the strain wave were observed depending on the position of the cell culture surface. Vibrational stimulation significantly increased the expression of osteogenic marker genes including *Runx2*, *Osterix*, *Type I collagen*, and *alkaline phosphatase* at 5.0 m/s$^2$ and 60 Hz, but not at 1.0 m/s$^2$ and 60 Hz. In conclusion, these results suggest that not only frequency but also acceleration are important parameters that regulate osteoblast differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-37　TNBS 誘発舌熱痛覚過敏に対する三叉神経節内 p38 のリン酸化の役割

○丸野　　充[1,2]，伊藤　玲央[1,2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　補綴
[2]日本大　歯　生理

【目的】臨床において，舌に器質的変化がないにもかかわらず舌の疼痛を訴える患者が存在する．本研究では，組織に器質的な変化を起こすことなく痛覚過敏を引き起こす疼痛誘発物質 2,4,6-trinitorobennzenne sulfonic acid（TNBS）を用いて，TNBS 誘発舌熱痛覚過敏発症モデルマウスを作製し，舌熱痛覚過敏発症に対する三叉神経節（TG）ニューロンにおける Mitogen-activated Protein Kinase の一つである p38 のリン酸化の役割を明らかにすることを目的とした．【方法】C57/BL6 雄性マウス（7W）の舌背に TNBS（10 mg/ml）を 1 時間処置した．浅麻酔下にて，TNBS 処置後 3 日目より舌背に熱刺激を加え，熱刺激に対する逃避反射潜時を経日的に計測した．さらに，あらかじめ舌に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド（FG）を投与し，TNBS 処置 5 日後の FG 標識 p38 陽性またはリン酸化 p38 陽性 TG ニューロン数を免疫組織学化学的手法により解析した．【結果および考察】TNBS 処置後 5 日目より 15 日目まで舌への熱刺激に対する逃避反射潜時は有意に短縮した．TNBS 処置 5 日後，p38 陽性舌投射 TG ニューロン数に変化は認められなかったが，リン酸化 p38 陽性舌投射 TG ニューロン数は有意に増加した．以上のことから，舌を TNBS 処置することによって舌投射 TG ニューロンにおいて p38 がリン酸化し，これらの TG ニューロン活動が亢進することによって舌に熱痛覚過敏が発症する可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## p38 phosphorylation in trigeminal ganglion neuron contributes tongue heat hypersensitivity induced by TNBS application

○Maruno M[1,2]，Ito R[1,2]，Shinoda M[2]，Iwata K[2]

[1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Clinically, it is well known that tongue pain sometimes occurs without any tissue damage in the tongue. However, the exact mechanism of such tongue pain remains unclear. In this study, we examined the involvement of p38 phosphorylation in trigeminal ganglion（TG）neurons in tongue heat hypersensitivity using a mouse model of tongue pain without pathological changes. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid（TNBS, 10 mg/ml）was applied on the dorsum of tongue for one hour. The head-withdrawal latency（HWL）to heat stimulation applied to the dorsum of tongue significantly shortened on day 5 after TNBS application, and the shortening of HWL was lasting for 15 days. In advance, retrograde labeling tracer, Fluoro Gold（FG）was administrated into the dorsum of tongue, the number of FG-labeled p38 or phospho-p38 positive TG neurons was counted. The number of FG-labeled phospho-p38 positive but not p38 positive TG neurons significantly increased on day 5 after TNBS application. These finding suggest that phosphorylation of p38 in the TG neurons innervating tongue induced by TNBS application enhances their neuronal excitability, resulting in heat hyperalgesia in the tongue.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-38 代謝型グルタミン酸受容体を介したシグナルの癌性疼痛および癌の増殖・分化への関与

○本田　訓也，篠田　雅路，岩田　幸一

日本大　歯　生理

［背景および目的］Group 1 として分類される代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）である mGluR1 および mGluR5 が，末梢神経損傷後の異常疼痛に関与することが知られている．さらに，様々な mGluR サブタイプが癌細胞の膜上に発現し，その受容体を介したシグナルが癌細胞の増殖・分化に関与する可能性が示唆されている．しかしながら，癌性疼痛および癌細胞の増殖・分化に対する mGluR5 の役割は不明である．そこで，本実験は癌性疼痛の発症・維持および癌細胞の増殖・分化のメカニズムを解明することを目的とした．
［方法］ラット由来扁平上皮癌細胞（SCC-158, 1.0 x $10^6$ cells/30 $\mu$l with PBS）を顔面皮下に播種した頬粘膜癌モデルラットを用い，経日的な顔面部への機械刺激に対する逃避反射閾値（HWRT）および腫瘍サイズの測定を行った．また，培養 SCC-158 細胞および頬粘膜癌モデルラットの顔面皮膚における mGluR5 免疫染色を行った．さらに，頬粘膜癌モデルラットの顔面皮下に mGluR5 の選択的アンタゴニストである MTEP（10 mM, 2.5 $\mu$l/h）の持続投与を行い，経日的な機械刺激に対する HWRT および腫瘍サイズの測定を行った．
［結果］SCC-158 播種により PBS 処置群と比較し，機械刺激に対する HWRT は有意に減少し，腫瘍サイズは有意に増加した．また，mGluR5 は培養 SCC-158 細胞上および腫瘍組織における Ki-67 陽性細胞上のみならず，1 次神経終末の末梢端にも発現を認めた．さらに，MTEP の持続投与により SCC-158 誘発機械痛覚過敏は有意に回復し，腫瘍サイズも有意に減少した．
［結論］以上の結果より，mGluR5 を介したシグナルが顔面領域における癌誘発機械痛覚過敏および癌の増殖・分化に関与することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Metabotropic glutamate receptor signaling is involved in cancer pain and cancer growth

○Honda K，Shinoda M，Iwata K

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

It is known that peripheral metabotropic glutamate receptor（mGluR）1 and 5 are involved in abnormal pain following peripheral nerve injury. Moreover, mGluRs express in cancer cell membrane and mGluRs signaling may induce cancer cell proliferation. However, involvement of mGluR5 signaling in cancer pain and cancer growth is not fully clarified. The aim is to clarify the mechanisms underlying initiation/maintenance of cancer pain and cancer cell proliferation. The head-withdrawal reflex threshold（HWRT）to mechanical stimulation of the facial skin and facial skin thickness were analyzed in facial SCC-158-inoculated rats. The expression of mGluR5 in cultured SCC-158 cells and SCC-158-inoculated facial skin was examined. Moreover, we analyzed HWRT to mechanical stimulation and facial skin thickness in facial SCC-158 inoculated rats with mGluR5 selective antagonist MTEP continuous administration. HWRT to mechanical stimulation was significantly decreased and facial skin thickness was significantly increased in SCC-158-inoculated rats compared to PBS-injected rats. mGluR5 was expressed in cultured SCC-158 cells, Ki-67 immunoreactive cells in tumor tissue and peripheral nerve ending. The decreased HWRT and the increased facial skin thickness were significantly recovered by MTEP continuous administration. These findings suggest that mGluR5 signaling is involved in cancer induced mechanical hypersensitivity and cancer growth in orofacial region.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-39 顎関節炎に随伴した咬筋痛に対する活性型 satellite cell の役割

○伊藤　玲央[1,2]，丸野　　充[1,2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　補綴
[2]日本大　歯　生理

【目的】臨床の現場において，顎関節症患者の多くは，咬筋の圧痛を訴える場合が多い．顎関節痛と咬筋痛との間に何らかの関与があると考えられるが詳細は不明である．最近，三叉神経節（TG）内の活性型 satellite cell が顎顔面部の異常疼痛発症に関与することが報告され，顎関節炎によって引き起こされる口腔顔面痛に活性型 satellite cell が関与する可能性が考えられるが詳細は明らかにされていない．そこで，顎関節炎に随伴する咬筋痛に対する TG 内活性型 satellite cell の役割を検討した．【方法】深麻酔下にて SD 系雄性ラット（7W）の顎関節相当部に Complete Freund's adjuvant（CFA）を投与した後，受動的開閉口運動（1 Hz, 30 min/day）を行い，顎関節炎モデルラットを作成した．顎関節 CFA 投与後，顎関節および咬筋相当部への圧刺激に対する頭部逃避反射閾値を経日的に測定した．CFA 投与後 3 日目サーモグラフィーを用い，顎関節および咬筋相当部の顔面皮膚表面温度を計測した．さらに，あらかじめ逆行性トレーサーを咬筋に注射し，咬筋投射 TG ニューロン周囲の satellite cell 活性を glial fibrillary acidic protein（GFAP）発現を指標とし，免疫組織化学的に解析した．【結果および考察】顎関節 CFA 投与後，顎関節および咬筋相当部への圧刺激に対する頭部逃避閾値は有意に低下した．CFA 投与後 3 日目，顎関節相当部の顔面皮膚表面温度が上昇し，咬筋投射 TG ニューロン周囲の satellite cell の活性化が認められた．以上の結果から，顎関節炎により，satellite cell の活性化を介した咬筋投射 TG ニューロンの活動性亢進が誘導され，結果的に咬筋痛が発症した可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of activated satellite cells in masseter muscle pain spread following temporomandibular joint inflammation

○Ito R[1,2]，Maruno M[1,2]，Shinoda M[2]，Iwata K[2]

[1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

It is well known that patients suffering from temporomandibular joint（TMJ）disorders sometimes complain of masseter muscle pain. However, the underlying pathophysiology in such pain is still unknown. Recently, activated satellite cells in the trigeminal ganglion（TG）are known to contribute pain modulation. In the present study, we investigated the involvement of activated satellite cells in masseter muscle pain associated with TMJ inflammation induced by complete Freund's adjuvant（CFA）injection. CFA was injected into the unilateral TMJ, and a daily passive opening and closing jaw movement（1 Hz, 30 min/day）was performed under deep anesthesia. The head-withdrawal thresholds（HWTs）to mechanical pressure applied to the TMJ and masseter muscle were significantly reduced on day 3 after CFA injection, and the reduction of HWTs were lasting for 14 days. On day 3, the surface temperature of the TMJ significantly increased. In addition, the number of TG neurons innervating masseter muscle which were encircled with glial fibrillary acidic protein immunoreactive cells significantly increased. The present findings suggest that satellite cells encircling TG neurons innervating masseter muscle are activated by TMJ inflammation and the TG neuronal excitability is enhanced attributable to the satellite cell activation, resulting in masseter muscle pain spread.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-40 青斑核ニューロンと三叉神経中脳路核ニューロン間のシナプス結合様式の解析

○尹　東旭，齋藤　充，佐藤　元，河野　奨，豊田　博紀，姜　英男
大阪大　院歯　顎治

青斑核は橋の背側に位置し，ノルアドレナリン作動性ニューロンを含む神経核である．これらのニューロンは中枢神経全体に広く投射し，覚醒レベルの制御，選択的注意，およびストレス反応に関与している．閉口筋を支配する固有感覚ニューロンは三叉神経中脳路核に位置しており，その内側に青斑核が近接して存在する．また，三叉神経中脳路核ニューロンは，青斑核ニューロンからシナプス入力を受けることが報告されている．三叉神経中脳路核ニューロンは，2 種類の細胞体スパイクを呈し，一つは，末梢の感覚受容器に由来する軸索スパイクが細胞体へと侵入して生じるものであり，もう一つは，細胞体へのシナプス入力により生成されるものである．我々はこれまでに，三叉神経中脳路核ニューロンにおいて，グルタミン酸受容体電流が過分極誘発性電流（h 電流）により減少し，その結果，スパイクの発生が抑制されることを明らかにしている．また，我々は最近，三叉神経中脳路核ニューロンで誘発される h 電流が，パルス通電または微小電極刺激によって青斑核ニューロンを活性化した際に抑制されることを明らかにした．本研究でははじめに，青斑核ニューロンからホールセル電流固定記録を行い，発火特性を検討した．その結果，青斑核ニューロンは，電位依存性に不活性化する $K^+$電流および低閾値型 $Ca^{2+}$スパイクを示すことが明らかとなった．我々は現在，近傍の二つの青斑核ニューロンからのホールセル同時記録や $Ca^{2+}$イメージング法を用いた実験により，青斑核ニューロン間の同期化機構を検討している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Synaptic connections between locus coeruleus and trigeminal mesencephalic nucleus neurons

○Yin D，Saito M，Sato H，Kawano T，Toyoda H，Kang Y
Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

The locus coeruleus（LC）is a small population of noradrenergic neurons located in the rostral pons with projections widely distributed in the central nervous system, thereby involved in many brain functions such as arousal, attention and stress. The proprioceptive sensory neurons innervating jaw-closing muscles are exceptionally located in the mesencephalic trigeminal nucleus（MTN）, which medially adjoins or intermingles with the LC nucleus. It has been reported that the MTN neurons receive synaptic inputs from the LC neurons. The MTN neurons can display two distinct firing patterns by either relaying spike trains arising from muscle spindles or generating bursts in response to synaptic inputs. The MTN neurons express hyperpolarization-activated current（Ih）, which can decrease glutamate receptor current, thereby suppressing bursts. We recently found that Ih in the MTN neurons is reduced when the LC neurons are activated by injection of current pulses or microstimulation. In the present study, we first investigated the electrophysiological properties of the LC neurons using whole-cell current-clamp recordings. We found that the LC neurons show voltage-dependently inactivating $K^+$ currents and low-threshold $Ca^{2+}$ spikes. We are currently investigating the mechanism of synchronization among LC neurons by performing dual whole-cell patch-clamp recordings and $Ca^{2+}$ imaging experiments.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-41 PRIP-1/2 ダブルノックアウトマウスのバレル皮質第 3 層錐体細胞における SOCE の増大

○河野　奨[1]，豊田　博紀[1]，齋藤　充[1]，佐藤　元[1]，尹　東旭[1]，兼松　隆[2]，平田　雅人[3]，姜　英男[1]

[1]大阪大　院歯　口腔生理
[2]広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理
[3]九大　院歯　口腔生化

Phospholipase C-related but catalytically inactive protein（PRIP-1/2）の 2 つのサブタイプは $IP_3$ に結合する蛋白質である．PRIP-1 ノックアウト（KO）マウスの培養大脳皮質神経細胞においては，$IP_3$-induced $Ca^{2+}$ release が減弱し，一方，PRIP-2 KO マウスの造血性 B 細胞では，Store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）が増大すると報告されている．本研究では，細胞内 $Ca^{2+}$ ストアからの $Ca^{2+}$ 放出と SOCE が野生型（WT）と PRIP-1/2 double KO（DKO）マウスのバレル皮質第 3 層錐体細胞間で異なるか否かを，$Ca^{2+}$ イメージング法を用いて検討した．Fura-2 AM を負荷した第 3 層錐体細胞において，細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の変化を F340/F380 Ratio の変化として測定した．20 mM $K^+$ と 20 mM カフェインを含む人工脳脊髄液（High $K^+$/caffeine ACSF）を細胞外灌流すると，細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の一過性の著しい上昇が生じた．これは $Ca^{2+}$-induced $Ca^{2+}$ release（CICR）として知られており，その最大振幅と半減期は PRIP-DKO 錐体細胞の方が WT に比較して大きかった．次に CICR に続いて生じる SOCE に差があるか否かを調べるために，CICR の直後に細胞外 $Ca^{2+}$ 濃度を 5 分間 0 mM にし，その後 2 mM に上昇させ，細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を観察した．その結果，PRIP-1/2 DKO 第 3 層錐体細胞では SOCE が WT と比べて増強されている可能性が強く示唆された．また，DKO と WT において CICR と SOCE の相関関係を比較・検討したところ，両方とも linear な関係を示したが，CICR に伴う SOCE は DKO の方が WT よりも強く認められた．この結果より，PRIP が小胞体内 $Ca^{2+}$ 濃度の減少に従って変動する Orai と STIM との結合確率を調節している可能性が示唆された．さらに，PRIP-1/2 分子と Orai や STIM 分子との結合の有無を分子生物学的に調べた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Enhanced SOCE in layer 3 pyramidal cells in the barrel cortex of PRIP-1/2 double KO mice

○Kawano T[1]，Toyoda H[1]，Saito M[1]，Sato H[1]，Yin D[1]，Kanematsu T[2]，Hirata M[3]，Kang Y[1]

[1]Dept Neurosci and Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Div Integrated Med Sci Dept Dent Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci
[3]Lab Mol and Cell Biochem Fac Dent Sci Kyushu Univ

The two subtypes of phospholipase C-related but catalytically inactive protein（PRIP-1/2）are $IP_3$-binding proteins. $IP_3$-induced $Ca^{2+}$ release was impaired in cultured PRIP-1 KO cortical neurons while store-operated $Ca^{2+}$ entry（SOCE）was enhanced in PRIP-2 KO B cells. In the present study, we aimed to clarify the differences in SOCE between WT and PRIP-1/2 double KO（DKO）layer 3 pyramidal cells（PCs）in the mice barrel cortex. A bath solution containing high $K^+$ and caffeine induced CICR. The mean peak amplitude of CICR was significantly larger in DKO PCs than in WT. We next examined whether there are any differences in SOCE induced following CICR between DKO and WT PCs. $[Ca^{2+}]_o$ was decreased from 2 to 0 mM for 5 minutes immediately after CICR and then $[Ca^{2+}]_o$ was returned to 2 mM to observe the SOCE. DKO PCs showed more potent SOCE compared to WT. In both DKO and WT PCs, there were significantly positive correlations between CICR and SOCE, while SOCE was more sharply dependent on CICR in DKO than in WT PCs. These results suggested that PRIP regulated the $Ca^{2+}$-dependent binding probability between Orai and STIM, although biochemical method revealed no binding affinity between PRIP-1/2 and Orai1 or STIM1.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-42 咬筋運動ニューロン樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニンの効果

○壇辻　昌典[1,2]，中村　史朗[2]，中山希世美[2]，望月　文子[2]，清本　聖文[2]，尾関　雅彦[1]，井上　富雄[2]

[1]昭和大　歯　歯科インプラント
[2]昭和大　歯　口腔生理

【目的】咬筋神経運動ニューロン（MMN）は巨大な樹状突起を持ち極めて多様なシナプス入力を受け取る．セロトニン作動性ニューロンは脳幹に存在し，中枢神経全体に出力を送り機能を調節する．MMN は樹状突起上で豊富なセロトニン入力を受けるが，樹状突起上でどのような調節を行うかの詳細は不明である．そこで本研究では，幼若ラット MMN 樹状突起上でケージドグルタミン酸にレーザー光を照射することでグルタミン酸を解離し，樹状突起上の限局した部位の刺激により誘発される脱分極応答に対するセロトニン（5-HT）の効果を解析した．【方法】咬筋運動ニューロンを標識するために，生後 2-13 日齢の Wistar 系ラット咬筋に逆行性蛍光トレーサーを注入した．トレーサー注入から 2～3 日後，深麻酔下で脳幹を摘出し，三叉神経運動核を含む前頭断脳幹スライス標本（400 μm 厚）を作製した．MMN からホールセルパッチクランプ記録を行い，スライス標本に 300 μM MNI-caged L-glutamate を灌流投与した後，波長 365 nm の窒素パルスレーザーを照射してグルタミン酸を局所的に解離し，1 μM テトロドトキシン存在下で誘発された電位応答を記録した．記録中に順行性神経トレーサーであるバイオサイチンを細胞内に注入し，記録完了後二光子顕微鏡にて樹状突起の形態を観察し刺激部位を確認した．【結果】生後 2-5 日齢では，細胞体周囲の樹状突起へのレーザー光照射で，短潜時の脱分極応答が誘発された．5-HT 投与により，膜電位は上昇し，レーザー光照射による脱分極応答の振幅および持続時間が増加した．5-HT の効果は，刺激部位に関わらず，濃度依存的に増大した．生後 9-12 齢でも，5-HT により脱分極応答は増大したが，2-5 日齢に比べ増大率は減少した．以上の結果から，5-HT は MMN の樹状突起でのグルタミン酸性入力を増強し，MMN の興奮性を調節することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Serotonergic modulation of glutamate-evoked responses in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons

○Dantsuji M[1,2], Nakamura S[2], Nakayama K[2], Mochizuki A[2], Kiyomoto M[2], Ozeki M[1], Inoue T[2]

[1]Dept Oral Implant Dent, Showa Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

[Objectives] Masseter motoneurons (MMNs) have the well-developed dendrites where MMNs receive a variety of inputs. MMNs have been reported to have received serotonergic inputs on the dendrites; however it is unclear how serotonin modulates dendritic responses in MMNs. In this study we examined effects of serotonin on glutamate-evoked responses in the dendrites. [Methods] The experiments were performed with the brainstem slices (400 μm thick) from postnatal day (P) 2-13 rats. We made whole-cell patch clamp recordings from retrogradely-labeled MMNs. MNI-caged glutamate (300 μM) was added to the bathing solution, and focal photolysis of caged glutamate was accomplished using a 365 nm nitrogen-pulsed laser system. All recordings were performed in the presence of tetrodotoxin (1 μM). [Result] Focal laser uncaging of caged glutamate on the proximal dendrites evoked depolarizing responses in MMNs. Bath application of serotonin induced membrane potential depolarization and increased amplitude and duration of the laser-evoked responses in dose-dependent manner in P2-5 MMNs. Similar but weaker effects of serotonin on the laser-evoked responses were observed in P9-12 MMNs. [Conclusions] These results suggest that serotonin may enhance glutamate-induced depolarization in the dendrites of the developing MMNs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-43 ヒスタミンはシナプス前 H1 受容体を介して三叉神経中脳路核から咬筋運動ニューロンへの入力を抑制する

○玄番千夏子[1,2]，中山希世美[2]，望月　文子[2]，中村　史朗[2]，井上美津子[1]，井上　富雄[2]

[1]昭和大　歯　小児成育歯科
[2]昭和大　歯　口腔生理

閉口筋の筋紡錘や歯根膜からの体性感覚を伝える一次感覚ニューロンの細胞体が存在する三叉神経中脳路核（MesV）や，咀嚼筋運動ニューロンの細胞体が存在する三叉神経運動核には，ヒスタミン受容体が豊富に発現していることが報告されていることから，咀嚼運動へのヒスタミンの関与が示唆されているが，その詳細は不明である．我々は，ラット脳幹スライス標本を用いて，閉口反射の経路である MesV から咬筋運動ニューロン（MMN）へのシナプス入力に対するヒスタミンの効果を電気生理学的に検討した．実験には，生後 7－13 日齢の Wistar ラットを用いた．厚さ 500 μm の前頭断スライス標本を作製し，MMN からホールセルパッチクランプ記録を行った．MesV ニューロンの軸索が通ることが知られている三叉神経運動根をスライス上で電気刺激することにより，MMN からシナプス後電流（PSCs）を記録し，ヒスタミンの灌流投与による影響を調べた．ヒスタミン（100 μM）の灌流投与により，PSCs の振幅は 21±8.2%（n=9）減少した．H1 受容体作動薬である 2-pyridylethylamine（100 μM）の灌流投与でも PSCs は抑制されたが（47±6.3%, n=7），H2 受容体作動薬である dimaprit（100 μM）および H3 受容体作動薬 immethridine（100 μM）の灌流投与では変化がみられなかった．また，微弱電流による単線維刺激を行ったところ，H1 受容体作動薬の投与で PSCs の発生確率が減少した（42±13%, n=7）．さらに，連続する 2 回刺激によるシナプス応答の比である paired pulse ratio は，H1 受容体作動薬の投与で 1.24±0.10 から 1.47±0.11 に増加した（n=9）．以上の結果より，MesV から MMN へのシナプス入力はヒスタミンにより抑制され，この抑制はシナプス前終末に存在するヒスタミン H1 受容体を介することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histaminergic presynaptic inhibition of synaptic inputs from the mesencephalic trigeminal nucleus to masseter motoneurons via H1 receptors

○Gemba C[1,2]，Nakayama K[2]，Mochizuki A[2]，Nakamura S[2]，Inoue M[1]，Inoue T[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Showa Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent

The mesencephalic trigeminal nucleus（MesV）and trigeminal motor nucleus densely expressed histamine receptors. However, little is known about the functional roles of histamine in controlling oral-motor activity. In this study, we examined the influences of histamine on synaptic inputs from the MesV neurons to masseter motoneurons（MMNs）, using the whole-cell recording technique in brainstem slice preparations from Wistar rats aged between postnatal days 7 and 13. Histamine reduced the peak amplitude of the postsynaptic currents（PSCs）in MMNs evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve tract, which includes MesV afferents from the jaw-closing muscles and the periodontal ligaments. Bath-application of 100 μM 2-pyridylethylamine, an H1 receptor agonist, mimicked the effects of histamine on the evoked-PSCs. In contrast, 100 μM dimaprit, an H2 receptor agonist, and 100 μM immethridine, an H3 receptor agonist, produced little effect on the evoked-PSCs. Moreover, 2-pyridylethylamine increased the failure rate of PSCs evoked by minimal stimulation by 101±20%（n=7）and increased the paired-pulse ratio from 1.24±0.10 to 1.47±0.11（n=9）. These results suggest that a presynaptic mechanism via H1 receptors is involved in the histaminergic inhibition of synaptic responses to MMNs from MesV afferents.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-44　ラットの術後性回復と安静睡眠時の末梢刺激応答性変化

○尾台　令奈[1]，安達　一典[2]，渡部　　茂[1]，坂上　　宏[2]

[1]明海大　歯　小児歯
[2]明海大　歯　薬理

【目的】安静睡眠（quiet sleep: QS）ならびに運動活性は，術後性の疼痛や機能障害よって影響される．このことは，慢性処置を施した実験動物の睡眠覚醒サイクルにおける末梢刺激応答性活性の変調が，術後性回復の影響を強く受けていることを示唆している．そこで，本研究では術後期間の違いが，安静覚醒（quiet awake: QW）時，QS 時の開口反射活性に与える影響を検討した．【方法】SD 系雄性ラット（約 6 週齢），心電図，筋電図（顎二腹筋前腹と咬筋），脳波，眼電図記録用電極と刺激用電極（オトガイ舌筋）を留置した．環境馴化後，術後 7 日（D7），12 日（D12），16 日（D16）に観察を行った．QW 時にオトガイ舌筋に電気刺激（200 $\mu$s，0.2 Hz，5 回）を加え，顎二腹筋活動を 3/5 以上で発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値（TH）とし 5 分間隔で 3 回計測した（QWB）．続いて，QS 時とその後の覚醒（QWA）時の TH を求めた．QS 時には微小覚醒の発現回数の測定も行った．【結果】QWB に比較して QS の TH は，D7 で低下（86.7±3.9 %）し，D12 では差は認められなかったが，D16 では上昇（113.4±10.0 %）した．短期覚醒の発現回数は回復に伴い上昇する傾を認めた．QS 時の EEG 周波数（$\delta$，$\theta$，$\alpha$，$\beta$）の内，$\delta$ 波の分布は，D7 で 75.9±2.1 %であったが，D12（71.1±2.6%），D16（65.0±7.9 %）では術後期間に従って減少した．【考察】術後性の負荷による睡眠障害の回復は末梢刺激応答性の変調を伴い，回復期間の延長により，睡眠の質の向上に伴い顎感覚運動機能の異常活性が正常化することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The alteration of reflex excitability during quiet sleep in rats in postoperative recovery period

○Odai R[1]，Adachi K[2]，Watanabe S[1]，Sakagami H[2]

[1]Dept Oral Pediatric, Meikai Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent

Sleep stability and are motor excitability affected by the impact of surgery and it can induce variability in outcome of interest. The aim of this study was to determine the time course of surgery recovery for both sleep stability（e.g., slow wave $\delta$ of electroencephalographic（EEG）activity）and motor excitability（e.g., jaw-opening reflex（JOR））across awake-sleep states. Sprague-Dawley rats received wire implantations. JOR was triggered by electrical stimulation（200 $\mu$s）of the tongue. Three recording sessions were carried out at post-operative days 7（D7), 12（D12）and 16（D16). JOR-threshold was determined during quiet awake before sleep（QWB）and quiet sleep（QS). JOR-threshold during QS was compared with that of QWB and it was lower（86.7±3.9 %）at D7. At D12, JOR-threshold was similar in both conditions, and was increased（113.4±10.0%）at D16. During QS, $\delta$ band occupied 75.9±72.1% of total 4（$\delta$, $\theta$, $\alpha$ and $\beta$）EEG bands at D7, and was reduced at D12 and D16 to 71.1±2.6% and 65.0±7.9%, respectively, suggesting a return towards normality. These findings suggest that it is essential to control for the effect of surgery on the outcomes of interest in sleep studies.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-45 Vc 侵害受容ニューロンにおける AMPA 受容体のリン酸化は舌乾燥に起因する舌痛に関与する

○中谷　有香[1]，坪井　美行[2]，篠田　雅路[2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　口腔診断
[2]日本大　歯　生理

口腔乾燥症の患者は原因不明の舌痛を訴えることが多いが，その発症機序は不明である．そこで，口腔乾燥により引き起こされる舌痛の発症メカニズムを解明することを目的とした．イソフルラン吸入による浅麻酔下にて Sprague Dawley 系雄性ラットの舌を乾燥状態にさせ(2 時間/日)，舌乾燥モデルラット(dry 群)を作製した．同様の吸入麻酔を与えたラットを sham 群とした．乾燥開始 7 日目，dry 群において，舌の侵害機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値(HWT)は有意に低下した．さらに，舌の侵害的機械刺激 5 分後に三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)において pERK 陽性細胞数が有意に増加した．さらに舌の侵害的機械刺激に対する Vc 侵害受容ニューロンの発火頻度は有意に増加した．また，髄腔内への ERK リン酸化阻害薬である MEK1 inhibitor(PD98059)の持続投与により，舌の侵害的機械刺激に対する HWT の低下および Vc の pERK 陽性細胞数の増加が有意に抑制された．また，舌の侵害的機械刺激に対する Vc 侵害受容ニューロン応答が有意に抑制された．さらに，舌乾燥 7 日目において，Vc の pAMPA 陽性細胞数が有意に増加し，PD98059 の投与によりこの増加は抑制された．以上のことから，口腔乾燥に起因する舌の機械痛覚過敏発症には Vc の侵害受容ニューロンにおける ERK のリン酸化亢進，これにより AMPA 受容体のリン酸化が進み，その結果として Vc 侵害受容ニューロンの興奮性が増加して舌痛が発症する可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## AMPA receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons is involved in dry tongue pain

○Nakaya Y[1]，Tsuboi Y[2]，Shinoda M[2]，Iwata K[2]

[1]Dept Oral Diagnostic, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Although dry mouth patients suffer from tongue pain, underlying mechanisms are still unknown. We intended to elucidate the mechanisms underlying tongue pain associated with dry mouth to develop the appropriate treatment for tongue pain patients. Head-withdrawal threshold（HWT）to mechanical but not heat stimulation of the tongue significantly decreased, and the mechanical but not heat responses of Vc nociceptive neurons were significantly enhanced on day 7 compared with sham rats. The number of pERK-immunoreactive（IR）cells in the Vc significantly increased compared with sham rats on day 7 after tongue dry. The decrement of the mechanical HWT and the increase in the number of pERK-IR cells were reversed following successive intrathecal（i.t.）administration of MEK1 inhibitor PD98059. The enhanced neuronal activity was also significantly suppressed following i. t. administration of PD98059. The number of pAMPA- IR cells in the Vc significantly increased compared with sham rats on day 7 after tongue dry. The increased number of pAMPA-IR cells was return to the pretreatment level after successive i. t. administration of PD98059. These findings suggest that AMPA Receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons via ERK phosphorylation is involved in mechanical tongue pain associated with dry mouth.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-46 三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄に分布する視床投射ニューロンにおける Extracellular Signal-regulated Kinase のリン酸化

○斎藤　弘人[1,2]，片桐　綾乃[2]，岩田　幸一[2]

[1]日本大　歯　補綴
[2]日本大　歯　生理

【背景】口腔顔面領域における侵害情報の上行路は，三叉神経脊髄路核（Vc）および上部頸髄（C1）の侵害受容ニューロンを経由し，視床後内側腹側核固有部（VPM）へ投射する外側系および視床髄板内核群を中心とした視床内側核群に投射する内側系が存在する．しかし，これらの投射ニューロンがいかなる分子メカニズムを介して痛覚を伝導するかは不明な部分が多い．そこで，本研究では痛覚刺激に対して即時に反応する神経興奮のマーカーである phosphorylated Extracellular Signal-regulated Kinase（pERK）および Neurokinin 1（NK1）受容体の投射ニューロンにおける発現様式を検討し，投射ニューロンの分子メカニズムを解明することを目的とした．【材料・方法】SD 雄性ラットを用い，深麻酔下で 3% Fluorogold（FG）を右側 VPM および束傍核（PF）に注入し，7 日後，深麻酔下で左側上唇にカプサイシン（300 μM, 10 μl）を注入した．5 分後に灌流固定し，Vc-C1 における FG 標識投射ニューロン／pERK 陽性細胞／NK1 陽性細胞の発現について解析した．【結果】VPM および PF に投射する Vc-C1 のニューロンは表層で吻尾側方向に広く分布が認められた．Vc-C1 における投射ニューロンの内 pERK を発現した割合は，VPM および PF ともに約 6%であった．また，投射ニューロンで pERK 陽性／NK1 陽性を示したものが少数認められた.【考察】口腔顔面領域の侵害情報の多くは Vc-C1 の介在ニューロンを介して投射ニューロンに情報を伝え，視床に伝えられる可能性が示された．さらに，一部の投射ニューロンは pERK 陽性／NK1 陽性細胞であり，これらのニューロンは口腔顔面の侵害情報を直接受けて視床へ侵害情報を伝える可能性が考えられた.

**【利益相反】**利益相反状態にはありません.

## Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in Vc-C1 neurons projecting lateral and medial thalamic nuclei

○Saito H[1,2]，Katagiri A[2]，Iwata K[2]

[1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dent Physiol, Nihon Univ Sch Dent

Introduction: Lateral pathway projecting from trigeminal spinal subnucleus caudalis（Vc）and C1 to ventral posterior medial thalamic nucleus（VPM）and medial pathway projecting from Vc-C1 to parafascicular thalamic nucleus（PF）are known to be involved in orofacial nociception. However, molecular mechanisms in these projection neurons are still unclear. We studied whether phosphorylated Extracellular Signal-regulated Kinase（pERK）and Neurokinin 1 receptor（NK1）are expressed in Vc-C1 projection neurons. Materials & Methods: Male SD rats were anesthetized with pentobarbital sodium（50 mg/kg), and 3% fluorogold（FG）was injected into the right VPM or PF. Seven days after FG injections, capsaicin was injected into the upper lip, and brainstem sections were processed for pERK and NK1 immunohistochemistries. Results: Many thalamic projection neurons were widely distributed rostro-caudally in Vc-C1. Six percent of lamina I-II projection neurons defined by FG injection into VPM or PF showed pERK-IR in Vc/C1. Small number of FG-labeled pERK / NK1-IR cells was also observed in Vc-C1. Discussion: These findings suggest that many VPM/PF projection neurons in Vc-C1 receive noxious inputs indirectly from the orofacial region via local circuit neurons, and small number of them receive direct inputs from orofacial region.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-47　気圧センサを用いた鼻咽腔閉鎖機能評価の検討

○長谷川真奈[1,2]，山田　好秋[3]，黒瀬　雅之[2]，藤井　規孝[1]，山村　健介[2]

[1]新潟大　医歯病　歯総診
[2]新潟大　院医歯　口腔生理
[3]東歯大　口腔科学研究セ

【目的】鼻咽腔閉鎖運動は，口蓋帆挙筋と上咽頭収縮筋を中心とした複数の筋の協調により口腔と鼻腔を分離させる．流体を円滑に移動させるため，嚥下や構音動作時には鼻咽腔閉鎖と口唇が連動して閉鎖空間を形成し，舌の運動によって口腔内に圧差を形成すると考えられてきた．口腔と鼻腔が分離されて生じる閉鎖空間内の圧変化は，高解像度マノメトリーを用いた嚥下圧測定によるトポグラフィとして評価することができる．しかし，測定機器が大掛かりでそれぞれの空間内の圧変化を記録することはできない．そこで本研究では，将来的に鼻咽腔閉鎖機能の評価に応用することを目的として，高精度の超小型気圧センサを利用し，嚥下および発声時の咽頭内圧変化を計測した．【方法】健常被験者の舌骨上筋に筋電図電極を貼付し，チューブで被覆した気圧センサを経鼻挿入して中咽頭後壁へ設置した後，一口量および3倍量の水・唾液・性状の異なるトロミ水の嚥下を指示した．また，母音 /a/ と子音（摩擦音，破裂音）の発音を指示し，咽頭内の気圧変化と筋活動を音声信号と同時に記録した．【結果】すべての嚥下において一過性の咽頭内圧上昇が認められたが（14.5～15.1 kPa），圧変化量は物質の量や性状の影響を受けなかった．一方，筋活動量は物質の量や性状により有意な変化を示した．また，/a/ 産出時には明確な圧変化はみられなかったが，子音産出時や音量の増加に伴う圧変化量の増加が記録された（0.6～0.8 kPa）．構音点や音源の相違による咽頭内圧の変化は認められなかった．【結論】1．咽頭内圧は，嚥下プロセス中に口腔内の物質の量や性状によって影響を受けず，一定のパターンを維持する．2．本システムは，嚥下・構音動作時の口腔・咽頭内圧変化の経時的な計測が可能であり，鼻咽腔閉鎖機能を定量的に評価する簡便な検査方法としての活用が期待される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A new method for the study of velopharyngeal function using digital barometer

○Hasegawa M[1,2]，Yamada Y[3]，Kurose M[2]，Fujii N[1]，Yamamura K[2]

[1]General Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp
[2]Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Med Dent Sci
[3]Tokyo Dent Coll

Although numbers of investigators have focused on velopharyngeal function and videofluorography and/or videoendoscopy has been used in the study, simply and reproducibility quantitative-evaluation for velopharyngeal function is expected to be applies in the clinical field. Then, our developed barometer enables us to measure atmospheric pressure, in assessing velopharyngeal functions. Eleven healthy volunteers participated. EMG recordings were conducted. Changes in pressure were detected by a small sensor, which was placed on the posterior wall of pharynx. The subject was asked to keep the injected liquid on the floor of the mouth, and then swallowed it with a cue in a single swallow. The Japanese vowel, plosive and affricate sounds were recorded. Intra-pharyngeal pressure was increased during swallowing the mouthful water（14.5-15.1 kPa）. The volume of water and their physical properties did not affect intra-pharyngeal pressure. During producing consonant word, intra-pharyngeal pressure was increased（0.6-0.8 kPa）, in contrast, it was consistent during producing vowel. The differences of the place of articulation and sound of source did not affect the pressure change. Our developed method for measuring intra-pharyngeal pressure would be useful for evaluating the velopharyngeal function.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-48 ビジュアルフィードバックを用いた随意的口唇閉鎖力調節能力に対する加齢の影響

○土屋　恵子[1]，山田　一尋[1]，増田　裕次[2]

[1]松本歯大　分子硬組織
[2]松本歯大　顎口腔機能

【目的】口唇閉鎖機能は様々な口腔機能を営む上で重要な役割を担う．しかし，随意的な口唇閉鎖力の特性については不明な部分が多く，さらに，加齢により随意的な口唇閉鎖力の調節機能が変化するかどうかも明らかにされていない．そこで，本研究では加齢による随意的口唇閉鎖力の調節能力の影響を明らかにすることを目的とした．【方法】実験は，個性正常咬合を有する 40 人の健常成人（平均年齢 24.2 歳）と健常高齢者 28 人（平均年齢 69.3 歳）を対象に行った．8 方向からの口唇閉鎖力が測定できる多方位口唇閉鎖力測定装置を用いた．被験者のカンペル平面が床と平行な状態で発揮した 8 方向からの力が，バーの長さとしてリアルタイムで表示できるディスプレイを被験者の前方に配置した．つまり，口唇の出力している力を視覚的に確認することができるようにした．各方向別に最大努力で発揮された力の 50%の値をターゲット値として表示し，口唇閉鎖力をターゲット上に 5 秒間維持するように指示した．口唇閉鎖力が発揮されにくいことが明らかになっている左右の 2 方向を除いた 6 方向について測定を行った．口唇閉鎖力が発揮されてからの 3 秒間で，ターゲットとした値の±8%内に維持できた時間の割合を正確率とし，方向別に検討した．【結果と考察】最大努力での口唇閉鎖力に，加齢による有意な相違は認められなかった．方向別の正確率を比較すると，成人においては上下方向の正確率が斜め方向の正確率よりも有意に高かった．一方，高齢者においては上方向の正確率が他の方向の正確率よりも有意に高かった．高齢者と成人を比較した結果，下方向の正確率に有意な差が認められ，高齢者の方が低かった．これらの結果から，加齢により下方向からの口唇閉鎖力の調節能力が影響を受けることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Influence of the aging on ability for control of voluntary lip-closing force using the visual feedback

○Hijiya K[1]，Yamada K[1]，Masuda Y[2]

[1]Dept Hard Tissue Res, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Oral Maxillofacial Biol, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ

［Purpose］This study aims to clarify the difference on ability for the control of voluntary lip-closing force（LCF）between young adults and elderly.［Methods］Forty healthy young adults and 28 healthy elderly people were recruited as the subjects. The experimental system consisted of the apparatus that could measure the directional lip-closing force, and a display that showed the exerted LCF for each direction in real time, along with a target value. Subjects were instructed to control the LCF to maintain the target value using visual-feedback. The target value was set at half of the LCF with maximum effort. We estimated the matched time when the LCF was kept in the range of 8 % of the target value. The accuracy rate was calculated by dividing the matched time by 3 seconds, which was the time between 1 second and 4 seconds after the onset of the LCF.［Results and Discussion］The accuracy rate of the directional LCF differed significantly depending on the direction. The rate on lower direction in elderly was significantly lower than that in young adults. This result suggests that voluntary control of the LCF may differ depending on aging.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-49　5－フルオロウラシル投与ラットおける口内炎誘発疼痛のメカニズム

○山口喜一郎[1,2]，小野堅太郎[1]，人見　涼露[1]，原野　　望[2]，左合　徹平[2]，渡邊　誠之[2]，
稲永　清敏[1]

[1]九歯大　生理
[2]九歯大　歯科侵襲制御

多くのガン患者において，口内炎はガン化学療法の副作用として発症し，重篤な痛みをもたらすことが知られている．しかしながらガン化学療法による口内炎誘発疼痛の発生分子機構に関してはよくわかっていない．本研究では，抗ガン薬の 5-fluorouracil（5-FU）を腹腔内投与した口内炎モデルラットにおける疼痛関連行動を検討した．最近我々が独自に開発した覚醒下での口腔内疼痛解析方法を用いて，自発痛，機械痛覚過敏をそれぞれ自発グルーミング行動時間，直接機械刺激による逃避閾値で評価した．生食群で発生した自発痛及び機械痛覚過敏は 5-FU 投与によりさらに増悪した．抗菌薬の投与により自発痛は強く抑制され，機械痛覚過敏は一部抑制された．またインドメタシンの投与により自発痛は有意に抑制されたが，機械痛覚過敏は抑制されなかった．口内炎部への TRPV1 アゴニストのカプサイシン溶液の滴下による誘発痛は 5-FU 投与により増悪した．5-FU 投与群への TRPV1 アンタゴニストの投与により，カプサイシン誘発痛だけでなく自発痛も有意に抑制された．これらの結果から 5-FU 投与口内炎モデルラットにおいて，自発痛やカプサイシン誘発痛は感染性炎症による TRPV1 活性を介して引き起こされることが示唆された．また機械痛覚過敏には抗菌薬の投与による抑制があるものの，インドメタシンに抵抗を示すことから，炎症というよりは潰瘍形成による粘膜組織障害や細菌毒素そのものによる関与が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanism underlying oral ulcer-induced pain in 5-fluorouracil-received rat model

○Yamaguchi K[1,2]，Ono K[1]，Hitomi S[1]，Harano N[2]，Sago T[2]，Watanabe S[2]，Inenaga K[1]

[1]Dept Physiol, Kyushu Dent Univ
[2]Dept Dent Anesthesiol, Kyushu Dent Univ

In many cancer patients, oral ulcer is developed as a side effect of chemotherapy and causes severe pain. However, oral ulcer-induced pain following chemotherapy has not been studied well. In this study, we investigated pain-related behaviors in oral ulcer model of rats with intraperitoneal administration of the chemotherapeutic drug, 5-fluorouracil. Using our recently-developed assay system for intraoral pain in conscious rats, spontaneous pain and mechanical allodynia were evaluated from spontaneous mouth rubbing time and head-withdrawal threshold to mechanical stimulation to the mucosa, respectively. Oral ulcer-induced spontaneous pain and mechanical allodynia were exaggerated following 5-fluorouracil administration. Antibacterial pretreatment suppressed the spontaneous pain largely and mechanical allodynia partially. The spontaneous pain was largely suppressed by indomethacin administration, but the mechanical allodynia was not changed. Evoked pain by dropping application of the TRPV1 agonist capsaicin on oral ulcer was exaggerated by 5-fluorouracil administration. Furthermore, administration of the TRPV1 antagonist significantly inhibited not only the capsaicin-evoked pain, but also spontaneous pain. From these results, spontaneous and capsaicin-evoked pain in the 5-fluorouracil-administrated model are mainly mediated by infectious inflammation via TRPV1 activation. Mechanical allodynia is caused by mucosal tissue injury and/or bacterial toxins, based on sensitivity to antibacterial pretreatment and resistant to indomethacin.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-50 矯正ワイヤーによる新規口内炎モデルラットの開発

○伊藤　美紗[1]，小野堅太郎[2]，人見　涼露[2]，山口喜一郎[2]，川元　龍夫[1]，稲永　清敏[2]

[1]九歯大　顎口腔機能
[2]九歯大　生理

歯科矯正治療中に不適切なワイヤーにより，口内炎が発症し，疼痛による不快感が起こることはよく知られている．しかしながら，矯正装置により引き起こされた口内炎モデルはなく，その口内炎の疼痛メカニズムについての報告はほとんどない．本研究では，矯正治療中の口内炎による疼痛発症特性を調べることを目的として，まず矯正ワイヤーによる口内炎の新しい動物モデルを開発し，さらに口内炎の評価および疼痛関連行動について検討した．ペントバルビタール麻酔下にて，8 週齢雄性 Wistar 系ラットを用い，結紮線をろう着した長さ 10 mm の角ワイヤーを下顎切歯に装着し，角ワイヤーの先の尖った断端を粘膜に接触させた．コントロールとして，長さ 4 mm の角ワイヤーの断端を丸くし，粘膜に接触させないように装着した．装置装着 1 日後，10 mm 角ワイヤーでは，重度の口内炎が発症し，その日のうちにワイヤーを除去した．ワイヤーにより生じた口内炎は，装着 5 日目までに，完全に治癒した．一方，コントロール群では，口内炎は生じなかった．口腔顔面疼痛反応を評価するために，装置装着前と装着後 1 日目から 3 日目において，自発顔面グルーミング様時間を 10 分間計測定した．コントロール群と比較して，ワイヤー装着 1 日目において口内炎モデルは有意に疼痛関連行動が増加していた．新規矯正ワイヤー誘発口内炎モデルラットは，今後，歯科矯正治療中における口内炎疼痛を抑制する治療法の開発に寄与できるかもしれない．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A new rat model for oral ulcer pain following orthodontic wire appliance

○Ito M[1]，Ono K[2]，Hitomi S[2]，Yamaguchi K[2]，Kawamoto T[1]，Inenaga K[2]

[1]Kyusyu Dent Univ, Div Oracial Functions Ortho
[2]Div Physiol, Kyushu Dent Univ

Orthodontic appliances frequently cause oral mucosal lesions, resulting in pain induction. However, little study has reported about the mechanisms underlying oral ulcer pain in the orthodontic appliances. In the present study, we developed a new rat model for oral ulcer pain following orthodontic wire appliance and evaluated ulceration in the oral mucosa and pain-related behavior. Under pentobarbital anesthesia, 8 week-old Wistar rats were installed with an arched orthodontic thick wire of 10 mm between inferior incisors, soldered to a ligature wire. The sharp tip directly touched the labial fornix region of the oral mucosa. As control, a shorter thick wire（4 mm）was installed similarly. Next day, severe oral ulcer was observed in the model rats and the wire was removed. The oral ulcer was cured completely until day 5 after the procedure. In control group, there were no mucosal lesions. To evaluate pain induction in the model, we observed spontaneous grooming behavior for 10 min before and after the procedure. Compared with control group, the behavior was significantly enhanced in the oral ulcer model on day 1. The new animal model for orthodontic wire-induced oral ulcer pain can be utilized in evaluations of new drug treatments for oral ulcer pain.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-51　味細胞におけるエンドカンナビノイドを介した甘味応答の自己増幅

○岩田　周介，吉田　竜介，重村　憲徳，二ノ宮裕三

九大　院歯　口腔機能解析

2-Arachidonoylglycerol（2-AG）や anandamide などのエンドカンナビノイド（eCB）は，甘味受容細胞に発現する cannabinoid receptor 1（CB1）を介し甘味応答を増大させる．中枢の神経細胞では，G蛋白質共役型受容体（GPCR）の活性化により産生される Diacylglycerol（DAG）が Diacylglycerol lipase（DAGL）の働きにより加水分解され，2-AG が産生される．また，甘味受容細胞にも DAGL が発現することから，GPCR である甘味受容体 T1R2/T1R3 の活性化により 2-AG が産生される可能性が考えられる．すなわち，甘味刺激を繰り返すことにより 2-AG が産生・累積され，細胞周囲の 2-AG 濃度が上昇することにより CB1 を介した甘味応答の増強が生じるのではないかと推測される．本研究では，同一味物質による繰り返し刺激に対する味覚応答をマウス鼓索神経応答解析により調べ，この仮説を検証した．その結果，甘味物質（二糖類スクロース，人工甘味料 SC45647）の繰り返し刺激により神経応答の経時的な増強が認められたが，単糖類グルコースや甘味以外の味質（塩化ナトリウム，塩化カリウム，塩化水素，塩酸キニーネ，グルタミン酸カリウム）による繰り返し刺激ではこの効果は認められなかった．甘味物質の繰り返し刺激による神経応答の経時的増強は，CB1 阻害剤である AM251 で阻害され，T1R3 ノックアウトマウスでは認められなかった．興味深いことに，甘味刺激に対する神経応答の経時的増加はアンギオテンシン II（AngII）の投与により増強された．この AngII の効果は，AT1 阻害薬である CV11974 投与により消失した．これらの結果から，甘味の繰り返し刺激により，甘味受容細胞において CB1 を介した自己増幅的な応答増強が生じ，AngII がその効果を増強する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The self-amplification of sweet taste responses via cannabinoid receptor in taste cells

○Iwata S，Yoshida R，Shigemura N，Ninomiya Y

Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ

2-Arachidonoylglycerol（2-AG），one of endocannabinoids（eCBs），enhances responses of sweet-sensitive taste cells via activation of the cannabinoid receptor 1（CB1）. 2-AG is synthesized through hydrolyses of diacylglycerol by diacylglycerol lipase（DAGL）in the GPCR-phospholipase cascade. We recently found that DAGL is expressed in T1R3-positive taste cells, suggesting a possibility that T1R2/T1R3 activation by sweet compounds leads to generation of 2-AG and enhancement of sweet taste responses. To test this possibility, we investigated potential effects of repeated taste stimulations with a single taste compound on responses of the mouse chorda tympani（CT）nerve. The results indicated that CT nerve responses to sweeteners but not to other tastants were gradually increased by repeated stimulations. Such effect was not observed in T1R3 knockout mice and was inhibited by CB1 blocker AM251. Interestingly, intravenous injection with Angiotensin II（AngII）also showed such increase of sweet taste response by repeated stimulations. Blocking of AngII type1 receptor by an antagonist, CV11974, inhibited the AngII's effects. Taken together, our results suggest that the repeated T1R2/T1R3 activation leads to generation of 2-AG, which enhances sweet taste responses by acting on CB1 expressed in sweet sensitive taste cells. AngII may cooperatively act on this endocannabinoid sweet-enhancing effect.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-52 ヘルトヴィッヒ上皮鞘は，EMT を起こし歯根膜形成に関与する

○板家　智[1]，岡　暁子[1]，立岡　迪子[1]，藤原　尚樹[2]，原田　英光[2]，尾崎　正雄[1]

[1]福歯大　成育小児
[2]岩医大　解剖　発生・再生

**[目的]** 歯根膜形成におけるヘルトヴィッヒ上皮鞘（HERS）の役割については，未だ不明な点が多い．我々は，ヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞株を用いて歯原性上皮細胞の歯根膜形成への関与を検討した．**[方法と結果]** (1)マウス下顎第一臼歯を用い無固定，非脱灰にて凍結切片を作成した．免疫組織化学染色法を用いて，fibrillin1，fibrillin2 と cytokeratin14 発現を比較した．生後 9 日齢マウス組織において，fibrillin1 は，歯根象牙質表面の断裂した HERS の cytokeratin14 陰性の細胞に発現がみられた．一方，fibrillin2 の発現は，歯根形成期では形成端である cytokeratin14 陽性の HERS に近接して発現していた．(2)マウス HERS 細胞株である HERS01a 細胞を用いて解析を行った．培地に，TGF-$\beta$1 を添加し 5 日間培養した．その後，RealTime-PCR にて fibrillin-1, fibrillin-2, LTBP4, cytokeratin, vimentin, fibronectin, periostin, E-cadherin, N-cadherin の発現を解析した．TGF-$\beta$1 非存在下では，HERS01a 細胞は fibrillin-1，fibrillin-2 のどちらも発現しないのに対し，TGF-$\beta$1 添加によって，fibrillin-1 発現が誘導された．この時，上皮系マーカー発現は減少しており，間葉系マーカー発現は促進されていた．さらに，TGF-$\beta$1 と結合能を持つ LTBP4 の発現も抑制されていた．**[考察]** TGF-$\beta$1 添加によって HERS01a 細胞でみられた上皮系，間葉系マーカーの発現変化から，HERS01a 細胞は，上皮-間葉転換（EMT）起こしたことが推察され，fibrillin-1 発現誘導は，間葉化した HERS01a 細胞によるものであることが考えられる．これらの結果は，歯根形成期におけるヘルトヴィッヒ上皮鞘は，歯根形成だけでなく歯根膜形成においても重要な役割を担っていることを示唆するものである．

**【利益相反】** 利益相反状態にはありません．

## Hertwig's epithelial sheath cells through epithelial mesenchymal transition（EMT）interact with periodontal ligament development

○Itaya S[1]，Oka K[1]，Tatsuoka M[1]，Fujiwara N[2]，Harada H[2]，Ozaki M[1]

[1]Sec Pediatric Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll
[2]Div Development Biol Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ

**[Purpose]** Important role of Hertwig's epithelial sheath（HERS）has little known in periodontal ligament（PDL）development. Here we show that HERS cells have potential to transit into mesenchymal cells by TGF-$\beta$ stimulation, to join the PDL development through fibrillin expression. **[Methods and Result]**（1）Histological analysis: Frozen sections of mice molars were prepared using the film transfer method. Immunohistochemical staining was performed. At P9, fibrillin-1 expression started between the epithelial cells from disrupted HERS at the root surface. Fibirillin-2 expression was located near by HERS.（2）Cell culture: Murine HERS cell line（HERS01a）was used. They were cultured with/without 25 ng/ml TGF-$\beta$1 for 5 days. The expressions of fibrillin-1, fibrillin-2, LTBP4, epithelial and mesenchymal cell markers were analyzed by real-time PCR. HERS01a cells did not express both fibrillin-1 and fibrillin-2 without TGF-$\beta$1. However, fibrillin-1 expression was induced by TGF-$\beta$1. In this condition, the expressions of epithelial markers were decreased. However, the mesenchymal markers were induced. **[Discussion]** According to the different expression of epithelial and mesenchymal markers, it was suggested that the epithelial-mesenchymal transition（EMT）was partially induced in HERS01a cells by TGF-$\beta$1 stimulation. These results suggested that Hertwig's epithelial root sheath has important role for PDL development through fibrillin expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-53　TRPV4 遺伝子欠失が歯肉付着上皮における物質透過性に与える影響

○木附　智子[1]，合島怜央奈[1,3]，畠山　純子[1,4]，大崎　康吉[1]，張　　旌旗[1]，城戸　瑞穂[1]

[1]九大　院歯　分子口腔解剖
[2]九大　院歯　口腔顎顔面外科
[3]佐賀大　医　歯科口腔外科
[4]福歯大　保存

【目的】細胞内外のセンサーとして知られる TRP（transient receptor potential）チャネル多様な生理学的機能や疾患との関連が報告されている．私たちは，体温近傍の温度で活性化するカルシウム透過性の TRPV4 チャネルが口腔上皮に発現していること，特に歯肉付着上皮に強く発現していることを見出した．さらに，歯周病モデルマウスにおいて，TRPV4 遺伝子欠失マウスでは，野生型マウスに比べ歯槽骨吸収が顕著であったことから，その要因の一つとして歯肉付着上皮における透過性の差を考え，実験を行った．【実験・方法】9 週齢の野生型マウス（WT）と TRPV4 遺伝子欠損マウス（V4KO）における組織染色および TRPV4 や接着結合関連タンパクの免疫染色を行った．さらに，付着上皮における透過性を検討するため，上顎臼歯の歯頸部に蛍光色素結合した Dextran をトレーサーとして投与し拡散の程度を検討した．また，左側上顎第 2 臼歯に 5-0 絹糸を結紮する歯周炎モデルマウスを作製し，透過性を比較した．【結果と考察】V4KO マウスの歯肉上皮は，野生型に比べ部位により細胞間隙が拡大していた．局所投与した蛍光トレーサーは，付着上皮先端に顕著な沈着が認められ，歯冠側の付着上皮の細胞間隙にも浸潤していた．歯周病モデルでは，歯肉上皮および結合組織内にも蛍光トレーサーが認められ，無処置のものに比べその範囲が広かった．また，野生型と V4KO を比較すると，蛍光トレーサーは V4KO の付着上皮細胞間隙に広く分布し，野生型に比べより歯根側に進入していた．TRPV4 が歯肉付着上皮における上皮細胞間の物質透過性に影響を与えていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effect of the deletion of TRPV4 on the barrier of gingival epithelia

○Kitsuki T[1]，Aijima R[1,3]，Hatakeyama J[1,4]，Ohsaki Y[1]，Zhang J[1]，Kido M[1]

[1]Dept Mol Cell Bio Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Maxillofacial Surgery Fac Dent Sci Kyushu Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Fac Med, Saga Univ
[4]Dept Odontol, Fac Dent, Fukuoka Dent Coll

Transient receptor potential channels, known as cellular sensor, have a variety of physiological and pathological properties in mammals. We explored TRP vanilloid 4（TRPV4）, a calcium permeable channel, expressed in oral mucosal epithelia, extensively in the junctional epithelium. In periodontitis model mice, we found increased alveolar bone loss in TRPV4 gene deleted mice（V4KO）compared with WT. We explored the differences in epithelial permeability as one of the possible causes of bone loss. Under histological observations, wider intercellular space was found in the gingiva of V4KO mice than in WT mice. To observe the epithelial permeability, we applied fluorescent-dextran around cervical tooth root. Topical applied tracer extensively penetrated into marginal gingiva in periodontitis model mice than that in no treated animals. In the junctional epithelium, strong fluorescent conjugates were found in the top of the epithelium in both WT and V4KO mice gingiva, and larger amount of tracer was found in V4KO mice than in WT mice. The tracer spread wider to the apical region in the junctional epithelium of V4KO than that in WT. It is suggested that TRPV4 affected paracellular permeability in the junctional epithelium.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-54　ジルコニアおよびチタンディスク上における骨芽細胞分化の比較

○斉藤　まり[1]，唐木田丈夫[1]，山本　竜司[1]，長野　孝俊[2]，山越　康雄[1]，五味　一博[2]，大井田新一郎[1]

[1]鶴見大　歯　生化
[2]鶴見大　歯　保存Ⅱ

歯科用インプラントは臨床において広く応用されており，現在の主な材質であるチタンは生体適合性に優れ，骨と密接に接合し良好なオッセオインテグレーションを形成する．しかし近年になり，生体移植後の臓器やリンパ節へのチタンイオン蓄積やアレルギー反応，過敏性などが指摘されるようになってきた．そこで我々は，優れた生体適合性や高い機械的強度を有するセラミックスであり，インプラントのアバットメント(支台部)として臨床応用されているジルコニアに着目した．**【目的】**我々は，ジルコニアのフィクスチャー(歯根部)としての適応性を調べるため，セリア系ジルコニア(Ce-TZP)，チタンディスク及び培養用スライドガラス上でマウス未分化筋芽細胞株であるC2C12細胞を培養し，細胞増殖能及び骨芽細胞分化能について比較検討することを試みた．**【材料及び方法】**C2C12細胞をそれぞれのディスク上に播種し，10% FBS含有αMEM培養液中で培養して細胞増殖能を測定した．また，骨芽細胞分化誘導培地(アスコルビン酸，β-グリセロリン酸，BMP2，レチノイン酸含有)を用いて培養し，アルカリフォスファターゼ(ALP)活性，アリザリンレッド(ARS)染色，カルシウム定量，骨芽細胞分化マーカーの発現解析を行い，骨芽細胞分化能を検討した．**【結果と考察】**細胞増殖能，骨芽細胞分化誘導時のALP活性及びARS染色像において，ジルコニアディスク上で培養した細胞は骨芽細胞への分化が認められ，チタンディスク及びスライドガラス上で培養した細胞とほぼ同じ所見が得られた．遺伝子発現においては誘導群でALP，I型コラーゲンの強い発現が見られ，また，誘導群のCe-TZPディスク上のALPの発現は高い傾向にあった．これらの結果は，フィクスチャーにおけるジルコニアの歯科インプラント材料としての将来的有用性を示唆している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Comparison of osteoblast differentiation on the zirconia and titanium disc

○Saito M[1]，Karakida T[1]，Yamamoto R[1]，Nagano T[2]，Yamakoshi Y[1]，Gomi K[2]，Oida S[1]

[1]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med Tsurumi Univ
[2]Dept Periodontol, Sch Dent Med Tsurumi Univ

Zirconia is a ceramic which has a superior biocompatibility and is used as the abutment of dental implants. Our **Objective** was to examine the adaptability of zirconia as a fixture by comparing osteoblastic differentiation potency C2C12 cells on zirconia discs. Methods: The C2C12 cells were seeded on Ce-TZP discs, titanium disc and poly-L-lysine coated slide glass. The proliferation potency of cells was determined by counting cells. In the study of mineral induction, the osteoblastic differentiation potency was determined by both ALP and ARS staining. Furthermore, the ALP activity and quantitative analysis of calcium were assayed and determined in C2C12 cells on each disc. Gene expression was confirmed by RT-PCR. Results: The number of cells on each of three discs was almost equal. Both ALP and ARS staining showed densely-stained images, which induced C2C12 cells to express the phenotype of osteoblasts. RT-PCR showed that mRNA expressions of *type I collagen*, *osteocalcin*, *osterix* and *ALP* were up-regulated. ALP activity and calcium concentration of C2C12 cells were almost equal. In all of the results no significant difference was observed between Ce-TZP and titanium discs. Conclusions: These results suggest that the Ce-TZP has a great potential as the fixture of dental implants.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-55 ヒト頬脂肪体由来幹細胞を細胞源とした神経再生療法に関する検討

○高橋　悠[1,2]，石川　博[2]，田中　彰[1,3]

[1]日歯新潟　口外，[2]日本歯大　生命歯，[3]日歯新潟　先端研

【緒言】我々は，ヒトの口腔顎顔面領域から採取可能な組織由来幹細胞で，かつ再生医療において有用な細胞源を検討している．パーキンソン病はドパミン神経が脱落する神経変性疾患であり，現時点で根本的な治療法がない．そのため，細胞移植による神経の再生医療の検討が進められている．そこで，ヒトの口腔顎顔面領域で採取可能な頬脂肪体組織由来幹細胞より分化誘導した神経細胞の再生医療への有用性について検討を行った．【材料・方法】ヒト頬脂肪体由来幹細胞（hBFPSCs）を神経分化誘導培地で 4 週間培養し，分化させた細胞が，神経系細胞であるか否かを免疫染色ならびに RT-PCR で同定した．次に，この分化誘導した神経系細胞を SCID マウスの頭蓋骨ブレグマより脳内（視床）に直接移植し，4 週後に脳組織の摘出を行い，神経系細胞の生着を確認して，免疫染色にて解析した．【結果】hBFPSCs から分化誘導された細胞は神経細胞様の形態を維持し，神経細胞マーカーであるβⅢ tubulin および Neurofilament200 や，アストロサイトマーカーである GFAP 等の発現を認めた．電子顕微鏡像では，軸索様の所見を認め，一方向性に微小管や微小線維が豊富にみられた．さらにシナプス様構造も確認できた．また，マウス脳内（視床）に移植した細胞は生着し，同様の神経関連マーカーの発現を示した．移植細胞の腫瘍化は全く認められなかった．【結論】今回の方法にて，hBFPSCs より分化誘導した神経細胞は，脳内に移植しても生着可能な神経細胞であることが確認された．細胞移植による神経再生療法において，口腔顎顔面領域より採取可能な組織幹細胞である hBFPSCs は非常に有用な細胞源となることが示唆された．現在，ドパミン神経細胞への分化の確認および 6-OHDA 投与により作られたパーキンソンモデルラットへの移植を試みている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Regenerative neural cells using human adipose stem cells derived from buccal fat pad for promising source of cell transplantation therapy

○Takahashi H[1,2], Ishikawa H[2], Tanaka A[1,3]

[1]Dep OMS, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dep NDU Life Sci, Tokyo, Nippon Dent Univ, [3]Div Cell Reg Trans, Advan Res Cent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

［Introduction］Parkinson's disease（PD）is a neurodegenerative disorders by progressive death of dopaminergic neurons. PD is one of candidate diseases for application of cell transplantation therapy, because it could not provide fundamental therapeutic method. Purpose of this study was to evaluate the usefulness of human adipose stem cells derived from buccal fat pad（hBFPSCs）for nerve regeneration.
［Methods］hBFPSCs were cultured in neurogenic differentiation medium for 4 weeks. Then, differentiated cells transplanted into the brain of SCID mouse. At 4 weeks after transplantation, the brain was examined by immunohistochemical staining.
［Results］Cells differentiated from hBFPSCs showed neuron-like structure and expressed neuron marker（βⅢ tubulin, Neurofilament200）or astrocyte marker（GFAP）. The transplanted cells survived in the brain of SCID mouse. Tumor formation did not show after transplantation of the cells.
［Conclusion］We demonstrated that hBFPSCs differentiated into neural cells by our methods, and differentiated cells survived in the brain of SCID mouse. It is suggested that neurons differentiated from hBFPSCs would be applicable for cell transplantation therapy. Hopefully, we attempted to transplant differentiated cells into an animal model of PD induced by the 6-hydroxydopamine.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-56　新規 Wnt シグナル調節因子 PKP1 の歯の発生における役割

○宮崎佳奈子，吉崎　恵悟，新井智映子，韓　　雪，鮒田　啓太，高橋　一郎
九大　院歯　矯正

Wnt シグナル経路は歯の形態形成期において重要な役割を果たしている．今回我々は歯に高い発現を示す外胚葉異形成症原因遺伝子 Plakophilin 1（PKP1）に着目した．PKP1 は Wnt シグナル調節因子の一つである $\beta$-catenin と同様にアルマジロリピート領域を有し，歯において Wnt シグナル調節因子として機能している可能性が考えられる．そこで今回，PKP1 の Wnt シグナルにおける役割を解明するために以下の検討を行った．歯の発生における PKP1 の役割を解析するため，胎生 13 日齢マウスより摘出した歯胚に PKP1 siRNA を添加し，器官培養を行ったところ，歯の形態形成が阻害された．また，in vitro において，PKP1 siRNA は歯原性上皮細胞株（CLDE 細胞）の増殖を抑制した．次に，PKP1 の核内移行を観察するために PKP1-EmGFP 発現ベクターを作製し，CLDE 細胞に遺伝子導入を行った．Wnt5a, Wnt3a および Wnt シグナル活性化因子である LiCl を加えると，細胞膜に局在する PKP1 が核内へ移行することを発見した．さらに，PKP1 は desmosome を構成する細胞間接着分子であり，エナメル芽細胞の分化が進むにつれて細胞膜に局在する．CLDE 細胞において $Ca^{2+}$ 存在下では細胞間接着部位に PKP1 の明らかな局在が認められた．このとき，PKP1 siRNA を遺伝子導入すると tight junction 関連接着因子 ZO-1 の細胞膜局在が阻害されるとともに Ameloblastin の発現が低下した．さらに免疫沈降法により PKP1 と ZO-1 の結合を確認した．以上より，PKP1 は歯の発生初期には Wnt シグナル調節因子として歯の形態形成に関与し，エナメル芽細胞分化期になると細胞膜へ移動し，接着関連因子 ZO-1 の局在を調節することで，エナメル芽細胞分化を制御している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## PKP1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development

○Miyazaki K，Yoshizaki K，Arai C，Han X，Funada K，Takahashi I
Sect Orthod Dentofacial Orthop, Div Oral Health, Growth Dev, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch

Wnt signaling pathway plays important roles for tooth development, especially during the tooth morphogenesis. We focused on Plakophilin 1（PKP1）, which is highly expressed in tooth and known as disease gene for ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. We hypothesized that PKP1 is a regulator of Wnt signaling pathway because of its armadillo repeat domain similar to beta-catenin. To identify the function of PKP1 during tooth development, we performed ex vivo organ culture experiments using PKP1 siRNA. The size of tooth germs was significantly smaller than that of the controls when siRNA was applied. Proliferation of dental epithelial cell was inhibited by PKP1 siRNA in vitro. Transfected PKP1-EmGFP chimera protein was translocated from plasma membrane into nuclei by stimulation of Wnt5a, Wnt3a, and Lithium Chloride. PKP1 is also known as an adhesion-related molecule of desmosome, and we found that PKP1 localization shifts to the plasma membrane during ameloblast differentiation. In addition, PKP1 siRNA disturbed localization of ZO-1 to tight junction, and inhibited the differentiation of ameloblast. Immunoprecipitation revealed that PKP1 bound to ZO-1. These results strongly suggest that PKP1 is involved in early tooth morphogenesis as a Wnt signal regulator, and affects to the differentiation of ameloblast via the cell adhesion molecules.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-57 基底膜分子 Nephronectin は歯原性上皮幹細胞の分化および細胞増殖に関与する

○新井智映子，吉崎　恵悟，宮崎佳奈子，韓　　雪，鮒田　啓太，高橋　一郎
九大　院歯　矯正

歯の発生は上皮-間葉相互作用によって開始され，上皮および間葉の間に存在する基底膜はそのシグナルを仲介する足場として重要である．今回我々は，上皮－間葉相互作用によって形成される組織に特異的に発現する基底膜分子 Nephronectin（Npnt）に着目し，歯の発生におけるその役割を解明することを目的として研究を行った．まず，胎生 14 日齢（E14）ICR マウスより摘出した各種臓器および E11 から E18 における歯胚から総 mRNA を抽出し RT-qPCR 法にて発現パターンの解析を行った．Npnt は歯，肺および腎臓において強く発現し，歯においては特に形態形成期に強い発現を認めた．Npnt 遺伝子欠損マウスでは腎臓の形成が阻害されることが報告されており，歯においても重要な役割を担っている可能性が考えられる．そこで，E14 歯胚を摘出し，器官培養法を用いて歯の形態形成能を確認したところ，Npnt siRNA 添加群では control 群と比較して歯胚の大きさが有意に減少した．そこで Npnt の歯の発生における局在を E11, E13 および E14 歯胚を用いて免疫染色法にて確認したところ，歯胚形成期の基底膜に強く発現していた．さらに歯原性上皮幹細胞の分化・増殖等に与える影響を確かめるため，生後 1 日齢（P1）切歯を用いて免疫染色法を行ったところ，サービカルループ近傍において Npnt が発現するとともに歯原性上皮幹細胞マーカーである Sox2 が減少することを発見した．以上から Npnt は歯原性上皮幹細胞の分化制御に関わっている可能性が示唆された．そこで歯原性上皮細胞株に Npnt を遺伝子導入したところ，Sox2 陽性細胞数が減少し，細胞増殖能が上昇した．以上から Npnt は歯の発生初期の基底膜に発現し，歯原性上皮幹細胞の分化に関与し，細胞増殖を制御することで歯の形態形成に関与していると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A basement membrane protein Nephronectin is involved in dental epithelial stem cell differentiation and proliferation

○Arai C，Yoshizaki K，Miyazaki K，Han X，Funada K，Takahashi I
Sect Orthod Dentofatial Orthop, Div Oral Health, Growth Dev, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch

Tooth development is initiated by reciprocal interactions between epithelial and mesenchymal cells. Basement membrane（BM）lying between epithelia and mesenchyme plays important role for those signaling interactions. To identify the functions of BM in tooth development, we focused on Nephronectin（Npnt）, which is highly expressed in epithelial-mesenchymal mediated tissues. RT-qPCR revealed that Npnt is highly expressed in tooth, lung and kidney. Npnt is strongly expressed during tooth development, especially in the early morphogenesis stage. It is reported that Npnt deficient mice showed kidney agenesis, suggesting that Npnt is also important for tooth development. As we expected, the size of tooth germ was significantly smaller than that of the controls in presence of Npnt siRNA in organ culture system. Immunohistochemistry showed that Npnt localized in BM in E11, E13 and E14 molar tooth germ. Near to the cervical loop of P1 incisor, immunostaining of Npnt showed inversed expression pattern of Sox2, which is dental epithelial stem cell marker. Consistently, number of Sox2 positive（$Sox2^+$）cells was significantly reduced in Npnt transfectant, and the proliferation increased in vitro. These results indicated that Npnt localizes in BM, and regulates $Sox2^+$ dental epithelial cell differentiation and proliferation in tooth development.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-58 マウス口蓋創傷モデルの治癒過程における上皮間葉転換関連分子の発現解析

○合島怜央奈[1,2]，木附　智子[3]，吉本　怜子[3]，大崎　康吉[3]，張　　旌旗[3]，檀上　　敦[2]，山下　佳雄[2]，城戸　瑞穂[3]

[1]佐賀大　医　組織　神経解剖
[2]佐賀大　医　口腔外科
[3]九大　院歯　分子口腔解剖

消化管の入口である口腔は体の他の部位と比較し幅広い温度や化学および機械的刺激にさらされる．故に損傷が生じることも少なくないが，その一方で，口腔内に生じた傷は速やかに治癒する．創傷治癒過程では上皮細胞の創傷部への「遊走」が重要な鍵を握る．この遊走過程では，上皮細胞が上皮の性質を失い，間葉系細胞の形質を獲得する上皮間葉転換（EMT: epithelial to mesenchymal transition）が関与することが報告されている．口腔における創治癒過程の理解にはEMT関連分子の発現変化を知ることが重要と思われるが，それに関する報告はないことから，本研究ではこれを明らかにすることを目的とした．【材料と方法】C57BL/6マウス（5-8週齢）の硬口蓋に$\phi$1.5 mmの創を作成する口蓋創傷モデルを用いた．創形成1，2，3，5，7，10日目における創部粘膜でのEMT関連分子および遊走因子の発現をWestern Blot法および免疫組織学的に解析を行った．【結果および考察】肉眼的および組織学的に，口蓋の創は7日目に上皮化を完了していた．上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン10（CK10）は創形成1日目より2日目をピークに減弱していた．さらに細胞間接着で重要な役割を担うE-カドヘリンも創形成2日目をピークに減弱していた．免疫組織学的解析では創形成2日後に，創部を中心とした広い範囲でCK10の発現が消失し，遊走因子となるインテグリン$\beta$4やラミニン332が強く発現していた．さらに創先端の上皮細胞はE-カドヘリン発現が減弱する一方で，間葉系のマーカーとなるN-カドヘリンが強く発現していた．以上より，口腔粘膜では創形成後早期に上皮間葉転換が生じ，上皮細胞の移動と速やかな治癒を可能にしていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of epithelial to mesenchymal transition molecules in mice palatal wound repair process

○Aijima R[1,2], Kitsuki T[3], Yoshimoto R[3], Ohsaki Y[3], Zhang JQ[3], Danjo A[2], Yamashita Y[2], Kido M[3]

[1]Div Histo Neuroanatomy, Fac Med, Saga Univ
[2]Dept Oral Maxillac, Fac Medicine, Saga Univ
[3]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci

The oral cavity is the entrance to the digestive tract and experiences a wider variety of stimuli than other tissues. Therefore, the oral mucosa is more susceptible to injury and has been shown to have a rapid wound healing. Epithelial to mesenchymal transition（EMT）promotes migration of epithelial cells at wound front, which plays an important role in wound healing. To understand the EMT mechanism in the oral wound repair processes, we examined the expression of EMT markers in oral re-epithelialization. C57BL/6 mice were used for the experiments. Full-thickness wounds were made in the palatal mucosa using a 1.5-mm biopsy punch. Wound tissues were excised at post-wounding day 1, 2, 3, 5, 7 and 10, followed by western blot and histological analyses. Wound closure was complete at post-wounding day 7. Epithelial cell markers, cytokeratin 10 and E-cadherin, were significantly decreased at post-wounding day 1-2, followed by gradual increase. On the other hand, strong immunoreactivities of mesenchymal and migration markers（N-cadherin, integrin B4 and laminin 332）were observed in the wound margin. These results suggest that the early EMT process after wounding contributes to cell migration and rapid wound repair in oral cavity.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-59 ヒストン3リジン9メチル化酵素G9aは正常な歯牙形成に必要である

○上運天太一[1]，出野　尚[2]，中村　芳樹[1]，中島　和久[2]，島田　明美[2]，二藤　彰[2]

[1]鶴見大　歯　歯科矯正
[2]鶴見大　歯　薬理

我々はこれまで，歯の発生において複数のヒストン3リジン9（H3K9）メチル化酵素（MTases）ならびにこれらの基質であるH3K9モノ（me1），ジ（me2），トリメチル化（me3）の局在が歯胚上皮よりも間葉に多く，それらの酵素が間葉において何らかの機能を果たしている可能性を見いだした．これら酵素の中でも特にG9aの発現が間葉に高いことも観察したことから，今回，我々はG9a conditional KO miceを作成し歯の発生過程における間葉でのG9aの機能を調べた．転写因子Sox9が頭部神経提由来の間葉に高い発現を示すので，Soc9-Cre miceと$G9a^{fl/fl}$ miceを交配させることでG9a conditional KO miceを作成した．免疫組織化学ならびにin situ hybridizationを行い，間葉におけるG9aの発現を$Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/+}$ miceと$Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/fl}$（G9a cKO）miceで比較したところ，後者で著しく減少していた．G9aの基質であるH3K9me2のタンパクレベルも間葉で減少していることを確認した．HE染色ではG9a cKO miceの歯胚はE16.5とE17.5で著しく小さいことが観察された．またBrdUラベリングでは間葉の増殖能が低下しており，さらに興味深いことに内・外エナメル上皮層の細胞も同様に増殖能が抑えられていた．G9a cKO miceの歯胚におけるTUNEL陽性細胞数は間葉と上皮のどちらも変化が見られなかった．したがって，歯胚間葉に発現するG9aは少なくとも間葉と上皮の増殖能を調節することによって歯の形成を制御していることが示唆された．（会員外共同研究者；木村宏 東工大 院　生命理工学研究科，立花誠 徳島大学　疾患酵素学研究センター）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## H3K9MTase G9a is required for proper tooth formation

○Kamiunten T[1]，Ideno H[2]，Nakamura Y[1]，Nakashima K[2]，Shimada A[2]，Nifuji A[2]

[1]Dept Orthodont, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
[2]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ

We previously reported that histone 3 lysin 9（H3K9）methyltransferases（MTases）and their substrates H3K9 mono-（me1）, di-（me2）, tri-（me3） methylation were enriched in the tooth mesenchyme more than in the epithelium during mouse development. We also observed that G9a is significantly expressed in the tooth mesenchyme among the H3K9MTases. In this study, we investigated the functions of G9a in the tooth development using G9a conditional KO mice. We used Sox9-Cre mice to delete G9a in tooth mesenchyme, since Sox9 is highly expressed in the mesenchyme derived from cranial neural crest. Immunohistochemical and in situ hybridization analyses revealed that G9a expression was significantly decreased in the mesenchyme of $Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/fl}$（G9a cKO）mice compared with $Sox9\text{-}Cre;G9a^{fl/+}$ mice. Protein level of H3K9me2 was also decreased in the tooth mesenchyme. G9a cKO mice showed smaller tooth germs at E16.5 and E17.5. BrdU labeling revealed that proliferation rates decreased in the mesenchyme in G9a cKO mice. Interestingly proliferation rates also decreased in tooth epithelium. Numbers of TUNEL positive cells were unchanged both in the mesenchyme and epithelium in G9a cKO mice. Thus G9a expressed in the tooth mesenchyme regulates tooth formation, at least partly through regulation of proliferation of the mesenchyme and epithelium.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-60　CD146 陽性ヒト歯髄幹細胞の細胞特性解析

○松井美紀子，小林　朋子，筒井　健夫

日本歯大　生命歯　薬理

【目的】ヒト歯髄幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と類似した特性を有し，*in vivo* における象牙質/歯髄様複合体形成能が知られている．CD146 は歯髄幹細胞に発現する幹細胞マーカーの 1 つであり，血管新生や神経形成への関与も明らかにされている．我々は CD146 により分離した歯髄幹細胞の細胞特性を知ることを目的とし，*in vitro* および *in vivo* における解析を行った．
【方法】実験に用いたヒト歯髄幹細胞は，CD146 磁気ビーズ（MACS）を用いて分離した陽性細胞群（$CD146^{+}$）と陰性細胞群（$CD146^{-}$），さらに陽性 25％と陰性 75％の混合細胞群（$CD146^{+/-}$），非分離細胞群（non-sorted）の計 4 細胞群である．各細胞群は *in vitro* において細胞増殖能，石灰化能，リアルタイム PCR の解析を行い，*in vivo* ではヌードマウスへ皮下移植後，組織学的検査と免疫染色を行った．
【結果】細胞倍加時間は $CD146^{+}$細胞群で 19.7 時間，non-sorted 群で 18.2 時間，これに対して $CD146^{-}$細胞群では 14.1 時間であった．石灰化誘導によるアリザリンレッド陽性像は $CD146^{+}$細胞群で早期に認められ，リアルタイム PCR では $CD146^{+}$細胞群で顕著に高い *CD146* 発現が解析された．ヌードマウスへの皮下移植では $CD146^{+}$細胞群において，象牙質/歯髄様複合体形成と免疫染色による CD146 抗体，ヒトミトコンドリア抗体陽性像が観察された．
【考察】本結果は，$CD146^{+}$細胞群が石灰化の促進と象牙質/歯髄様複合体形成において重要である可能性を示している．このことから $CD146^{+}$細胞群は，歯髄再生を目指す再生医療における細胞ソースとしての有用性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Stem cell properties of CD146-positive（$CD146^{+}$）dental pulp stem cells（DPSCs）for generated dentin/pulp-like structures

○Matsui M，Kobayashi T，Tsutsui T

Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

**Purpose:** We examined if dentin/pulp-like structures are promoted using CD146-positive（$CD146^{+}$）human dental pulp stem cells（DPSCs）.
**Materials & Methods:** DPSCs were separated to $CD146^{+}$cells and CD146-negative（$CD146^{-}$）cells using magnetic activated cell sorting（MACS）. $CD146^{+}$cells, $CD146^{-}$cells, in combination of 25%-$CD146^{+}$cells and 75%-$CD146^{-}$cells（$CD146^{+/-}$）cells, and also non-separated cells characterized by cellular growth assay, alizarin red staining and quantitative RT-PCR（qRT-PCR）*in vitro*. In addition, immunohistochemical definition methods characterized transplanted cells throughout follow-up within *in vivo* studies.
**Results:** Cellular growth assay showed $CD146^{-}$cells approximate 4-5hours doubling time difference compared with $CD146^{+}$cells and non-separated cells. When cultured in osteogenic differentiation medium, prompt mineralization was observed in $CD146^{+}$cells compared with counterparts; $CD146^{-}$cells, $CD146^{+/-}$cells and non-separated cells. Subsequently, qRT-PCR showed high expression of *CD146* in differentiated $CD146^{+}$cells. Supporting previous observations *in vitro*, $CD146^{+}$cells were transplanted in immunocompromised mice. As expected, $CD146^{+}$cells generated dentin/pulp-like structures; however, neither $CD146^{-}$cells nor $CD146^{+/-}$cells did. As anticipated, immunohistochemical studies detected CD146 and human mitochondria in transplanted $CD146^{+}$cells.
**Conclusion:** These results support that $CD146^{+}$cells promote mineralization as one of the factors necessary to generate dentin/pulp-like structures. Interestingly, data shows $CD146^{+}$cells may be useful for studying self-renewal of DPSCs. Also, $CD146^{+}$cells hold promise as a candidate source for dental pulp regenerative therapy.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-61　非可逆性炎歯髄由来幹細胞は歯髄再生治療に応用可能か？

○園田聡一朗[1,2]，山座　孝義[2]，久木田敏夫[2]

[1]九大　院歯　歯周病
[2]九大　院歯　分子口腔解剖

【目的】成体幹細胞や前駆細胞は組織，臓器を維持し，修復する過程で重要な役割を果たす．現在これらの細胞を用いた組織再生医療の有用性が試行されている．歯科臨床において，非可逆性に炎症が波及していると診断された歯髄組織は，一般的に全部除去（抜髄）される．歯髄は自己再生能力を備えていないため，抜髄後の歯髄腔は人工補填材で置換（根管充填）される．抜髄・根管充填処置を受けた歯は，強度が低下し，またウ蝕防御機能も失われていることから，抜歯に至るケースもある．従って，抜髄後における歯髄組織再生療法は，失われた歯髄内環境を再構築するための究極の歯内治療法と考えられる．本研究では，不可逆性歯髄炎であると診断され，除去された歯髄組織から歯髄幹細胞（human dental pulp stem cells in irreversible inflamed dental pulp tissues : DPSC-IP）を単離し，その幹細胞学的能力を詳細に評価することを目的とした．【方法】九州大学病院にて，不可逆性歯髄炎と診断された抜去歯髄組織および健康智歯より採取した歯髄組織を用いた．抜去歯髄組織より付着コロニー形成法により DPSC-IP を単離し，間葉系幹細胞としての能力を正常 DPSC と比較した．【結果と考察】DPSC-IP は，コロニー形成能，自己複製能，間葉系幹細胞表面マーカー発現，多分化能，in vitro/in vivo 象牙質形成能，免疫抑制能を示した．これは，単離細胞が間葉系幹細胞としての能力を維持していることを示唆した．DPSC と比較すると，DPSC-IP では全ての能力において劣っていた．以上の結果より，DPSC-IP は組織再生治療の細胞ソースとして能力的に不十分であることが示唆された．したがって，DPSC-IP を組織再生治療に用いるためには，その幹細胞としての能力を回復させることが必須であると示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Can irreversible inflamed dental pulp-derived dental pulp stem cells be suitable for dental pulp regeneration?

○Sonoda S[1,2]，Yamaza T[2]，Kukita T[2]

[1]Dept Periodontol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Mol Anat and Cell Biol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Purpose: Adult stem/progenitor cells play a critical role in maintaining and repairing the tissues/organs, and considered to use for tissue regeneration. Clinically, an irreversible pulpitis tissue is entirely removed, and replaced totally with artificial materials. Regeneration of infected pulp tissue by human dental pulp stem cells（DPSC）may reconstruct the physiological condition in dental pulp environment. We aimed to elucidate the stem cell properties of DPSC in irreversible inflamed dental pulp tissues（DPSC-IP）. Methods: All of dental pulp samples were obtained as discarded biological/clinical samples in Kyushu University Hospital. Inflamed dental pulp tissues were collected from permanent teeth that were diagnosed clinically with irreversible pulpitis under pulpectomy. Healthy pulp tissues were from clinically health impacted third molars. We isolated DPSC-IP, and compared the stem cell properties of DPSC-IP with that of healthy DPSC. Results & Conclusion: We found that DPSC-IP expressed lower mesenchymal stem cell property of colony formation, population doubling, cell proliferation, in vitro and in vivo dentinogenesis, and immunosuppression, when compared to healthy DPSC. Taken together, these findings suggest that it is necessary to improve DPSC-IP function before using dental pulp tissue regeneration.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-62　歯槽骨に及ぼすパラソルモンの間欠投与の影響

○建部　廣明，入江　一元

北医療大　歯　口腔構造　機能発育

【目的】パラソルモン（PTH）の間欠投与によって，骨の同化作用が起こることが報告され，骨粗鬆症患者の骨量維持に PTH 製剤が臨床応用されている．歯科領域でも，動物実験で抜歯後の PTH 間欠投与は抜歯部位の歯槽骨吸収を抑制することが報告されている．歯槽骨は咬合や咀嚼による機械的刺激が常に加わり，骨改造が促進するとともに骨量が維持されている．しかし，歯槽骨における機械的刺激と PTH 間欠投与の影響に関する報告はない．そこで本研究は，機械的刺激を減少させた歯槽骨における PTH の間欠投与の影響を組織学的に検索した．

【方法】6 週齢 SD ラットの上顎左側第一臼歯を抜去後，PTH（80 μg/kg）を 2 日に 1 回腹腔内投与した．4, 7, 28 日後に動物を屠殺，固定後，下顎骨を摘出し，軟エックス線を撮影した．2 週間脱灰後，通法に従いパラフィン切片を製作し，下顎臼歯部を組織学的に検討した．

【結果と考察】軟エックス線像所見では下顎左側臼歯部の挺出は，4,7,28 日で認められなかった．また，PTH 投与群，非投与群に関わらず下顎左側第一臼歯根間部の方が，下顎右側第一臼歯根間部に比べ骨髄腔の大きさに違いがみられた．光学顕微鏡の所見では，下顎左側第一臼歯部根間部の歯槽骨内の骨髄腔の大きさは PTH 投与群と非投与群の間に明確な違いは認められなかった．また下顎右側第一大臼歯根間部の歯槽骨内の骨髄腔の大きさは，PTH 投与群の方が非投与群に比べてやや小さくなっていた．PTH 間欠投与による骨形成効果は咬合力がかかる環境で多く認められた．PTH 間欠投与は機械的刺激がある環境下で効果が認められることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effects of intermittent PTH on alveolar bone

○Takebe H，Irie K

Dept Histol, Health Sci Univ Hokkaido

Purpose: The intermittent administration of parathyroid hormone（PTH）initially stimulates bone formation and then promotes bone remodeling. Intermittent PTH therapy has been approved for the clinical treatment of osteoporosis and that promotes tooth extraction socket healing. Mineralized alveolar bone mass is maintained under the mechanical loading by mastication. However, there are few reports about that the interaction of intermittent PTH administration and mechanical loading on alveolar bone. The present study aimed to evaluate the effects of intermittent PTH on alveolar bone in relation with mechanical loading.

Materials and Methods: 6 weeks SD male rat's maxillary left first molar teeth were extracted under general anesthesia. PTH（80 microgram/kg）was administered at every 2 days for 4,7 and 28 days. Rats were euthanized at the end of the experimental periods and the mandibles were dissected after fixation. Soft X-ray was taken and specimens were placed in EDTA for decalcification. Then samples were embedded in paraffin and observed histologically.

Results & Conclusion: Elongated tooth was not observed during experimental periods. PTH decreased bone marrow space in interradicular septum of right mandibler first molar teeth. This study suggested that intermittent PTH promotes bone formation under mechanical loading.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-63 副甲状腺ホルモン投与ならびに授乳期にカルシウム欠乏食投与によって誘導される骨細胞周囲の骨基質変化について

○本郷　裕美[1]，佐々木宗輝[2]，斎藤　雅美[3]，宇田川信之[4]，網塚　憲生[1]

[1]北大　院歯　硬組織発生
[2]長崎大　院医歯薬　インプラント
[3]ブルカー AXS（株）
[4]松本歯大　口腔生化

【目的】1960 年代に Bélanger によって提唱された PTH 投与による骨細胞性骨溶解，および授乳期において母乳への Ca 排出量が過剰となった際に見られる骨細胞周囲の骨基質溶解について組織化学的に検索を行った．【材料と方法】生後 11 週齢の雄性 ICR マウスおよび *RANKL*$^{-/-}$マウスに hPTH（1-34; 80 μg/kg）を外頸静脈から投与した．さらに生後 12 週前後の妊娠マウスに 10 日間アレンドロネートを投与する群としない群に分け，出産直後から Ca 欠乏食（Ca:0.018%）を給餌した．それぞれ数時間後に固定し，血中 Ca 濃度測定，骨細胞周囲の骨基質を原子間力顕微鏡（AFM）によるナノインデンテーション，透過型電子顕微鏡（TEM）観察，カルセイン標識による蛍光顕微鏡観察，共焦点レーザー顕微鏡観察，von Kossa 染色を行った．【結果と考察】野生型マウスおよび *RANKL*$^{-/-}$マウスともに PTH 投与 1 時間後で血中 Ca 濃度は上昇し，授乳期マウスではアレンドロネート投与の有無に関わらず，Ca 欠乏食給餌 48h 後で血中 Ca 濃度は低下した．PTH 投与 6 時間後あるいは Ca 欠乏食給餌 48h 後で皮質骨の骨小腔が拡大し，その周囲には von Kossa 陰性を示す未石灰化骨基質が見られた．TEM 観察すると骨小腔壁は著しい凹凸を示し，拡大した骨小腔内部にはコラーゲン線維と思われる不定形構造物や断片的な石灰化基質が認められた．AFM 観察では，形状変化を認めない骨細胞周囲の骨基質が弾性率の低下を示した．さらに骨小腔周囲にカルセイン標識を認めたことから，骨細胞は骨小腔壁を溶解するだけでなく，その後石灰化沈着すると推測された．以上より骨細胞は，血中 Ca 濃度の変化によって，一過性に周囲の骨基質を溶解または石灰化沈着することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histological alterations of bone matrix surrounding osteocytes in mice with PTH administration and in lactating mice fed with calcium insufficient diet

○Hongo H[1]，Sasaki M[2]，Saito M[3]，Udagawa N[4]，Amizuka N[1]

[1]Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Dept Appl Pros, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[3]Bruker AXS K K
[4]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ

**Introduction:** In this study, we have attempted to histologically verify osteocytic osteolysis proposed by Bélanger in 1960's., using two mice models - PTH administered mice and lactating mice fed with calcium (Ca) insufficient diet. **Materials and Methods:** Wild-type *(wt)* ICR and *Rankl*$^{-/-}$ male mice were injected with hPTH (80 μg; 1-34), and then, bone matrix surrounding the osteocytes was examined under TEM, nanoindentation of AFM, fluorescence microscopy and confocal laser microscopy. Furthermore, we investigated osteocytic lacunae in lactating mice fed with Ca insufficient diet with or without administration of alendronate for 10 days. **Results and Discussion:** At six hours after PTH administration, enlarged osteocytic lacunae were observed in the cortical bone, and von Kossa staining demonstrated demineralized bone matrix surrounding the osteocytes. Under TEM observation, there are some fragmented collagen fibrils and pieces of mineralized matrices in enlarged osteocytic lacunae which showed irregularly-shaped walls. Calcein labeling was seen on the walls of some osteocytic lacunae. In lactating mice fed with Ca insufficient diet with alendronate administration, consistently, the osteocytic lacunae were enlarged, and sometimes labeled with calcein. It seems likely, therefore, that osteocytes enable to erode the surrounding bone matrix and deposit minerals on their lacunae.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-64 糖尿病が骨細胞に与える組織化学的影響について —SDT fatty ラットを用いた解析—

○坪井香奈子，本郷　裕美，長谷川智香，網塚　憲生

北大　院歯　硬組織発生

【緒言】 糖尿病は，骨質劣化や骨密度低下により糖尿病性骨粗鬆症を発症することが注目されているが，その組織化学的解析は未だに少ない．そこで今回我々は，SDT（Spontaneously Diabetic Torii）fatty ラットを用いて糖尿病が骨の細胞群，特に骨細胞に与える影響について組織化学的に検索した．【材料と方法】 生後 42 週齢 SDT fatty ラット，および，コントロール群として同週齢・同系列の SD ラットを用いた．脛骨を通法にて固定しパラフィン切片を作製した．ALP，DMP-1，chondroitin-4-sulfate，オステオカルシン，$\alpha$-SMA の組織化学および鍍銀染色を行った．【結果と考察】 SDT fatty ラットではコントロール群と比較し，骨幹端骨梁の幅が減少し，骨梁の連続性が途絶える傾向を認めた．コントロール群では ALP 陽性を示す活性型骨芽細胞が観察されたが，SDT fatty ラットの骨芽細胞は扁平化し，ALP 強陽性を示す活性型骨芽細胞はほとんど認めなかった．鍍銀染色を行うと，SDT fatty rat の骨梁および皮質骨における骨細胞・骨細管系は規則的な走行を示した．しかし，コントロール群とは異なり，SDT fatty ラットの骨梁における骨細管では chondroitin-4-sulfate や DMP-1 の陽性反応が減弱していた．さらに，近年，インスリンの分泌に関与していると言われているオステオカルシンを検索すると，SDT fatty ラットの骨細胞はオステオカルシン陽性を示した．また，SDT fatty ラットの骨幹部骨髄において多数の $\alpha$-SMA 陽性細胞を認め，血管平滑筋細胞が増加していることが示唆された．【結語】 糖尿病は骨細胞・骨細管系に何らかの影響を与えることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histochemical examination on bone cells in obese type 2 diabetic SDT fatty rats

○Tsuboi K，Hongo H，Hasegawa T，Amizuka N

Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

Introduction: It is known that diabetes mellitus is associated with increased risk of fracture, i.e., diabetic osteoporosis. However, it is still veiled what happens on bone cells in a state of diabetes mellitus. In this study, we have examined histological properties of bone cells, especially osteocytes, in the spontaneously diabetic Sprague-Dawley Torii（SDT）fatty rat, a new model of type 2 diabetes. Materials and Methods: Forty two male SDT-fa/fa（fatty）rats and age-matched SD rats were fixed, and their tibiae were embedded into paraffin for histochemical detection of ALP, DMP-1, chondroitin-4-sulfate, osteocalcin, Alpha-SMA and silver impregnation. Results and Discussion: Unlike the control group, tibial metaphyses of SDT fatty rats developed thin and fragmented trabecules, in which there seemed no active form of osteoblasts bearing an intense ALP-positivity. Silver impregnation revealed well-arranged osteocytic lacunae and their canaliculi in both control and diabetic rats. However, the SDT fatty rats demonstrated a markedly-reduced immunoreactivity of chondroitin-4-sulfate and DMP-1 in the canaliculi. Osteocalcin immunoreactivity was observed in osteocytes of SDT fatty rats. Alpha-SMA positive vascular smooth muscle cells were increased in number in bone marrow of SDT fatty rats. Taken all together, diabetes mellitus may affect osteocytes and their lacunae and canaliculi system.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-65　Galectin-9による破骨細胞形成抑制機構：MafB制御系関与の可能性

○久本由香里[1]，上原　範久[1]，久木田明子[2]，久木田敏夫[1]

[1]九大　院歯　分子口腔解剖
[2]佐賀大　医　微生物

【目的】Galectin-9は，ガラクトースに対する結合特異性を有するタンデムリピートタイプのレクチンであり，好酸球や好中球，NK細胞に対する走化性因子として作用することにより免疫応答や炎症を制御する．我々はこれまでに，培養破骨細胞においてGalectin-9がTRAP陽性多核細胞の形成を阻害すること，さらにアジュバント誘導性関節炎ラットにおける骨破壊を顕著に抑制することを報告してきた．本研究では，Galectin-9による破骨細胞分化抑制の詳細なメカニズムを解析した．【方法】マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系において，RANKLおよびGalectin-9存在下で培養した細胞を回収し，リアルタイムPCR法により破骨細胞分化マーカーの発現を比較した．また，破骨細胞分化に重要な転写因子の発現と核内移行に対するGalectin-9の影響をウエスタンブロッティング法により解析した．【結果】マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系において，Galectin-9曝露により*Trap*や*Cathepsin K*等の破骨細胞分化マーカーの発現は有意に低下した．RANKL刺激24時間で著明に上昇するNFATc1のタンパク発現は，Galectin-9を同時に曝露することにより顕著に減少したが，c-Fos，c-JunおよびNF-$\kappa$Bの発現と核内移行に変化は認められなかった．そこで，NFATc1の発現を阻害する転写因子であるMafBの発現を検討した．RANKL刺激24時間ではMafBの発現が顕著に抑制されたが，Galectin-9を同時曝露するとその発現抑制が有意に軽減した．【考察】以上の結果から，Galectin-9はAP-1やNF-$\kappa$B経路には影響を与えず，MafBの発現維持を介してNFATc1の発現を制御することにより，破骨細胞分化を抑制する可能性が強く示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Galectin-9 negatively regulates osteoclast differentiation through control of MafB expression

○Kyumoto Y[1]，Uehara N[1]，Kukita A[2]，Kukita T[1]

[1]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Microbiol, Fac Med, Saga Univ

Galectins consist a unique family of lectins that have the ability to bind molecules with $\beta$-galactoside-containing carbohydrates. Galectin-9, a tandem repeat type of galectin, was originally identified as a chemotactic factor for eosinophils and natural killer cells, and is also involved in the regulatory process of immune response and inflammation. We have reported that galectin-9 markedly inhibits the formation of TRAP positive multinuclear osteoclasts in primary bone marrow cells of mice (mBMMs), and that injection of galectin-9 into rats with adjuvant-induced arthritis significantly suppressed bone destruction. Here, we examined the mechanism of negative regulation of osteoclastgenesis by galectin-9. mRNA expression of marker molecules associated with osteoclast differentiation, such as *Trap* and *Cathepsin K*, was remarkably reduced by galectin-9 exposure during osteoclastgenesis in mBMMs. Galectin-9 markedly attenuated RANKL-induced NFATc1 expression, but it did not affect expression and nuclear translocation of c-Fos, c-Jun and NF-$\kappa$B. Expression of MafB, a suppressive transcription factor of NFATc1, was significantly inhibited by RANKL in mBMMs, however, treatment of galectin-9 recovered MafB level. These results suggest that galectin-9 negatively regulates osteoclastgenesis through down-regulating NFATc1 by inducing MafB, without affecting AP-1 and NF-$\kappa$B pathway.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-66 メカニカルストレスによる破骨細胞形成および骨吸収に対する IL-18 の影響の解析

○越智由美子，北浦　英樹，木村　桂介，石田　匡彦，岸川　明子，山本　照子

東北大　院歯　顎口腔矯正

【目的】矯正学的歯の移動のようなメカニカルな負荷が加わると破骨細胞が誘導され骨吸収がおこることが知られている．一方，炎症性サイトカインの一つである interleukin-18（IL-18）は TNF-$\alpha$ による破骨細胞形成を抑制することが報告されている．よって，本研究では矯正学的歯の移動によるメカニカルストレスによっておこる破骨細胞形成および歯根吸収に対する IL-18 の影響と IL-18 および IL-12 を組合せた場合の作用をマウスの矯正学的歯の移動モデルを用いて検討した．【方法および方法】マウスの上顎左側第一大臼歯と切歯間に Ni-Ti 製コイルスプリングを装着し矯正力を負荷した．同時に高濃度の IL-18（1.5 $\mu$g），低濃度の IL-18 および IL-12（それぞれ 0.15 $\mu$g）を単独および組み合わせたものを大臼歯近心歯肉に 1 日おきに注射した．12 日目に屠殺，その後組織切片を作成した．【結果と考察】高濃度の IL-18 を注射したマウスでは歯の移動距離が大きく減少したが低濃度の IL-18 および IL-12 単独では抑制効果が認められなかった．しかし，低濃度の IL-18 と IL-12 を同時に投与したマウスでは抑制効果が認められた．また，組織切片の TRAP 染色を行い破骨細胞を評価したところ同様に高濃度の IL-18 注射群では，破骨細胞数の減少が有意に認められた．また，低濃度の IL-18 と IL-12 を組合せたものでも同様に抑制効果が認められた．【結論】これらの結果から IL-18 は in vivo においてメカニカルストレスによる破骨細胞形成を抑制し，骨吸収を減少させることがわかった．また，IL-18 および IL-12 を組み合わせることにより相乗的に骨細胞形成を抑制することが認められた．以上より，メカニカルストレスによって誘導される破骨細胞は IL-18 等のサイトカインによって制御されることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis for effect of IL-18 on mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption

○Ochi Y，Kitaura H，Kimura K，Ishida M，Kishikawa A，Yamamoto T

Dept Ortho, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Objectives: Cellular responses are mediated by interactions between various factors in mechanical stress-induced osteoclastogenesis. It has been reported that TNF-$\alpha$ plays an important role in mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption. We previously reported that the interleukin-18（IL-18）inhibited TNF-$\alpha$-mediates osteoclastogenesis in vitro and in vivo. However, its influence on mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption is not clear. The aim of this study was to investigate the effect of IL-18 and combination of IL-18 and IL-12 on orthodontic tooth movement（OTM）and associated bone resorption. Materials and methods: An Ni-Ti closed-coil spring was inserted between the upper alveolar bone and upper-left first molar. IL-18 and combination of IL-18 and IL-12 was locally injected adjacent to the first molar every other day. After 12 days, we evaluated the amounts of OTM. Furthermore, the number of TRAP-positive cells as osteoclasts and odontoclasts were counted in histological sections. Results: After 12 days of experimental OTM and the number of osteoclasts were significantly decreased in IL-18 treated mice. Furthermore, IL-12 and IL-18 synergistically inhibited the mechanical stress-induced osteoclast formation and odontoclast formation. Conclusion: Our findings suggested that IL-18 might be useful for regulation of OTM and control of root resorption.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-67　軟骨内骨化における血管内皮細胞の微細構造学的検索

○土屋恵李佳[1,2]，本郷　裕美[1]，山本知真也[1]，長谷川智香[1]，網塚　憲生[1]

[1]北大　院歯　硬組織発生
[2]北大　院歯　口腔診断内科

【目的】 軟骨内骨化における血管侵入の知見は未だ不明な点が多いが，過去において，ドリコスマメレクチン（DBA）陽性 perivascular cell の存在が報告されている（Nakamura and Ozawa 1996）．我々は，さらに検討を進める目的で，成獣期マウスの長管骨の成長板軟骨において，血管内皮細胞の侵入様式，および，その周囲に存在する細胞について微細構造学的に検索した．
【方法】 8 週齢雄性マウスを左心室からアルデヒド液で灌流固定した後，脛骨を摘出後，同固定液で 1 日間，4℃にて浸漬固定した．脛骨サンプルは 5% EDTA で脱灰し，パラフィンまたはエポキシ樹脂へ包埋した．これらの切片上で DBA，MMP-9 と CD31 の免疫組織化学を行うと共に，透過型電子顕微鏡観察を行った．
【結果と考察】 骨・軟骨移行部では，DBA 陽性細胞は，血管内皮細胞に密接して局在したが，血管内皮細胞よりも軟骨側に位置する傾向は認められなかった．従って，血管内皮細胞が肥大化軟骨細胞層への先端側に位置しており，血管内皮細胞の周囲の細胞が様々な残渣の処理を行う可能性が考えられた．肥大化軟骨細胞の小腔に，血管内皮細胞の突起と思われる構造が不連続に挿入されており，また，赤血球が細胞突起で囲まれずに軟骨小腔内に存在していたことから，血管内皮細胞の侵入先端は開放型になっていると推察された．更に，侵入した血管の内腔やその周囲に肥大軟骨細胞の残渣と思われる構造が観察された．また，血管内皮細胞と骨芽細胞が密接に接触する部位も観察された．このように，血管内皮細胞を中心として DBA 陽性細胞や骨芽細胞が局在しており，これら細胞の連携プレーが軟骨内骨化において重要な役割を果たすと考えられる．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Ultrastructural assessment for biological function of vascular endothelial cells at chondro-osseous junction

○Tsuchiya E[1,2]，Hongo H[1]，Yamamoto T[1]，Hasegawa T[1]，Amizuka N[1]

[1]Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Oral Diagnosis Med, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

**Purpose**: Chondro-osseous junction is the site of vascular invasion in the process of endochondral ossification, which replaces epiphyseal cartilage with bone. Previously, DBA-positive perivascular cell was reported to play an important role in endochondral ossification. We have histologically examined vascular invasion of endothelial cells at the chondro-osseous junction of adult mice.
**Materials & Methods**: ICR mice at eight weeks of age were perfused with aldehyde solution, and tibiae were extracted and immersed in the same fixatives. The specimens were decalcified with 5% EDTA and embedded into paraffin and epoxy resin for histochemistry of DBA lectin, CD31 and MMP-9.
**Results & Discussion**: At the tibial chondro-osseous junction, DBA-positive perivascular cells were localized in the close proximity of the invading vascular endothelial cells, but did not precede vascular invasion. Cytoplasmic processes of vascular endothelial cells were shown to extend into the transverse partitions of columns of hypertrophic chondrocytes. Hypertrophic chondrocytes adjacent to such vascular invasion seemed to be intact featuring normal cell organelles and enlarged cell bodies. Some vascular endothelial cells made cell-to-cell contact with osteoblasts. The cellular interplay between the endothelial cells and the surrounding cells seems to be essential for vascular invasion during endochondral ossification.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-68　移植した自家骨組織の経時的観察

○中原　　賢[1]，五十嵐健輔[2]，辻村麻衣子[3]

[1]日歯新潟　先端研
[2]日本歯大　生命歯
[3]日歯新潟　解剖 2

超高齢社会の現在，萎縮した歯槽骨への歯科治療の機会が増えており，そういった欠損補綴に対して，歯科インプラント治療が不可欠の選択肢となっている．近年では，骨欠損部への骨造成が注目されており，骨造成治療を裏付ける基礎的な研究も必要とされている．本研究では，自家骨移植を用いた 2 種類のインプラント埋入手術の経時的変化を観察し，移植した自家骨組織自体の特性と移植骨周囲の既存骨への影響を明らかにすることを目的とした．8 匹の雄ビークル犬の両側下顎臼歯部を抜歯後，その抜歯窩治癒部位に片顎 2ヵ所（両顎 4ヵ所）の骨窩洞を形成し，後頭骨から採取した皮質骨ブロックを移植した．4 匹は同時にインプラントを埋入し，残りの 4 匹は移植皮質骨をスクリュー固定し，6ヵ月後にインプラントを埋入した．どちらの手術法も，インプラント埋入後の治癒期間は 3ヵ月と 6ヵ月とした．屠殺後採取したインプラント周囲骨は micro-CT 撮影後，樹脂包埋し作製した研磨切片を用いて，骨ラベリング観察や骨形態計測を含む組織学的解析を行った．一部の試料は，パラフィン切片による組織学的観察を行った．移植後 3ヵ月から 12ヵ月までの経時的観察により，移植された自家骨はリモデリングにより周囲既存骨と境界がなくなり，既存骨と同様の緻密骨となることが明らかになった．さらに，インプラント埋入に対する移植骨組織の反応に関して，両手術法で差異がほとんど認められなかったため，自家骨移植後，早期に移植骨組織は機能することが推察された．以上より，移植した自家骨は，移植後早期に周囲既存骨と結合し，インプラントなどの侵襲に耐えうる機能した骨となることが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Chronological observation of the autogenous cortical bone graft

○Nakahara K[1]，Igarashi K[2]，Tsujimura M[3]

[1]Adv Res Center, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[2]Dept Life Sci Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[3]Dept Histol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

With the recent development and popularization of dental implants, pre-implant surgery increasingly focuses on severe alveolar atrophy. The aim of this study was to find out the characteristic of autogenous cortical bone graft by two surgical procedures of implant placement. Eight male Beagle dogs were used in this study. Four standardized alveolar bone defects were made in the mandible. The cortical bone graft taken from calvaria region was put into the defect in all dogs. In the four animals, implantation was performed simultaneously; on the other hand, implants were inserted at six months after the bone graft, in the other four dogs. Animals of both Groups were euthanized at three and six months of consolidation period after the implantation. The harvested samples were analyzed by means of histology and micro-CT. The bone remodeling has progressed from three months to twelve months after the bone graft. Bone consolidation to the pristine bone was chronologically advanced and the margin between the cortical bone graft and pristine bone became unclear. In this study, both surgical procedures using cortical bone graft from the calvaria demonstrated sufficient remodeling and integration between graft bone and pristine bone.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-69　口腔粘膜上皮におけるタイトジャンクション構成タンパクの局在

○塩津　範子[1,2]，池亀　美華[2]，鳥井　康弘[1]，山本　敏男[2]

[1]岡大病院　総合
[2]岡山大　院医歯薬　口腔形態

【目的】タイトジャンクション(TJ)は一般に隣接する単層上皮細胞を密着させ，細胞間のバリア機能に関与している．近年，重層扁平上皮にも TJ の存在が報告され，例えば皮膚では水分蒸散に対するバリア機能が明らかになっている．これまで我々は，咀嚼粘膜である口蓋粘膜上皮の TJ についてその存在，分布ならびに構成タンパクを微細構造学的，免疫組織化学的，生化学的に調べ，顆粒層上部に TJ が存在することを明らかにした．今回，種々の口腔粘膜上皮における TJ の存在，分布，構成タンパクを明らかにすること目的として，歯肉内縁上皮と被覆粘膜である舌下粘膜における構成タンパクであるオクルディン(OCD)とクローディンファミリー(CLDs)の発現および局在を観察した．
【方法】8 週齢マウスの上顎歯周組織，舌下粘膜を採取し，コンパウンドに凍結包埋し，5 μm の未固定未脱灰凍結切片を作製した．なお，上顎歯周組織は cryofilm（SECTION-LAB Co. Ltd.）を用いて，川本法にて切片を作製した．OCD，CLD-1, -4 の蛍光免疫染色を行い，歯肉内縁上皮（歯肉溝上皮，付着上皮），舌下粘膜をレーザー顕微鏡にて観察した．
【結果】OCD，CLD-1, -4 の蛍光免疫反応は，歯肉溝上皮，付着上皮ともに扁平な細胞層で，また，舌下粘膜では顆粒層の上層でそれぞれ細胞間に点状の陽性反応を認めた．さらに CLD-1, -4 はいずれの上皮でも点状の反応部位より下層の細胞間では網目状に陽性反応が認められた．
【考察】歯肉内縁上皮および舌下粘膜ともに TJ 構成タンパクである OCD，CLD-1, -4 が認められた．OCD と CLDs が共在している部位に TJ が存在すると言われているので，歯肉内縁上皮および舌下粘膜においても OCD と CLD-1, -4 の両者が共に陽性の部位に TJ が存在すると考えられる．両上皮で観察された構成タンパクの発現および局在に差異は認められず，かつ従来報告した口蓋粘膜上皮と同様であった．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Distribution patterns of tight junction associated proteins, occludin and claudins in the oral mucosal epithelium of mice

○Shiotsu N[1,2], Ikegame M[2], Torii Y[1], Yamamoto T[2]

[1]Okayama Univ Hosp, Comprehensive Dent Clinic
[2]Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Dept Oral Morphol

TJ is one of the cell-cell adhesion systems and is known to have the barrier function between adjacent simple epithelial cells. We previously showed that TJs existed in the upper layer of the stratum granulosum of the palate epithelium in mice and that OCD, CLD-1, and -4 were detected as the constituent proteins the junction. In this study, we examined the expression patterns of OCD and CLDs in sulcular and junctional epithelia, and sublingual mucosa. OCD, CLD-1, and -4 were positively stained in flattened cell layer in sulcular and junctional epithelia, while in the upper layer of the stratum granulosum in sublingual mucosa. The positive reactions were seen as dot-like fluorescence at the upper site of the positive area. In addition to this reactivity, CLD-1 and -4 also showed positive as the mesh-like pattern indicating the cell profiles at the lower part of positive cell layers. From these results, it is considered that TJs exist at the both OCD and CLDs positive points in sulcular and junctional epithelia, and sublingual mucosa. No difference was observed among the epithelium examined. These results were in concert with palatal epithelium on the expression and localization of OCD and CLDs.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-70 口腔カンジダ症を選択的に標的とする免疫制御機構の解明

○田崎　園子[1,2]，長　　環[1]，永尾　潤一[1]，成田　由香[1]，橋本麻利江[1]，小島　　寛[2]，
田中　芳彦[1]

[1]福歯大　感染生物
[2]福歯大　障害者歯

ヒトの口腔真菌感染症の一つである口腔カンジダ症は口腔真菌感染症の中で最も頻度が高く，日本国内の高齢化が進む中で義歯の使用と相まって患者数が増加傾向にある疾患である．Th17 細胞欠損マウスでは口腔カンジダ症が重篤化し，その病態には IL-17 を産生することを特徴とするヘルパー T 細胞 Th17 が重要な役割を果たしていることが知られているが，その制御機構については未だに不明な点が多い．また，抗真菌薬の種類は非常に少なく，再発による耐性化の問題もあり，新しい予防・治療法の開発が望まれている．今回，我々は全ゲノム配列の判明している *Candida albicans*（*C. albicans*）SC5314 株を対象とし，ヘルパー T 細胞の免疫応答を引き起こす抗原決定基を探索する過程で，IL-17 を産生するヘルパー T 細胞を誘導する可能性のある菌体構成成分を見い出したので報告する．方法としては，野生型マウス（C57BL/6）骨髄細胞由来の樹状細胞を抗原提示細胞とし，抗原に *C. albicans* を使用した．これらの刺激によって野生型マウスから単離したナイーブ T 細胞を *in vitro* で分化誘導させ，細胞内サイトカイン染色後にフローサイトメーターにより評価した．抗原としては *C. albicans* の全菌体成分の他に，本菌より抽出した細胞壁・細胞膜・細胞質といった各種画分を使用した．本講演では，*C. albicans* 菌体からの各種分画成分のヘルパー T 細胞誘導能について議論する予定である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Selective immune regulation by novel targets against oral candidiasis

○Tasaki S[1,2]，Cho T[1]，Nagao J[1]，Narita Y[1]，Hashimoto M[1]，Kozima H[2]，Tanaka Y[1]

[1]Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll
[2]Sec Dent for the Disability, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll

*Candida albicans*, a commensal fungus of the normal flora of the oral cavity, causes oral candidiasis in humans with localized or systemic immune deficiencies. The increasing incidence of resistance to antifungal drugs and an inherent drug tolerance of some fungi cause major obstacles to an efficient treatment. This situation evokes an urgent need for the development of novel therapeutic approaches against fungal infections. T helper cells play a critical role in oral candidiasis control. However, specific antigen determining the activation and function of antifungal T helper cells remain largely unknown. The aim of study is to identify the T cell epitopes of *C. albicans*. $CD4^+$ naive T cells isolated from lymph nodes of wild type mice（C57BL/6）were stimulated with bone marrow-derived dendritic cells and *C. albicans* components（cell wall, cell membrane and cytoplasm）. We evaluated the differentiation of the T cells using intracellular cytokine staining flow cytometry. Here, we will discuss the potential of *C. albicans* components to induce T helper cells development.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-71　咀嚼粘膜に発現するB7-H1は過度な免疫応答による損傷を保護している

○Kang Siwen，大野　建州，永井　重徳，東　みゆき
医科歯科大　院医歯　分子免疫

## Masticatory mucosa-associated B7-H1 protects excess immune-related tissue damage

○Kang SW，Ohno T，Nagai S，Azuma M
Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

［Purpose］Immune checkpoint receptors such as CTLA-4 and PD-1 play crucial roles for maintaining self-tolerance and preventing excess tissue damages by immune responses against exogenous antigens. B7-H1（CD274）is one of ligands for PD-1 and often induced on non-lymphoid tissue cells at the inflammatory condition as well as lymphoid cells. We previously reported that B7-H1 was physiologically induced on prickle cells of masticatory mucosae such as dorsal surface of tongue（DST）, gingiva and hard palate. Various topical stimuli could induce B7-H1, but the expression level on the basal cells was consistently limited. In this study, we examined functional contribution of masticatory mucosa-associated B7-H1 in local inflammatory responses.［Results］Topical painting with OVA and/or DNFB onto the skin, buccal mucosa（BM）, or DST induced B7-H1 along with the basal cell proliferation, however the induced levels on basal cells of BM and DST were clearly impaired. Transfer of in vitro activated DO11.10 T cells and OVA/DNFB painting onto DST induced local inflammation, but these inflammatory responses were further enhanced by treatment with a neutralizing anti-B7-H1 mAb. B7-H1 expression was observed in both epithelial cells（EC）and infiltrating immune cells and infiltrating T cells expressed PD-1. Thus, to distinguish the contribution of EC-associated B7-H1, we established B7-H1/PD-1 double-knockout bone marrow（BM）chimera mice that selectively lack B7-H1/PD-1 expression on immune cells. Similar transfer of activated DO11.10 T cells and OVA/DNFB-painting induced local infiltration of PD-1+ DO11.10 CD4+ T cells over the basement membrane. Blockade of B7-H1 further increased CD4+ T cell infiltration with severe damage of epithelium. Transfer of PD-1-/- DO11.10 T cells also showed the enhanced local inflammation.［Discussion］These results suggest that masticatory mucosa-associated B7-H1 negatively regulates effector function of PD-1+ T cells and protects from excess tissue damages mediated by immune cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-72　新規免疫系シグナル分子によるアレルギー制御機構の解明

○橋本麻利江[1]，永尾　潤一[1]，田崎　園子[1]，成田　由香[1]，長　　環[1]，湯浅　賢治[2]，田中　芳彦[1]

[1]福歯大　感染生物
[2]福歯大　画像診断

口腔アレルギーは口腔内の環境が原因で起こる歯科口腔領域の疾患で，その患者数は先進国を中心に顕著に増加しており，治療法について社会的関心は高い．口腔アレルギーの病態は，花粉症アレルギーを背景にして交差反応で生じる口腔食物アレルギーや，指輪・ネックレス・ピアス使用者において歯科治療後に生じる口腔金属アレルギーといったように多岐にわたる．何れもヘルパーT細胞による免疫応答が深く関与している．我々はこれまでに，ヘルパーT細胞による免疫応答を制御するシグナル分子として，Rhoファミリー低分子Gタンパク質の活性を制御するグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）としての機能をもつ様々な分子の解析を行ってきた．本研究では，古典的GEFやDOCKファミリーとは異なる新しいタイプのGEFに着目し，アレルギー反応に関連したヘルパーT細胞の分化をシグナル伝達の視点から解析することを目的としている．ヘルパーT細胞の各種サブセットへの分化条件における新しいタイプのGEFの発現をウエスタンブロットにより解析したところ，Th1，Th17，Treg細胞では発現が認められず，Th2細胞特異的で，さらにIL-2とIFN-γに対する中和抗体の共存により強力に発現する新しい免疫系シグナル伝達分子を同定した．現在，口腔アレルギーの病態とその制御機構を解明するために，新しく同定した分子のT細胞の分化と遊走における機能を詳細に解析している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The identification and characterization of a novel immune signaling molecule involved in allergic response

○Hashimoto M[1]，Nagao J[1]，Tasaki S[1]，Narita Y[1]，Cho T[1]，Yuasa K[2]，Tanaka Y[1]

[1]Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll
[2]Sec Image Diagno, Dept Diagno Gene Care, Fukuoka Dent Coll

T helper cells especially Th2 cells play a central role in allergic response. However, molecular mechanism of differentiation of T helper cells into Th2 cells has not been completely elucidated. Guanine nucleotide exchange factors（GEFs）regulate the switch between the GDP- and GTP-bound forms of Rho GTPases, which have important roles such as cytoskeletal reorganization, gene expression, cell differentiation and migration in T helper cells. Our group has conducted various molecules of GEFs belonging to Dbl and DOCK family proteins. In this study, we focus on the signaling pathway of GEF-Rho GTPases to clarify the molecular mechanism of allergy-specific differentiation of T helper cells. We found a novel GEF molecule which was different from Dbl and DOCK family proteins, expressed specifically in Th2 cells during the differentiation of T helper cell among Th1, Th2, Th17 and regulatory T cell. The molecular function of the novel GEF molecule in cell differentiation and migration in T helper cells are now under investigation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-73 口腔バイオフィルム初期形成期における cyclic dipeptide の影響

○眞島いづみ[1,2]，宮川　博史[2]，中澤　　太[2]

[1]学振　特別研究員　PD
[2]北医療大　歯　微生物

【背景】*Streptococcus* 属と *Veillonella* 属細菌は口腔バイオフィルムの初期形成を担うことが報告されている．我々のこれまでの研究過程において，*V. tobtsuensis* の存在下で *S. gordonii* のバイオフィルム形成量が著しく増加することを明らかにし，かつ *V. tobetsuensis* の培養上清中に cyclic dipeptide, Autoinducer（AI）-1, AI-2 様物質が強く検出されることを報告した．【目的】cyclic dipeptide が Autoinducer 様物質として，*S. gordonii* と *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に与える影響を解析した．【方法】cyclic dipeptide である cyclo（-L-Leu-L-Pro）（CHEM-IMPEX INT'L INC.）を段階希釈後，培地に添加し，*S. gordonii* と *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に及ぼす影響をワイヤー法で解析した．【結果】cyclo（-L-Leu-L-Pro）は，*S. gordonii* 及び *V. tobetsuensis* の生育及びバイオフィルム形成において有意な影響は及ぼさなかった．【考察】本研究の結果から，*V. tobetsuensis* 由来 cyclic dipeptide 様物質は，*S. gordonii* 及び *V. tobetsuensis* のバイオフィルム形成に影響を与えず，通常の Autoinducer として働く可能性は低いことが考えられた．また，*V. tobetsuensis* 存在下で，*S. gordonii* のバイオフィルムを増加させる因子は，cyclic dipeptide 様物質以外の因子であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of cyclic dipeptide on the oral biofilm formation at early stage

○Mashima I[1,2]，Miyakawa H[2]，Nakazawa F[2]

[1]Research Fellow JSPS
[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Backgrounds: It is suggested that oral *Veillonella* has important roles with oral *Streptococcus* in the biofilm formation at early stage. Our previous study demonstrated that *V. tobetsuensis* promotes to form the biofilm of *S. gordonii* significantly. Also, It has been previously reported that cyclic dipeptide, Autoinducer（AI）-1 and AI-2 like substance were detected in the supernatant from *V. tobetsuensis* as strong signals. Purpose: In this study, the effects of cyclic dipeptide on the biofilm formation of *S. gordonii* and *V. tobetsuensis* were investigated. Method: Cyclic dipeptide, cyclo（-L-Leu-L-Pro）were added to the medium after making serial dilution. The biofilm was quantified by using wire method reported previously. Results: Cyclic dipeptide had no effects on the growth and biofilm formation of *S. gordonii* and *V. tobetsuensis* significantly. Discussion & Conclusion: It was suggested that cyclic dipeptide like substance from *V. tobetsuensis* had no effects on the biofilm formed by *S. gordonii* and *V. tobetsuensis*. These facts proposed that the promotion factor of the biofilm formed by *S.gordonii* with *V. tobetsuensis* might be any other substances in the supernatnats from *V. tobetsuensis*.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-74 *Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素に着目した分子進化解析

○山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，広瀬雄二郎[1,2]，後藤　花奈[1]，住友　倫子[1]，川端　重忠[1]

[1]大阪大　院歯　口腔細菌
[2]名大　院医　泌尿器

*Streptococcus agalactiae* は新生児の細菌性髄膜炎の主な原因菌であり，健常な小児の咽頭や成人の腸管，膣などから分離される．本菌は，シアル酸が表層に局在する莢膜多糖を産生する一方，肺炎球菌のシアル酸分解酵素 NanA と相同性の高い分子を有する．小児に細菌性髄膜炎を惹き起こす肺炎球菌においては，NanA が中枢神経系への侵入因子および抗貪食因子として働くことが報告されている．そこで本研究では，*S. agalactiae* の NanA 様分子の系統解析と機能の検討を行った．

アミノ酸配列の比較解析から，*S. agalactiae* の NanA 様分子は，肺炎球菌の NanA で保存される糖鎖認識部位と細胞壁架橋モチーフを欠落することが明らかとなり，この分子を NonA と命名した．*nanA* と *nonA* の遺伝子配列を用いて，ベイズ法および最尤法により作成した系統樹から，*nonA* は *nanA* から派生したことが示唆された．次に，*S. agalactiae* の *nonA* 欠失株ならびに NanA 発現 *nonA* 欠失株を作製し，シアル酸分解能を比較したところ，野生株と *nonA* 欠失株では分解活性が認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株は高い分解活性を呈した．また，野生株と各変異株を用いてヒト脳血管内皮細胞への侵入試験を行った結果，野生株と *nonA* 欠失株の侵入能に差は認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株は両株と比較して約 3 倍の細胞内侵入率を示した．さらに，血中殺菌試験を行ったところ，野生株と *nonA* 欠失株に差は認められなかったが，NanA 発現 *nonA* 欠失株の血中生存率は両株と比較して約 3 割に低下した．

これらの結果から，NonA は進化の過程でシアル酸分解能を失い，*S. agalactiae* のヒト脳血管内皮細胞への侵入ならびに血中生存能に寄与しないことが示唆された．また，*S. agalactiae* がシアル酸分解能を失い，莢膜シアル酸を持つという新たな生存戦略を選択した可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular evolutionary analysis on inactive sialidase of *Streptococcus agalactiae*

○Yamaguchi M[1]，Nakata M[1]，Hirose Y[1,2]，Goto K[1]，Sumitomo T[1]，Kawabata S[1]

[1]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Urol, Nagoya Univ Grad Sch Med

*Streptococcus agalactiae*, a leading cause of meningitis in human newborns, is commonly isolated from pharyngeal, rectal, or virginal sites. *S. agalactiae* contains pneumococcal sialidase-like protein, whereas the sialic acid-capsule of *S. agalactiae* is a critical virulence factor. The sialidase of *Streptococcus pneumoniae*, NanA, functions as an invasin of central nervous system and anti-phagocytic factor. In this study, we analyzed the role of *nanA*-ortholog of *S. agalactiae* in the pathogenesis.

We named the *nanA*-ortholog as "*nonA*", since computational analysis showed that NonA lacks the lectin-domain and cell wall anchoring motif conserved in NanA. Phylogenetic analysis indicated that *nonA* was derived from *nanA*. *S. agalactiae* wild-type and *ΔnonA* strains did not show sialidase activity, but *ΔnonA*-pNanA strain showed high activity. The invasion rate of *ΔnonA*-pNanA strain into human brain microvascular endothelial cells was more than three times higher than that of wild-type and *ΔnonA* strains, while there were no differences between wild-type and *ΔnonA* strains. Interestingly, the growth rate of *ΔnonA*-pNanA strain in human blood was ～30% of that of wild-type and *ΔnonA* strains.

These results indicated that NonA lost its sialidase activity during evolutional history and *S. agalactiae* acquired another survival strategy with sialic acid-capsule instead of the active sialidase.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-75　甘草由来グリチルレチン酸誘導物質の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性の検討

○大山健太郎[1,2]，松尾　美樹[2]，小松澤　均[2]

[1]鹿児島大　院医歯　顎顔面外科
[2]鹿児島大　院医歯　口腔微生物

［目的］黄色ブドウ球菌(Sa)は，ヒトの鼻口腔・皮膚常在菌として知られ，化膿性疾患等の日和見感染症を引き起こす．本研究では，天然成分である甘草から抽出したグリチルレチン酸誘導体のSaに対する抗菌効果について検討した．［材料および方法］Sa臨床分離株として，メチシリン耐性Sa18株とメチシリン感受性Sa32株の計50株を用いた．甘草由来グリチルレチン酸誘導物質として，グリチルレチン酸ニカリウム(GRA-K)，3－サクシニルオキシグリチルレチン酸ニナトリウム(S-GRA)，グリチルレチン酸(GRA)，グリチルレチン酸ステアリル(GRA-S)，ステアリン酸グリチルレチニル(SA-GR)を用いた．抗菌活性評価は，微量液体希釈法（MIC法）と短時間処理による生菌数の変化を，検討した．また，薬剤の機能評価として，菌体結合能について検討した．さらに，種々の抗菌剤との併用による相乗効果についても検討した．［結果］Sa臨床分離株50株の検討の結果，GRA，S-GRAにて強い抗菌活性が認められた．また，GRAおよびS-GRAはいずれもSaに対する増殖抑制効果が認められ，その効果は静菌的であった．菌結合能試験より，S-GRAはSa菌体との結合を認めた．抗菌剤との併用実験では，ゲンタマイシンおよびテトラサイクリンとの併用効果を認めた．［結論］本研究より，GRAおよびS-GRAはSaに結合し静菌的抗菌活性を有することが示唆された．（非会員研究協力者：池内慎悟3)，中原達雄3)）3）丸善製薬株式会社　研究開発本部

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The study of antimicrobial effect against *S. aureus* by glycyrrhetinic acid derivatives from licorice

○Oyama K[1,2]，Matsuo M[2]，Komatsuzawa H[2]

[1]Dept Oral Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

［Purpose］*Staphylococcus aureus*（Sa), known as commensal bacteria in human, cause opportunistic infection. In this study, we evaluated the antimicrobial effect of glycyrrhetinic acid derivatives against Sa. ［Material and Method］Fifty Sa clinical isolated strains including 18 methicillin resistant strains and 32 methicillin sensitive strains were used. We evaluated the antimicrobial effect of 5 glycyrrhetinic acid derivatives（dipotassium glycyrrhizate［GRA-K］, disodium succinoyl glycyrrhetinate［S-GRA］, glycyrrhetinic acid［GRA］, stearyl glycyrrhetinate［GRA-S］, and glycyrrhetinyl stearate［SA-GR］）against Sa. We determined minimum inhibitory concentration（MIC）of each agent and also the killing ratio with short time exposure of the agent. We also evaluate the binding ability of GRA and S-GRA with bacterial cells. Furthermore, we investigated the synergistic effect of GRA or S-GRA with other antimicrobial agents. ［Result］We found the strong antimicrobial activity in GRA and S-GRA against allSa strains, while other agents had no or weak activity. The antibacterial activity of GRA and S-GRA against Sa was bacteriostatic. As the result of binding experiment, GRA and S-GRA significantly bound to Sa. Synergistic effect was observed when GRA and S-GRA was used with gentamicin or tetracycline. ［Conclusion］In this study, we revealed that GRA and S-GRA had the bacteriostatic antimicrobial effect against Sa.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-76 *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株の 60-kDa 線毛について

○古谷田泰徳，佐々木　悠，渡辺　清子，浜田　信城

神奈川歯科大　微生物感染

【目的】*Porphyromonas salivosa* は，主にネコの歯肉溝に存在する偏性嫌気性グラム陰性の黒色色素産生細菌で，ヒト歯周病に深く関わる *Porphyromonas gingivalis* と同属の細菌である．今回，我々は *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株から線毛の分離精製を行い，その性状について検討を行った．【方法】線毛の精製：*Porphyromonas salivosa* を一昼夜培養，菌体を超音波処理後，遠心した上清を 40％硫安により粗線毛を分画し，DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換クロマトグラフィーを行って線毛の精製を行った．線毛タンパク質の分子量決定：12％ SDS-PAGE を用いて決定した．線毛の抗原性：精製線毛に対する特異抗体を作製し，Western blot 法と金コロイド法による免疫電子顕微鏡観察を行った．アミノ酸シークエンス：精製線毛タンパク質をニトロセルロース膜に転写後，プロテインシークエンサーを用いて決定した．【結果および考察】*Porphyromonas salivosa* から分離した線毛タンパク質の推定分子量は 60-kDa であった．この 60-kDa 線毛は，*Porphyromonas gingivalis* に存在する 41-kDa 線毛，53-kDa 線毛および 67-kDa 線毛とは抗原性が異なり，N 末端アミノ酸配列も 15 残基中 3 つのアミノ酸のみが同一であった．以上の結果から，*Porphyromonas salivosa* 菌体表面には，*Porphyromonas gingivalis* 線毛とは明らかに異なるタンパク質で構成される線毛が発現していることが明らかになった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of 60-kDa fimbria from *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407

○Koyata Y，Sasaki H，Watanabe K，Hamada N

Dept Microbiol, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ

Background: *Porphyromonas salivosa* is often isolated from the gingival sulcus of cats. In this study, we have purified fimbriae from *P. salivosa* ATCC 49407 and compared to the characteristics of *P. gingivalis* fimbriae. Methods: The fimbrial protein was purified from *P. salivosa* ATCC 49407 by a DEAE Sepharose CL-6B column chromatography. For immunoblot analysis, the protein was incubated with the PAbs specific for the purified proteins of *P. salivosa* ATCC 49407 or *P. gingivalis* ATCC 33277 fimbriae. The fimbriae of *P. salivosa* cells and purified protein were examined with a transmission electron microscope. The amino acid sequence of the N-terminal 15 residues of the purified fimbrial protein was determined by an amino acid sequence system. Results: The molecular weight of fimbrillin was 60-kDa as estimated by SDS-PAGE electrophoresis. In immunoblotting analysis, an antibody against *P. gingivalis* fimbrial protein did not react with *P. salivosa* fimbriae. The N-terminal amino acid sequence of the 60-kDa fimbrial protein showed only 3 of 15 residues that were identical to those of the 41-kDa fimbrial protein from *P. gingivalis* ATCC 33277. Conclusion: The 60-kDa fimbrial protein was different in molecular weight and antigenicity from *P. gingivalis* fimbrial proteins.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-77 *Streptococcus pyogenes* に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与

○毛利　泰士[1,2]，住友　倫子[1]，山口　雅也[1]，中田　匡宣[1]，寺尾　　豊[3]，川端　重忠[1]

[1]大阪大　院歯　口腔細菌
[2]大阪大　歯病　障害者歯
[3]新潟大　院医歯　微生物

【目的】*Streptococcus pyogenes* は皮膚の創傷部位から感染し，伝染性膿痂疹を惹起する．我々はこれまでに，*S. pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB が E-カドヘリンやオクルディンを分解し，菌体の上皮バリア突破に関与することを報告した．デスモソーム構成タンパクであるデスモグレイン 1（Dsg1）とデスモグレイン 3（Dsg3）はカドヘリンスーパーファミリーの一種であり，表皮バリア機能の維持に関与する．本研究では，SpeB によるデスモソーム構成タンパクの分解を解析し，*S. pyogenes* の皮膚感染症発症への SpeB の関与について検討した．
【方法】Dsg1 もしくは Dsg3 の細胞外ドメインを含む組換えタンパク（rDsg1，rDsg3）と *S. pyogenes* 培養上清を 37°C で 3 時間反応させた後，組換えタンパクの分解をウエスタンブロット法で解析した．また，劇症型レンサ球菌感染症由来の NIH35 株（M28 型）および皮膚感染症由来の 591 株（M49 型）を親株として *speB* 欠失株を作製し，*speB* 欠失が *S. pyogenes* 培養上清による rDsg1 と rDsg3 の分解に及ぼす影響を検討した．さらに，5 週齢の ICR マウスの皮内に野生株または *speB* 欠失株を接種し，接種後 5 日間，24 時間ごとに皮膚病変サイズを計測した．
【結果と考察】*S. pyogenes* 培養上清による rDsg1 と rDsg3 の分解はシステインプロテアーゼ阻害剤の添加，もしくは speB 欠失により完全に抑制された．これらの結果から，*S. pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB は Dsg1 と Dsg3 の細胞外ドメインを分解することが推察された．マウス皮膚感染モデルにおいて，*speB* 欠失株感染マウスの皮膚病変サイズは野生株感染マウスのそれと比較して有意に減少した．
以上の結果から，SpeB によるデスモソーム構成タンパクの分解は，*S. pyogenes* に起因する皮膚感染症の発症に関与することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Group A streptococcal cysteine protease cleaves desmosomal proteins and contributes to development of skin lesion

○Mori Y[1,2], Sumitomo T[1], Yamaguchi M[1], Nakata M[1], Terao Y[3], Kawabata S[1]

[1]Dept Oral and Mol Microbiol, Grad Sch Dent, Osaka Univ
[2]Div Spec Care Dent, Dent Hosp, Osaka Univ
[3]Niigata Univ, Grad Sch Med Dent Sci, Div Microbiol Infect Dis

[Objective] *Streptococcus pyogenes* is a human pathogen responsible for skin infection. Desmosomal proteins play a central role in maintaining the structure and barrier function of epidermis. We previously reported that proteolytic activity of cysteine protease, SpeB, is related to dysfunction of junctional complexes in an *in vitro* infection model. In this study, we examined whether SpeB cleaves desmosomal proteins and contributes to the development of skin infections *in vivo*.
[Methods] *S. pyogenes* culture supernatants were incubated with recombinant extracellular domains of desmoglein 1 and 3 (rDsg1 and rDsg3), followed by Western blot analysis. Utilizing protease inhibitors and mutagenesis approach, the ability of SpeB to cleave the desmosomal proteins was tested. Mice were intradermally infected with *S. pyogenes* strains, and lesion size was measured daily.
[Results] *S. pyogenes* culture supernatant cleaved Dsg1 and Dsg3. The cleavage was inhibited by cysteine protease inhibitors or mutagenesis of the *speB* gene. In the mouse skin infection model, mice infected with the *speB* mutant strain exhibited significantly reduced lesion size, as compared with those infected with the wild-type strain.
[Discussion] Our findings suggest that SpeB-mediated disruption of desmosomal structure is involved in the development of *S. pyogenes* skin infection.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-78 ジンジパインがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響

○神尾　宜昌[1]，今井　健一[1]，中山　浩次[2]，落合　邦康[1]

[1]日本大　歯　細菌
[2]長崎大　院医歯薬　微生物

A 型インフルエンザウイルス（IAV）は，ウイルス表面のヘマグルチニン（HA）が宿主細胞のレセプターであるシアル酸に結合し細胞に付着する．しかし，膜融合能を獲得するには，HA0 がプロテアーゼにより HA1 と HA2 に開裂しなければ感染が成立しない．このプロテアーゼは主に宿主由来と考えられているが，黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼによっても開裂する．また，口腔ケアはインフルエンザ発症のリスクを低下させる事実から，口腔細菌由来のプロテアーゼが HA を開裂し，IAV 感染に関与している可能性が考えられる．*P. gingivalis* は，アルギニンを切断するジンジパイン（Rgp）とリシンを切断するジンジパイン（Kgp）を産生する．本研究では，*P. gingivalis* およびジンジパイン欠損株を用いて IAV の感染成立にジンジパインが関与するか否か検討を行った．HA の開裂に及ぼす影響を検討した結果，*P. gingivalis* ATCC33277 wild-type および Kgp 欠損株（KDP129）の培養上清（Sup）では開裂したが，Rgp 欠損株（KDP133）および Rgp Kgp 両酵素欠損株（KDP136）の Sup では開裂が認められなかった．IAV が感染性を獲得したか否かを細胞感染実験により検討した結果，wild-type および KDP129 の Sup では多くの感染細胞が認められたが，KDP133 および KDP136 の Sup ではほとんど感染が成立しなかった．以上の結果から，*P. gingivalis* が産生する Rgp が HA を開裂し，IAV は感染性を獲得することが強く示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Proteolytic activation of influenza A virus by *Porphyromonas gingivalis* gingipain

○Kamio N[1]，Imai K[1]，Nakayama K[2]，Ochiai K[1]

[1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Cleavage of influenza A virus（IAV）hemagglutinin（HA）is required for expression of fusion activity and virus entry into cells. Previous studies have shown that HA cleavage is most likely driven by extracellular trypsin-like protease. Coincidentally, *Porphyromonas gingivalis* produces trypsin-like proteases, such as Arg-gingipain（Rgp）and Lys-gingipain（Kgp）. Here, we investigated whether gingipain would be able to activate influenza infectivity by HA proteolytic cleavage. *P. gingivalis* wild-type and mutant culture supernatants were employed throughout the study. We observed that wild-type or mutant lacking *kgp*（KDP129）cleaved HA. In contrast, HA was unaffected by the culture supernatant from either mutants lacking *rgp*（KDP133）or *kgp rgp*（KDP136）. Additionally, we investigated whether gingipain affected the cell-to-cell spread of infection by immunofluorescence. Virus infected cells are observed in the presence of wild-type or KDP129 supernatants, however, this effect was not observed in the supernatant of either KDP133 or KDP136, respectively. These data suggest that Rgp has the ability to cleave HA and thereby contribute to virus spread.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-79 臨床症状に伴う *P. gingivalis* の発育・生理活性に及ぼす影響と遷移誘導性の可能性について

○大屋　学[1,2]，田村　宗明[2,3]，Cueno Marni[2]，落合　邦康[2,3]

[1]日本大　歯
[2]日本大　歯　細菌
[3]日本大　歯　生体防御

【目的】*Porphyromonas gingivalis* は代表的な慢性・侵襲性歯周病の原因菌であり，生理学的性状や病原性について多くの研究報告が成されている．Hemin は *P. gingivalis* の生育にとって必須栄養素であるが，ヒト歯周ポケット内は病態の進行状態によって炎症や歯周組織の破壊状態が異なり，歯肉溝滲出液中の hemin 濃度は常に変化していると考えられる．Hemin 濃度の変化は，*P. gingivalis* の発育や生理活性に影響する可能性がある．今回，我々は，線毛タイプの異なる *P. gingivalis* の発育・生理活性に及ぼす hemin の影響について検討した．【方法】実験には *P. gingivalis* FDC381（線毛 typeI），MPW1b-01（typeIb），TDC60（線毛 typeII），ATCC49417（線毛 typeIII），W83（線毛 typeIV）および HNA99（線毛 typeV）の 6 株を供試した．Menadione 0.5 ppm を含む BHI broth に hemin を種々の濃度で添加し，嫌気培養を行った．培養後，菌液濁度（OD 600 nm）を計測し，集菌・洗浄後の菌体を破砕した後，細胞内の Arg-gingipain 活性，過酸化水素量および SOD 量を計測し，それぞれの菌株の生理活性を評価した．【結果および考察】培養 24 時間後の OD 測定の結果，FDC381，TDC60，ATCC49417 および W83 の 4 株は OD＝1.0 を十分越える発育を示し，4 菌株細胞内 Arg-gingipain 活性は，ATCC49417 株と W83 株は添加 hemin 濃度 2.5 ppm，FDC381 株は 2.5～5 ppm，そして TDC60 株は 25 ppm でピークとなり菌株間に差が認められた．なお，MPW1b-01 株と HNA99 株の OD は著しく低く（＜0.03），今回は実験から除外した．また，過酸化水素量および SOD 量もピークとなる hemin 濃度が菌株により異なっていた．これらの結果から，*P. gingivalis* は線毛のタイプ別で環境 hemin 濃度により発育および生理活性に影響が認められることが確認された．これらの結果から，臨床症状に伴う歯周ポケット内の hemin 濃度の変化から，歯周病進行状態によって優位になる株が常に変化する可能性が考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Possibility of influence and the transition inductivity of hemin on the growth and bioactivity of *P. gingivalis* in clinical manifestations

○Ohya M[1,2]，Tamura M[2,3]，Cueno M[2]，Ochiai K[2,3]

[1]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent
[2]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent
[3]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent

*Porphyromonas gingivalis* has been reported its pathogenicity and characteristics. Hemin is an essential nutrient for *P. gingivalis* to grow. Hemin concentration in the human periodontal pockets has a variation, because it depends on the progression of inflammation and periodontal tissue destruction. In this regard, the variations in hemin concentration may affect *P. gingivalis* growth activities. Here, we investigated the effects of varying hemin concentrations on representative 6 different fimbriae type strains（MPW1b-01, HNA99, ATCC49417, W83, FDC381 and TDC60）. Through this study, we measured Arg-gingipain activities, H2O2 amounts and SOD concentrations. In 24 incubation, 4 strains'（ATCC49417, W83, FDC381, TDC60）OD 600 nm became over 1.0. The others two strains were very far from 1.0, and we omitted in this study. After measuring of each experiment, the results were not same pattern, and it is identified that real optimal hemin concentrations for 4 strains' growth is vary. Thus, it may be thought about by a change of the hemin concentrations in gingival pocket there being a change to the strain becoming dominant.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-80 *Tannerella forsythia* の有する OmpA 様蛋白質の宿主細胞付着への関与

○堀江　俊[1,2]，猪俣　恵[1]，出水川雅司[1]，長谷川義明[3]，稲葉　裕明[1]，引頭　毅[1]，
北井　則行[2]，村上　幸孝[1]

[1]朝日大　歯　微生物
[2]朝日大　歯　歯科矯正
[3]愛院大　歯　口腔微生物

歯周病原細菌 *Tannerella forsythia*（*Tf*）の外膜蛋白質である OmpA 様蛋白質は，外膜の安定性に寄与することが報告されているが，宿主に対する病原性については十分に調べられていない．本研究では，OmpA 様蛋白質の宿主細胞レクチンへの結合性および *Tf* 菌体の宿主細胞付着への関与を調べた．OmpA 様蛋白質は *Tf* ATCC 43037 株の全菌体抽出液よりコムギ胚芽レクチンアフィニティーカラムにて精製した．ELISA により OmpA 様蛋白質の宿主細胞レクチンへの結合性を調べたところ，E-セレクチン，P-セレクチン，L-セレクチン，Siglec-5，Siglec-9，Siglec-10，DC-SIGN，および CLEC9a に強く結合することを見出した．OmpA 様蛋白質のこれらのレクチンへの結合は，N-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）によって抑制された．DC-SIGN への結合に関しては，N-アセチルグルコサミンおよびマンノースによっても抑制された．また，OmpA 様蛋白質の Siglec を除くこれらのレクチンへの結合は，カルシウムイオンキレーター EGTA によって抑制された．*Tf* 菌体の宿主細胞への付着能を培養法で調べた結果，*Tf* は OmpA 様蛋白質依存的に宿主細胞に付着し，Neu5Ac によって有意に抑制された．以上より，OmpA 様蛋白質は，糖鎖を介して宿主細胞レクチンに結合していることが考えられた．また，使用した細胞で発現しているレクチンと OmpA 様蛋白質の結合が，*Tf* 菌体の細胞への付着に寄与すると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## OmpA-like protein derived from *Tannerella forsythia* mediates adherence to host cells

○Horie T[1,2]，Inomata M[1]，Izumigawa M[1]，Hasegawa Y[3]，Inaba H[1]，Into T[1]，Kitai N[2]，
Murakami Y[1]

[1]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Orthod, Asahi Univ Sch Dent
[3]Dept Oral Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

*Tannerella forsythia*（*Tf*）possesses OmpA-like protein as a major outer membrane protein. It is reported that OmpA-like protein contributes to maintenance of outer membrane integrity. However, effects of OmpA-like protein on host cells have not been elucidated. In this study, we examined binding of OmpA-like protein to host cell lectins and adherence of *Tf* to host cells. OmpA-like protein was isolated by wheat germ agglutinin lectin. ELISA revealed that OmpA-like protein interacted with E-selectin, P-selectin, L-selectin, Siglec-5, Siglec-9, Siglec-10, DC-SIGN and CLEC9a. Binding to these lectins was inhibited by N-acetyl neuraminic acid（Neu5Ac）. Interaction with DC-SIGN was also suppressed by N-acetylglucosamine and mannose. Binding to these lectins except Siglecs was inhibited by calcium chelator EGTA. In addition, adherence of *Tf* to host cell was suppressed by Neu5Ac. These results suggest that interaction of OmpA-like protein with host cell lectins contributes to adherence of *Tf* to host cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-81 *Tannerella forsythia* のジペプチジルペプチダーゼ 4 の性状解析

○中里茉那美[1]，下山　佑[2]，根本　優子[3]，根本　孝幸[3]，高橋　晋平[1]，石河　太知[2]，
佐々木　実[2]，八重柏　隆[1]，木村　重信[2]

[1]岩医大　歯　歯周
[2]岩医大　歯　分子微生
[3]長崎大　院医歯薬　口腔生化

*Tannerella forsythia* はグラム陰性偏性嫌気性桿菌で，ヒトの慢性歯周炎の原因菌である‘red complex species’の一員である．*T. forsythia* は，*Porphyromonas gingivalis* と同様糖発酵能を欠くことから，ジペプチジルペプチダーゼ(DPP)を含むタンパク分解酵素がその生育に重要であると考えられる．本研究では，*T. forsythia* の $Pro^2$-$Xaa^3$特異的水解酵素である DPP4 の性状を *P. gingivalis* DPP4 と比較検討した．その結果，*T. forsythia* 菌体は Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide（MCA）を加水分解したことから，*T. forsythia* は菌体結合型の DPP4 を有することが明らかとなった．*T. forsythia* の菌体結合型 DPP4 の至適 pH は 7.5 -8.0 で，塩濃度依存的にその活性が阻害された．次に組換え体（rTfDPP4）を調製し，その性状を rPgDPP4 と比較検討した．その結果，rTfDPP4 は rPgDPP4 に匹敵する強い DPP4 活性を示した．rTfDPP4 の分子量は 83846 Da で，等電点は 6.09 と rPgDPP4 の等電点より 1 ユニット低かった．rTfDPP4 の酵素活性は基質特異性，pH 依存性，塩濃度依存性という点で rPgDPP4 に類似していた．以上の結果から，*T. forsythia* は，*P. gingivalis* 同様，表層に菌体結合型の DPP4 を有しており，本菌の生育に重要な役割を演じている可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of dipeptidyl-peptidase 4 from *Tannerella forsythia*

○Nakasato M[1]，Shimoyama Y[2]，Ohara-Nemoto Y[3]，Nemoto TK[3]，Takahashi S[1]，Ishikawa T[2]，
Sasaki M[2]，Yaegashi T[1]，Kimura S[2]

[1]Div Periodont, Iwate Med Univ Sch Dent
[2]Div Mol Microbiol, Iwate Med Univ
[3]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

*Tannerella forsythia* is a Gram-negative anaerobic rod, and is a member of 'red complex species' the major causative organisms of chronic periodontitis in human. Since *T. forsythia* as well as *Porphyromonas gingivalis* is asaccharolytic, the proteolytic enzyme(s) including dipeptidyl-peptidases（DPPs）could be crucial for the growth. In this study, we characterized the $Pro^2$-$Xaa^3$ specific DPP, DPP4, from *T. forsythia*（TfDPP4）and compared it with *P. gingivalis* DPP4（PgDPP4）. The cell-associated TfDPP4 hydrolyzed Gly-Pro-4-methylcoumaryl-7-amide（MCA）as PgDPP4 does, and the optimal pH was at 7.5-8.0. The cell-associated TfDPP4 activity was decreased in the presence of NaCl in a concentration-dependent manner. The recombinant TfDPP4（rTfDPP4）was expressed in *Escherichia coli*, and the enzymatic properties were compared to rPgDPP4. The rTfDPP4 preferentially hydrolyzed Gly-Pro-MCA and the DPP4 activity was comparable to that of rPgDPP4. The rTfDPP4 has molecular masses of 83846 Da and an isoelectric point of 6.09 that was lower than that of rPgDPP4 by 1 unit, and showed the substrate specificity, and pH- and salt-dependences similar to rPgDPP4. In consequence, *T. forsythia* possesses functional DPP4 associated with its cell surface as *P. gingivalis* does, which could be one of the crucial tools for the growth of this organism.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-82 *Streptococcus sanguinis* による IL-1α 産生誘導活性

○佐伯　　歩[1]，長谷部　晃[1]，中澤　　太[2]，柴田健一郎[1]

[1]北大　院歯　口腔分子微生
[2]北医療大　歯　微生

*Streptococcus sanguinis*（Ss）は，感染性心内膜炎の代表的起因菌として注目されており，その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている．IL-1 は IL-1α と IL-1β からなり，昨年の本学術大会で，Ss がマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1β の産生を誘導することを報告した．そこで，今回は，Ss の IL-1α 産生誘導活性について検証した．

C57BL/6（B6）マウスならびに caspase-1，ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ（BMM）を大腸菌 LPS で 4 時間プライミングした後，*S. sanguinis* ATCC 10556 で 12 時間刺激した．上清中に放出された IL-1α 量は ELISA 法で測定した．

Ss は B6 由来の BMM に IL-1α の産生を誘導し，caspase-1，NLRP3 ならびに ASC をノックアウトすることにより減弱した．しかしながら，本活性は caspase-1 阻害剤である z-YVAD-FMK では阻害されなかった．

Ss は BMM に対して IL-1α 産生を誘導する活性を有し，その活性発現には NLRP3 インフラマソームは関与するが，caspase-1 のタンパク質分解活性は関与しないことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## IL-1alpha inducing activity of *Streptococcus sanguinis*

○Saeki A[1]，Hasebe A[1]，Nakazawa F[2]，Shibata K[1]

[1]Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

*Streptococcus sanguinis*（Ss），a human oral inhabitant, is one of the most potent agents of infective endocarditis（IE）. Recently, the proinflammatory cytokine IL-1 consisting of IL-1alpha and IL-1beta has been shown to contribute to the onset of IE. Last year, we showed that Ss activates the NLRP3 inflammasome to produce IL-1beta in murine dendritic cells and macrophages. Therefore, this study was designed to examine whether Ss has the activity to induce IL-1alpha production by these cells. Bone marrow-derived macrophages（BMMs）from C57BL/6（B6）, NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient mice were used. These cells were stimulated for 4 h with *E. coli* LPS and then for 12 h with *S. sanguinis*（Ss）ATCC 10556 in the presence of penicillin and streptomycin. IL-1alpha secreted was measured by ELISA. Ss cells had the activity to induce secretion of IL-1alpha by BMMs from B6 in a dose-dependent manner, but the activity toward NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient BMMs were significantly attenuated. The activity was not attenuated by the caspase 1 inhibitor z-YVAD-fmk. Thus, this study suggests that the IL-1alpha-inducing activity of Ss was mediated by the NLRP3 inflammasome activation, but not by the proteolytic activity of caspase-1.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-83 ミティスレンサ球菌が産生する過酸化水素水によるマクロファージ活性化制御

○松島　瞳[1,2]，片岡　嗣雄[2]，岡橋　暢夫[3]，井上美津子[1]，桑田　啓貴[2]

[1]昭和大　歯　小児成育歯科
[2]昭和大　歯　口腔微生物
[3]大阪大　院歯　フロンティア

【目的】口腔常在細菌であるミティスレンサ球菌群は口腔常在細菌叢を形成する主要な菌群であり，過酸化水素を産生することで知られている．本研究では，ミティスレンサ球菌群が産生する過酸化水素が口腔内細菌叢の形成に果たす役割を解明する目的でマクロファージの活性化に与える影響について検討した．【方法】過酸化水素水を用い，マクロファージ細胞株(RAW264.7)を用いて炎症性サイトカイン，特に TNF-$\alpha$ および IL-6 の産生誘導に対する影響を検討した．具体的には，マクロファージを TLR リガンドで活性し，過酸化水素による処理の有無による遺伝子の発現量の変化をリアルタイム PCR にて解析した．さらにサイトカイン産生誘導以外のマクロファージの代表的な貪食能の変化についても蛍光標識デキストランを用いて検討した．【結果】過酸化水素を加えたマクロファージでは炎症性サイトカイン生産の抑制が認められた．また，過酸化水素で前処置したマクロファージではデキストラン取り込み能も抑制されていた．ファロイジンを用いた細胞骨格の染色の実験では，細胞骨格の構造に異常が認められた．【考察】過酸化水素は自然免疫細胞であるマクロファージの免疫応答を低下させた．また，菌体排除に直接的に重要である貪食能についても機能障害が誘導されたことから，自然免疫系に対し抑制能を示すことが示唆された．今後はマクロファージの機能抑制の分子機序についてより詳細に検討することとする．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Streptococcal hydrogen peroxide controls the inflammatory response and macrophage activation

○Matsushima H[1,2], Kataoka H[2], Okahashi N[3], Inoue M[1], Kuwata H[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Showa Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Micro, Showa Univ Grad Sch Dent
[3]Center Oral Frontier Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent

The mitis group of streptococci, which include *Streptococcus oralis* and *Streptococcus pneumoniae* is an inhabitant of the oral commensal flora. Although the production of hydrogen peroxide from this spice is known to be a virulence factor, the pathological meaning in oral colonization is not well understood. We investigated the influence of hydrogen peroxide on the activation of innate immunity using murine macrophage cell line, RAW264.7. Hydrogen peroxide has been reported potential activator for innate immune cells because the addition of hydrogen peroxide to macrophage induces the production of inflammatory cytokines. On the other hand, some of the activators is known to act as negative regulators. Therefore, we investigated the possibilities that the effect with oral streptococcal hydrogen production may cause the subsidiary regulatory effects on the inflammatory activities in innate immune system. As results, hydrogen peroxide suppressed the gene expression of TNF-alpha and IL-6 with LPS induction after the pretreatment with hydrogen peroxide. At the same time the uptake of FITC-dextran was also suppressed with time dependent manner after the pretreatment. Therefore, we speculate that hydrogen peroxide is the regulatory substance that causes the hypo-responsiveness of oral immune cells and keep the favorable condition on streptococcal mucosal colonization.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-84 *Streptococcus pyogenes* CAMP factor の RAW264.7 細胞に対する空胞形成メカニズムの検討

○黒澤　美絵[1,2]，小田　真隆[1]，土門　久哲[1]，齊藤　一誠[2]，早崎　治明[2]，寺尾　豊[1]

[1]新潟大　院医歯　微生物
[2]新潟大　院医歯　小児歯

【目的】*Streptococcus pyogenes* は，宿主免疫細胞の機能を低下させる分子群を産生し，同菌の組織内への侵入および組織内増殖を惹起することで感染拡大させる．*S. pyogenes* の CAMP factor は，*Staphylococcus aureus* の $\beta$-hemolysin による溶血作用の増強因子として報告されたが，免疫細胞に対する作用については報告がなかった．我々はこれまで，CAMP factor がマクロファージ系細胞に対し，空胞形成を惹起することを報告している．本研究では，CAMP factor のマクロファージに対する空胞形成メカニズムについて検討した．

【方法と結果】マウス腹腔マクロファージ系 RAW264.7 細胞に組換え CAMP factor（5 $\mu$g/mL）を 24 時間作用させ，空胞形成させた後，PI 染色法，LDH 定量試験，および MTT 法にて細胞毒性を解析した．その結果，CAMP factor は RAW 細胞に対し，細胞死を誘導することなく細胞増殖を抑制することが判明した．さらに，EDTA 処理した RAW 細胞に CAMP factor を作用させたところ，空胞形成が阻害された．そこで，数種類のカルシウムチャネル阻害剤を用いて，CAMP factor 処理 RAW 細胞の空胞形成に対する効果について調べた．その結果，Nifedipine，および Verapamil で処理した RAW 細胞において，CAMP factor による空胞形成が阻害された．

【考察】CAMP factor は RAW 細胞に対し，細胞死を誘導することなく細胞増殖を抑制することが判明した．また，CAMP factor による RAW 細胞の空胞形成は，Nifedipine，および Verapamil で阻害されたことから，L 型カルシウムイオンチャネルを介した細胞内へのカルシウムの流入が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The relationship between vacuolation induced by CAMP factor of *Streptococcus pyogenes* and uptake of calcium ion in RAW264.7 cells

○Kurosawa M[1,2], Oda M[1], Domon H[1], Saitoh I[2], Hayasaki H[2], Terao Y[1]

[1]Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Pediatric Dent, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

**Purpose**: *Streptococcus pyogenes* produces molecules that inhibit the function of human immune system, thus allowing the pathogen to grow and spread in tissues. It is known that *S. pyogenes* CAMP factor enhances hemolysis induced by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. However, the effect of CAMP factor for immune cells remains unclear. We reported that CAMP factor induced vacuolation to macrophage. In this study, we investigated the mechanism of vacuolation induced by CAMP factor in macrophages.

**Methods and Results**: RAW 264.7 cells (mouse monocyte-macrophages) were incubated with recombinant CAMP factor for 24 hours. The vacuolated cells were analyzed by propidium iodide staining assay, lactate dehydrogenase assay, and MTT assay. CAMP factor inhibited cell growth without inducing cell death. In addition, EDTA inhibited vacuolation induced by CAMP factor in RAW cells. Nifedipine and Verapamil, which are calcium ion channel blocker, reduced the vacuoles by CAMP factor.

**Conclusion**: CAMP factor suppressed cell proliferation without inducing cell death in RAW cells. And then, Nifedipine and Verapamil inhibited the formation of vacuoles by CAMP factor. These results suggest that the vacuolation related to the uptake of calcium ion via L-type calcium ion channel of RAW cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-85 *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading に関与する因子について

○今村　圭吾[1]，近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，成田　由香[3]，藤原　　卓[1]，中山　浩次[2]

[1]長崎大　院医歯薬　小児歯
[2]長崎大　院医歯薬　微生物
[3]福歯大　感染生物

Bacteroidetes フィラムに属する *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原細菌は 9 型分泌機構（T9SS）を介し，様々な病原タンパク質を分泌している．本研究の対象であるグラム陰性細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は土壌中や水中に生息する細菌であるが，Bacteroidetes フィラムに属し，T9SS を構成する遺伝子群を保有している．本菌の T9SS はキチナーゼなど本菌を特徴づける菌体表層タンパク質の輸送に関与するとともに，本菌の滑走運動とも密接な関係がある．*F. johnsoniae* は colony spreading（CS）を起こす．この現象はこの菌の持つ滑走運動能と関係しており，その関連遺伝子の欠損変異株では起きない．我々は，1%寒天濃度の栄養飢餓培地上では，富栄養培地に比較して著明な CS が起き，グルコースを添加すると，グルコース濃度依存的に CS が抑制されることを報告した．CS には滑走運動能が関係し，環境因子が影響を与えていると考えられるが，どのような機構で CS が起こるのかについての詳細な研究はない．供使菌株として *F. johnsoniae* ATCC 17061（UW101）を用いた．栄養飢餓培地として PY2 および同培地にグルコースを添加した PYG の寒天濃度を 0.3%に変更した培地（mPY2，mPYG）を用いて，CS について検討した．我々が以前報告した 1%寒天培地とは異なり，mPYG で樹枝状の CS がみられた．これは，ある遺伝子領域（X 遺伝子群）の欠損株では野生株に比して CS が著しく亢進した．さらに，各菌株の発現タンパク質を比較したところ，複数のタンパク質の発現に相違があり，そのなかに我々が以前報告したコロニー拡張因子（colony spreading factor, CSF）があった．このことから，0.3%寒天 PYG 培地での CS にも CSF が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Investigation of colony spreading related factors in *Flavobacterium johnsoniae*

○Imamura K[1]，Kondo Y[1]，Sato K[2]，Narita Y[3]，Fujiwara T[1]，Nakayama K[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[3]Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontopathic bacteria belonging to Bacteroidetes phylum secrete various virulence proteins by the type IX secretion system（T9SS）. *Flavobacterium johnsoniae*, which is a gram-negative bacterium living in the soil or freshwater, possesses a gene cluster of T9SS involving in transportation of some proteins and a gliding system. *F. johnsoniae* cells exhibit Colony Spreading （CS）. *F. johnsoniae* CS was found to take place under a starvation condition and was inhibited by addition of glucose to the starved media. *F. johnsoniae* mutants defective in gliding motility showed no CS. Therefore, CS seems to be related with gliding motility and environmental factors may influence on CS. In this study, *F. johnsoniae* ATCC 17061 was incubated on the modified PY2（mPY2）medium solidified with 0.3% agar or mPY2（0.3% agar）supplemented with glucose（mPYG）. *F. johnsoniae* spread on mPYG in a dendritic shape. This dendritic CS was strongly enhanced in the deletion mutant of X gene cluster. SDS-PAGE with these strains revealed that the expression of several proteins including the colony spreading factor（CSF）previously found was different among the strains, indicating that the CSF was related to the dendritic CS.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-86 BCG thyX 欠損株の作製とその性状解析

○有村　友紀[1]，中山　真彰[2]，妹尾　昌紀[1]，田川　淳平[3]，中山　浩次[4]，飯田　征二[1]，大原　直也[2,5]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科，[2]岡山大　院医歯薬　口腔微生物，[3]岡大病院　矯正，[4]長崎大　院医歯薬　微生物，[5]岡山大　歯先端研センター

【緒言】結核症の 0.05～5％は口腔領域に症状を呈する．パラアミノサリチル酸（para-aminosalicylic acid，PAS）は二次結核薬の一つであり，多剤耐性結核菌に有用な場合がある．PAS は葉酸の前駆体であるパラアミノ安息香酸（para-aminobenzoate，PABA）と構造が類似しており，葉酸代謝系によって代謝されることで作用すると考えられている．結核菌 PAS 耐性株の 37％はチミジル酸合成酵素 ThyA の遺伝子に変異を有する．結核菌のチミジル酸合成酵素には ThyA のほかに ThyX が存在するため，ThyX が PAS 耐性に関与することを考え，ワクチン株 Mycobacterium bovis BCG の thyX 欠損株を作製し，その性状を解析した．【方法】1．BCG Tokyo 株を親株とし，thyA（JTY_2775）あるいは thyX（JTY_2764）を欠損させた株を作製した．また，thyA あるいは thyX 発現プラスミドを構築し，これらを保持した thyA あるいは thyX 過剰発現株を作製した．2．Tokyo 株，thyA 欠損株，thyX 欠損株，thyA 過剰発現株，thyX 過剰発現株を MycoBroth を用いて 37℃で培養し，OD590 における菌の濁度を経時的に測定した．3．これら 5 株を PAS 10，50，200 μg/mL 添加 7H10-ADC 寒天培地に播種し，37℃で培養した．4．さらに 7H9-ADC-Tween80 液体培地と 7H10-ADC 寒天培地上で 24 時間培養した菌体から RNA を抽出し，cDNA を作製した．リアルタイム qPCR を行い，thyA および thyX 発現量を定量した．【結果・考察】thyX 欠損株は最小培地で増殖し，その増殖速度は親株との間で有意差を認めなかったことから，BCG において thyX は必須でないことが示された．thyA 欠損株と異なり，thyX 欠損株は PAS に感受性のままで，一方 thyX 過剰発現株は PAS 耐性を示した．また，リアルタイム qPCR の結果，液体培地，寒天培地のいずれの場合も PAS 耐性である thyA 欠損株において，親株と比較して thyX の発現量が増加していた．以上のことより，PAS 耐性の獲得には thyX の発現量が大きく関わっていることが示唆された．**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Construction and characterization of a BCG thyX deletion strain

○Arimura Y[1]，Nakayama M[2]，Senoo M[1]，Tagawa J[3]，Nakayama K[4]，Iida S[1]，Ohara N[2,5]

[1]Dept Oral Maxillofacial Reconstruct Surg, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci，[2]Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pham Sci，[3]Orthodont, Okayama Univ Hosp，[4]Div Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci，[5]ARCOCS Okayama Univ Dent Sch

INTRODUCTION:Oral tuberculosis lesions are found in 0.05 to 5 ％ of all tuberculosis cases. The para-aminosalicylic acid（PAS）is one of the second-line antitubercular drugs and may be used to treat multidrug-resistant tuberculosis. Thirty-seven ％ of PAS resistant strains of Mycobacterium tuberculosis possessed mutation in the thymidylate synthase ThyA. Mycobacteria possess alternative thymidylate synthase ThyX in addition to ThyA. We hypothesized that mutations in ThyX also contribute to PAS resistance in mycobacteria. METHOD:1. The vaccine strain BCG Tokyo was used. The thyA- and thyX-deletion mutants（delta-thyA and delta-thyX）and the thyA and thyX overexpressed strains（pthyA and pthyX）were constructed. 2. The growth of these strains were monitored. 3. These strains were disseminated to 7H10-ADC agar plates containing PAS. 4. RNA from these strains were subjected to qRT-PCR for thyA and thyX. RESULT AND DISCUSSION:delta-thyX multiplied in minimum medium, suggesting the thyX is not essential in BCG. Unlike to delta-thyA, pthyX, but not delta-thyX, was PAS resistant. The expression level of thyX increased in PAS resistant strains delta-thyA and pthyX. These results suggested the expression level of thyX greatly affected PAS resistant acquisition.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-87 BCG における cyclic-di-GMP 菌体内合成の影響

○妹尾　昌紀[1]，中山　真彰[2]，有村　友紀[1]，飯田　征二[1,3]，大原　直也[2,3]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科
[2]岡山大　院医歯薬　口腔微生物
[3]岡山大　院医歯薬　歯先端研センター

【背景および目的】cyclic-di-GMP(c-diGMP)は細菌のセカンドメッセンジャーの一種で，バイオフィルム形成，運動性，細胞分裂，病原因子の発現等，細菌の細胞機能に重要な役割を担っている．また，STING を介してヒトやマウスの自然免疫を活性化する．我々は結核菌における c-diGMP の役割を明らかにすることを目的とし，特に菌体内での c-diGMP に注目し，その影響について検討した．【方法】ワクチン株 BCG から c-diGMP の合成あるいは分解に関与する GGDEF あるいは EAL ドメインをコードする遺伝子断片をクローニングした．これらの遺伝子断片をアセトアミドによって誘導される遺伝子発現制御系に繋げることにより，誘導型 c-diGMP 発現プラスミドを構築した．さらにこのプラスミドを BCG に導入し，誘導型 c-diGMP 発現株を作製した．また，自身のプロモーターを持つ GGDEF あるいは EAL ドメイン発現プラスミドを構築し，BCG に導入した．これらの株について集落形成速度と増殖速度を調べた．【結果】GGDEF＋EAL ドメインあるいは GGDEF ドメイン発現プラスミドを BCG に導入したところ集落の形成は確認できなかった．一方，誘導型 c-diGMP 発現プラスミドを導入したところ，アセトアミド非添加では集落は形成され，その速度は親株との間で大きな差はなかった．しかし，アセトアミドの添加により増殖は顕著に抑制された．【考察】増殖期の BCG に c-diGMP を添加しても増殖に影響は認められない．今回の実験で，恒常的に c-diGMP を産生する株の作製を試みたが，集落を得ることができなかったこと，また誘導型の株において c-diGMP 代謝酵素の遺伝子発現誘導を行うことにより，それらの増殖が顕著に抑制されたことから，菌体外ではなく，菌体内の c-diGMP が結核菌・BCG の増殖の制御に関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The influence of cyclic-di-GMP produced in BCG

○Senoo M[1]，Nakayama M[2]，Arimura Y[1]，Iida S[1,3]，Ohara N[2,3]

[1]Dept Oral Maxillofacial Reconst Surg, Okayama Univ Grad Med Dent Pharm Sci
[2]Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[3]ARCOCS Okayama Univ Dent Sch

INTRODUCTION: Cyclic-di-GMP (c-diGMP) is one of the bacterial second messengers. It controls biofilm formation, motility, cell division, and expression of etiologic factors of bacterial cells, and activates the host immunity through STING. To reveal a role of c-diGMP in Mycobacterium tuberculosis complex, we investigated the effect of endogenous c-diGMP on the growth of vaccine strain BCG. METHOD:The gene fragments encoding the GGDEF domain which stimulates c-diGMP production, or the GGDEF plus EAL domains which degrades c-diGMP were cloned from the BCG genome. The acetamide-inducible expression plasmids containing these fragments were constructed and introduced into BCG Tokyo. The growth of GGDEF over-expressed BCG1354T and GGDEF plus EAL over-expressed BCG1354F were evaluated in the presence or absence of acetamide. RESULT AND DISCUSSION: Introduction of plasmidscontaining GGDEF plus EAL or GGDEF with their own promoter into BCG cells resulted in the absence of any colony on the 7H10-ADC agar plates. However, the transformants, BCG1354T and BCG1354F, were obtained when the acetamide-inducible expression plasmid were employed, although their growth were slower than that of the parent strain. The growth of these transformants in the 7H9-ADC Tween80 medium was inhibited by the addition of acetamide. Taken together, endogenous c-diGMP regulates the growth of BCG.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-88 ハニカムβ-TCPを用いた象牙芽細胞様細胞の誘導

○吉田　沙織[1]，辻極　秀次[2]，高畠　清文[1]，河合　穂高[1]，中野　敬介[1]，玉村　亮[3]，川上　敏行[4]，長塚　仁[1]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔病理，[2]岡山理大　理　組織病態，[3]日本大　歯　解剖Ⅱ，[4]松本歯大　硬組織疾患解析

【目的】歯牙および歯周組織は自身による再生，治癒機能に乏しく，細胞工学的手法を用いた歯科再生医療の実用化が期待されている．当研究室では現在までに固有歯髄組織に含まれる細胞からの象牙芽細胞の樹立を試みており，in vitro 条件下で，象牙芽細胞の性格を示す細胞（TGC）の樹立に成功している．一方，in vivo 条件下において TGC は塊状の象牙質様硬組織を形成するものの，極性を有する象牙芽細胞の誘導には至っていない．そこで本研究では極性を有する象牙芽細胞の誘導を目的として，ハニカムβ-TCP を Scaffold として使用した場合の TGC との反応性について検討を行った.【材料と方法】TGC はβ-GP を含む石灰化培地または TGF-βにより誘導を行った後，マトリゲルと供にハニカムβ-TCP 孔内に充填し埋入体を作製した．埋入体は，SCID マウス頸骨に直径約 1 ミリの骨欠損を形成，欠損部に接触するように移植した．移植後 2 週および 4 週後に摘出し，常法にてパラフィン標本を作製，H.E 染色を施し組織学的に観察を行った.【結果と考察】TGC を TGF-βで誘導した試料においては，TGC はハニカムβ-TCP 上で塊状の組織を形成した．塊状組織の周囲で極性を有する細胞を認めたが，大部分は不規則な細胞配列を示すものであった．TGC を石灰化培地にて誘導した試料においては，TGC はハニカムβ-TCP 上に接してほぼ一層の高円柱状の細胞層をなし，核を TCP の遠位側に配する極性を示していた．TGF-βで誘導した試料，石灰化培地にて誘導を行った試料ともに歯根膜等の歯周組織の明らかな形成を認めなかった．以上の結果から，骨組織環境中において，石灰化培地で誘導を行った TGC はハニカムβ-TCP を Scaffold に使用することにより，高度な極性を有する象牙芽細胞様細胞へ誘導できることが示された.**【利益相反】**利益相反状態にはありません.

## Induction of odontoblast like cells by using honeycomb β-TCP

○Yoshida S[1]，Tsujigiwa H[2]，Takabatake K[1]，Kawai H[1]，Nakano K[1]，Tamamura R[3]，Kawakami T[4]，Nagatsuka H[1]

[1]Dept Oral Pathol and Med, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci，[2]Lab Histopathol, Dept Life Sci, Fac Sci, Okayama Univ Sci，[3]Dept Histol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo，[4]Hard Tissue Pathol Unit, Matsumoto Dent Univ, Inst for Oral Sci

（Objectives）Previously, we established tooth matrix-forming GFP rat-derived cell（TGC）from the dental pulp. TGCs have exhibited odontoblastic feature in vitro. In this study, we examined a method of inducing the differentiation of TGC to odontoblastic cell having the polarity by using honeycomb β-TCP scaffold.（Methods）To determine the differentiation potential in vivo, TGCs have been transplanted into SCID mice. Before implantation, TGCs were filled in the hole of honeycomb β-TCP after treatment with osteogenic medium or TBF-β. TGC, TCP scaffold complex were inplanted into the tibia of SCID-mice. The transplanted materials were removed after 2 and 4 weeks after implantaion. Then paraffin sections were prepared and histopathological evaluation were performed.（Results）Transplantation of TGC treated with TGF-β resulted in the formation of the nodular structure on the surface of TCP. Most of the nodular tissue showed random arrangement of odontoblast like cells. Transplantation of TGC treated with osteogenic medium resulted in the formation of the odontoblastic cell layer surrounding the surface of TCP. These odontoblastic cells showed cell polarity. In conclusion, TCP scaffold and osteogenic medium pretreatment induced effective odontoblastic differentiation of TGC, and the induced cells have prominent morphological odontblastic feature. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-89　LPS 長期刺激による細胞外マトリックス関連遺伝子の DNA メチル化解析

○高井　理衣[1]，植原　　治[2]，原田　文也[1]，宇津宮雅史[1]，中條　貴俊[1]，吉田　光希[1]，
佐藤　　惇[1]，西村　学子[1]，千葉　逸朗[2]，安彦　善裕[1]

[1]北医療大　歯　臨床口腔病理
[2]北医療大　歯　保健衛生

【目的】エピジェネティクスは，DNA 塩基配列の変異を伴わず遺伝子発現を変化させるものであり，中でも DNA メチル化は，主要な因子の 1 つである．近年，エピジェネティクスは歯周炎の発症・進行への関与を示唆する報告があるものの，詳細は不明である．本研究では，歯周病原菌である *P. gingivalis* 由来の LPS で長期刺激されたヒト歯根膜線維芽細胞（HPDLs）における細胞外マトリックス（ECM）関連遺伝子の DNA メチル化解析を行った．
【方法】HPDLs を LPS 1 μg/ml で刺激しながら 1ヶ月間培養した．コントロールには LPS の代わりに滅菌水を用いた．その後 DNA, RNA を抽出し，DNA は Human CpG islands Microarray（Agilent technology）にて解析した．アレイ解析結果から ECM 関連遺伝子のプロモーター領域に位置し，なおかつメチル化レベルが 4 倍以上を示すものを選出し，定量的 real-time PCR による mRNA 発現解析を行った．また，DNA メチル化の再現性を確認するため，定量的 Methylation-Specific PCR を行った．さらに，5-Azacytidine 100 μM にて 1 時間処理を行い，mRNA 発現および DNA メチル化レベルの改善効果を検討した．
【結果と考察】LPS 長期刺激および 5Aza 処理を行っても HPDLs の形態等に大きな変化はみられなかった．アレイ解析では ECM 関連遺伝子が 25 個見出され，その内 9 遺伝子で mRNA の発現低下および定量的 Methylation-Specific PCR でメチル化レベルの上昇が確認された．また，5Aza 処理により DNA メチル化および遺伝子発現の低下に改善傾向が認められた．以上の結果から，ECM 関連 9 遺伝子は，LPS 長期刺激による DNA 高メチル化を介した発現低下がみられることが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## DNA methylation of extracellular matrix-related genes stimulated with LPS for prolonged periods

○Takai R[1]，Uehara O[2]，Harada F[1]，Utsunomiya M[1]，Chujo T[1]，Yoshida K[1]，Sato J[1]，
Nishimura M[1]，Chiba I[2]，Abiko Y[1]

[1]Div Oral Med and Pathol Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent
[2]Div Dis Cont Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

Purpose: The involvement of DNA methylation in periodontal disease is not clear. LPS derived from *P. gingivalis* is involved in the progression of periodontal disease. In this study, we examined DNA hypermethylation of ECM-related genes and noted whether hypermethylation affected their transcription levels in HPDLs stimulated with *P. gingivalis* LPS for a prolonged period.
Material & Method: HPDLs were stimulated with LPS 1 μg/ml for 1 month. After LPS stimulation, HPDLs were treated by 5-Azacytidine 100 μM for 1 hour. We extracted DNA and RNA from the HPDLs. The DNA methylations were analyzed by Microarray and Methylation Specific PCR method. The mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR.
Results & Conclusion: No significant morphological changes were observed in the cells stimulated with LPS and treated by 5-Azacysin compared with the controls. We found 9 ECM-related genes that hypermethylated and significantly downregulated mRNA expression. HPDLs were DNA demethylated and increased mRNA expression by 5-Azacysin treatment. These results indicate that LPS may cause hypermethylation of some ECM-related genes followed by downregulated expression of their transcriptional levels.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-90　腺様嚢胞癌におけるキメラ遺伝子発現と腫瘍増殖の関連についての研究

○大野　淳也[1]，岡田　康男[1,2]

[1]日歯新潟　病態組織機構
[2]日歯新潟　病理

【目的】腺様嚢胞癌は，代表的な唾液腺悪性腫瘍の 1 つであり，病理組織学的に，内側の導管上皮様の腺細胞と外側の腫瘍性筋上皮/基底細胞様細胞の 2 種類の細胞で構成され，緩やかな発育をし，神経周囲浸潤や遠隔転移をきたすことが特徴である．キメラ遺伝子は，種々の臓器で報告され，腫瘍の発生，進展に関わるとされているおり，腺様嚢胞癌においては 6 番染色体長腕の領域 22～23 と 9 番染色体短腕の領域 23～24 との間で転座による，MYB-NFIB キメラ遺伝子が報告されている．これまで，MYB-NFIB キメラ遺伝子の発現と予後に関わる報告は散見されるが，腫瘍増殖や血管新生との関連について検討した報告はない．そこで，本研究では，MYB-NFIB キメラ遺伝子の発現解析と腫瘍増殖や血管新生との関連についての検討を行った．
【検体と方法】日本歯科大学新潟生命歯学部病理学講座にファイルされている腺様嚢胞癌症例 26 例について，RT-PCR 法による MYB-NFIB のキメラ遺伝子の発現解析を行った．また，免疫組織化学的に腫瘍増殖能の指標である Ki-67，血管関連マーカーである CD31，CD34，FactorVIII，VEGF の染色を行いキメラ遺伝子の発現解析と比較し検討した．
【結果と結論】MYB-NFIB キメラ遺伝子の発現を 26 例中 14 例に認めた．これらの症例についてキメラ遺伝子の発現有無と免疫組織化学染色結果の比較を行ったところ，MYB-NFIB キメラ遺伝子の発現群では非発現群に比べ，Ki-67（MIB-1）LI は低く，また，血管分布密度も低かった．以上より，MYB-NFIB キメラ遺伝子の非発現群の方が発現群に比べより多くの血管新生を伴い増殖能が高いことが示唆された．本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部倫理委員会の承認を得て行った．（ECNG-H-215）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Study of relation chimeric gene expression to tumor proliferative potential in salivary adenoid cystic carcinoma

○Ono J[1]，Okada Y[1,2]

[1]Histopathol Pathogenic Mech, Nippon Dent Univ Grad Sch Life Dent at Niigata
[2]Dept Pathol, Nippon Dent Univ, Sch Life Dent at Niigata

Purpose: Salivary adenoid cystic carcinoma（ACC）is the common malignant salivary glands tumor. ACC is histopathologically characterized by ductal and modified myoepithelial cells, slow growing, perineural permeation and metastatic. MYB-NFIB chimeric gene has been shown translocation between chromosome 6q22-q23 and chromosome 9p23-p24 in ACC. In this study, we compared MYB-NFIB chimeric gene expression with tumor proliferative potential and angiogenic activity.
Materials & Methods: We examined 26 cases of ACCs stored in Department of Pathology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata. We did reverse transcriptase-PCR（RT-PCR）assay about MYB-NFIB chimeric gene expression. We analyzed immunohistochemical evaluation of Ki-67（MIB-1）Labelling Index, CD31, CD34, FactorVIII, and VEGF proteins. We compared MYB-NFIB chimeric gene expression with their immunohistochemical results.
Results & Conclusion: The MYB-NFIB chimeric gene revealed that 14 of 26 analysed ACCs. We compared MYB-NFIB chimeric gene expression with immunohistochemical results. MYB-NFIB chimeric gene positive ACCs are lower than MYB-NFIB chimeric gene negative ACCs about Ki-67（MIB-1）Labelling Index and vessel distribution density. In conclusion, these data suggest MYB-NFIB gene negative ACCs are higher than MYB-NFIB gene positive ACCs about proliferative potential and angiogenic activity.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-91 軟骨石灰化不全ラットの形態学的ならびに分子生物学的解析―頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨―

○葛島　康平[1]，竹内　　綾[1]，永山　元彦[2]，田中　政巳[3]，渡辺　　実[4]，天野　　均[5]，田沼　順一[2]，北井　則行[1]

[1]朝日大　歯　矯正，[2]朝日大　歯　口腔病理，[3]会津大　短　食物栄養，[4]聖マリアンナ医大院　実験動物飼育管理，[5]大阪歯大　歯　薬理

【目的】聖マリアンナ大学の田中らにより全身の低成長や軟骨内骨化不全を示す SD ラット由来の自然発症型軟骨石灰化不全(CCI)ラットが確立された．今回，生後 2 週齢における CCI ラットの頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨について形態的・分子生物学的に SD ラットと比較した．【方法】CCI ラットと SD ラット各 3 匹をホルマリン還流固定後，頭蓋底と下顎頭の矢状断方向でパラフィン切片を作製し，HE 染色，SOFG 染色，BrdU と Cleaved Caspase-3 の免疫染色，TRAP 染色および Ihh，Gli1，Smo の mRNA 局在（ISH）と相対的定量解析（RT-PCR）を行なった．【結果と考察】SD ラットに対し CCI ラットにおいて，HE 染色と SOFG 染色では，頭蓋底軟骨結合における前後幅の拡大を，下顎頭軟骨における上下幅の拡大および両軟骨における軟骨細胞の配列不整を認めた．BrdU 免疫染色では，両軟骨における軟骨細胞の増殖亢進を認めた．アポトーシス活性をみる Cleaved Caspase-3 免疫染色では，頭蓋底軟骨結合において，陽性細胞数が減少していた．しかし，下顎頭軟骨では，両ラットともに陽性細胞を認めなかった．一方，TRAP 染色陽性の破骨細胞数は，両軟骨の石灰化層において両ラット間に発現差を認めなかった．Indian hedgehog-PthrP シグナルに関わる Ihh，Gli1，Smo の mRNA 発現は，CCI ラットの両軟骨において過剰発現していた．以上の結果から，頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨の軟骨内骨化の時期が異なること，両軟骨成長板における石灰化軟骨の破骨細胞性吸収は両ラット間で差を認めないこと，一方，SD ラットと比較し CCI ラットでは，両軟骨ともに Ihh，Gli1，Smo mRNA の過剰発現で軟骨細胞の過剰増殖が起こっていることが明らかとなった．【結論】CCI ラットは軟骨内骨化の遅延で頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨の成熟に遅れを示す．これらには，軟骨細胞のアポトーシス抑制と Indian hedgehog-PthrP シグナルの発現異常が関係していると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Morphological and molecular biological abnormality of cranial base synchondrosis and temporomandibular joint condyle in cartilage calcification insufficient rat

○Kuzushima K[1]，Takeuchi A[1]，Nagayama M[2]，Tanaka M[3]，Watanabe M[4]，Amano H[5]，Tanuma J[2]，Kitai N[1]

[1]Dept Ortho, Asahi Univ Sch Dent，[2]Dept Oral Pathol, Asahi Univ Sch Dent，[3]Dept Food Nutrition, Jr Coll Div, The Univ Aizu，[4]Inst Animal Experimentation, St Marianna Univ Grad Sch Med，[5]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ

Objective: A cartilage calcification insufficient（CCI）rat derived from Sprague-Dawley（SD）rat, shows spontaneous skeletal dwarfism associated with delay of endochondral ossification. We tried to study CCI rat at the cranial base synchondrosis and condylar cartilage in comparison to SD rat. Materials and Methods: After two weeks of birth, rats（n = 3, each phenotype）were sacrificed and fixed heads in 10% buffered formalin. Samples were analyzed by histological procedures including HE, SOFG, TRAP staining, cleaved caspase-3 immunohistochemical study and BrdU incorporation, real time PCR and in situ hybridization for Ihh, Gli1 and Smo mRNA. Results and discussion: CCI rats showed abnormal cartilage in both cranial base synchondrosis and mandibular condyle. In the parasaggital sections of specimen, CCI rats showed wider and disorganized arrangement of the growth plate and articular cartilage with increasing all differentiated layers. At the cranial base synchondrosis of CCI rats, the number of BrdU incorporated cells was significantly reduced but cleaved caspase-3 positive cells was significantly increased against for SD rats. These findings are supported by over expression of Ihh, Gli1 and Smo mRNA. Conclusion: Together, the data demonstrate that CCI rats affect their endochondral ossification due to excessive Ihh signaling and reduce their apoptosis. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-92 口腔扁平苔癬（OLP）におけるヒトパピローマウイルス 16 型（HPV-16）感染と HPV-16 感染 OLP の上皮の細胞増殖能について

○加藤　世太[1,2]，磯村まどか[1]，佐藤　伸明[1]，河合　遼子[1]，本田　由馬[1]，神野　正人[1]，
吉田　和加[1,2]，杉田　好彦[1,2]，久保　勝俊[1,2]，前田　初彦[1,2]

[1]愛院大　歯　口腔病理
[2]愛院大　歯　未来口腔医療研究セ

【目的】我々は，悪性病変に関与する高リスク型で口腔扁平上皮癌から高率に検出されるヒトパピローマウイルス 16 型（HPV-16）感染が口腔扁平苔癬（OLP）の悪性化におけるリスクファクターの一つとなっている可能性を考え，同疾患における HPV-16 感染について検索し，HPV 感染 OLP の上皮の細胞増殖能についても評価した．
【材料および方法】実験には，後に悪性化した 8 症例を含む 200 症例の OLP を使用した．コンセンサスプライマーを用いた PCR を行い，陽性症例について HPV-16 の型特異的 PCR を実施した．さらに，PCR での HPV-16 陽性 OLP（陽性群）と陰性 OLP（陰性群）の上皮の細胞増殖能を検討するために，Ki67 および TopoisomeraseIIα の免疫染色を行い，陽性細胞数を計測した．
【結果】HPV-16 型特異的 PCR での陽性率は 25.5%（51/200）であった．HPV-16 の OLP 臨床型別の陽性率は，びらん型が最も高かった．また，悪性化した OLP8 例のうち 5 例（62.5%）において HPV-16 が陽性と判定され，その臨床型は全てびらん型であった．TopoisomeraseIIα 免疫染色では，HPV-16 陽性群の上皮全層にわたり多くの細胞核に陽性像が確認され，陽性群の方が陰性群に比べて有意に陽性細胞数が多かった（$p<0.01$）．
【考察】以上の結果より，HPV-16 感染が OLP 悪性化のリスクファクターの一つであることが示唆された．また，びらん型 OLP に HPV 関連の悪性化が起きる可能性が考えられた．さらに，HPV-16 感染 OLP の上皮では細胞増殖が亢進していると考えられ，TopoisomeraseIIα が HPV 関連の OLP 悪性化のマーカーとなり得る可能性が考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Human papillomavirus type 16（HPV-16）infection in oral lichen planus（OLP）and cell proliferation ability of the epithelium of HPV-16 infected OLP

○Kato S[1,2], Isomura M[1], Sato N[1], Kawai R[1], Honda Y[1], Jinno M[1], Yoshida W[1,2], Sugita Y[1,2], Kubo K[1,2], Maeda H[1,2]

[1]Dept Oral Pathol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent
[2]Res Inst Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

In this study we assessed HPV-16 infection in OLP patients who developed cancer and also evaluated the cell proliferation ability of the epithelium of HPV-16 infected OLP. HPV-16 infection in 200 cases of OLP and 8 cases of OLP who developed cancer was detected by PCR, in-situ hybridization and immunohistochemistry. The cell proliferation ability of the epithelium of HPV-16 infected OLP was evaluated by immunohistochemistry using Ki67 and TopoisomeraseIIα. The HPV-16 infection rate was 25.5%（51/200）. The most frequent OLP clinical type infected with HPV-16 was erosive type（28.3%）. Five of the 8（62.5%）patients who developed cancer had HPV-16 infection. In the number of TopoisomeraseIIα positive staining, statistically significant difference was found between HPV-positive OLP and HPV-negative OLP. The results indicate that HPV-16 was often present in the OLP, especially in the erosive type. Five of the 8 patients who developed cancer had HPV-16 infection, which suggests that HPV infection is a risk factor for malignant transformation in OLP lesions. In the number of TopoisomeraseIIa positive staining, statistically significant difference was found between HPV-positive OLP and HPV-negative OLP, which suggests that TopoisomeraseIIα can be used as a marker of the HPV-related malignant transformation of OLP.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-93 マウス舌移植モデルにおけるヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移形質と癌微小環境

○白子　要一[1]，佐藤かおり[1]，田谷　雄二[1]，青葉　孝昭[1]，島津　徳人[2]，添野　雄一[1]

[1]日本歯大　生命歯　病理
[2]麻布大　生命環　食品生理

悪性腫瘍の浸潤・転移に関与する因子として癌細胞形質とともに脈管を含む癌微小環境が注目されている．本研究では，口腔癌の進展過程における細胞形質変化と間質構築との関連を検証する目的で，マウス舌へのヒト口腔癌細胞移植を実施した．転移巣由来株 HSC2，OSC19，OSC20 および原発巣由来株 KOSC2，HO-1u1 をヌードマウス舌側縁部に注入，所定期間後に舌および頸部リンパ節を採取，パラフィン包埋薄切標本（4 μm 厚）を作製した．癌細胞形質として E カドヘリン，ビメンチン，サイトケラチン，CD44s，間質組織要素として PECAM（血管内皮），Lyve-1（リンパ管内皮）の多段階免疫染色を施し，デジタル記録・コンピュータ演算による組織要素分画と定量解析を行った．3 次元構造解析に向けては連続薄切標本 200 枚から空間連結処理・立体構築を行った．移植した癌細胞株はいずれも舌組織で癌胞巣を形成した．被移植マウスでのリンパ節転移巣形成率は転移巣由来株で 100%，原発巣由来株で 40%未満であった．細胞表現形質の解析では，使用したすべての癌細胞株で浸潤先端部において E カドヘリン発現減弱と CD44s 発現亢進が認められ，ビメンチン発現は細胞株毎に多様性を示した．これらの細胞形質が転移巣で維持されていることも確認できた．画像演算処理により腫瘍内間質と周囲間質を分画すると，PECAM 陽性血管密度は非移植対照群の舌組織と比べて移植群の腫瘍周囲および腫瘍内間質で高まっているのに対し，Lyve-1 陽性リンパ管密度は転移巣由来株の腫瘍内間質でのみ有意に上昇していた．3 次元観察では周囲間質から腫瘍内間質に至るまでの血管・リンパ管走行を辿ることができ，腫瘍内外間質の境界面を設定した定量解析では細胞株間での血管・リンパ管貫入スポット数の違いも判明した．舌組織での癌胞巣性状には癌細胞株の由来・発現形質が関与し，異なる腫瘍-間質間相互作用が転移に影響することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Invasive/metastatic properties and tumor-stromal microenvironments of human oral squamous cell carcinoma cells in a xenograft mouse model

○Shirako Y[1]，Sato K[1]，Taya Y[1]，Aoba T[1]，Shimazu Y[2]，Soeno Y[1]

[1]Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[2]Dept Life Food Sci, Azabu Univ Sch Life Environmental Sci

The present study aimed to characterize tumor establishment in both tongue and regional lymph nodes and to investigate vascular stromal remodeling in a xenograft model of human oral squamous cell carcinoma (OSCC). We transplanted five human OSCC cell-lines into nude mouse tongues, and determined tongue tumor growth and micrometastatic dissemination by serial tissue sectioning in combination with immunohistochemistry using E-cadherin, cytokeratin, vimentin, and PECAM-1/Lyve-1 antibodies with the aid of computer-assisted image analysis. All cell-lines tested were tumorigenic in mouse tongue. The metastatic lesion-derived cell-lines (OSC19, OSC20, and HSC2) yielded a 100% nodal metastasis rate, whereas the primary tumor-derived cell-lines (KOSC2 and HO-1-u-1) showed below 40% metastatic potential. Immunohistochemistry showed that the individual cell-lines gave rise to heterogeneous phenotypes and that their micrometastatic lesions assimilated these phenotypes. OSCC cell-lines also represented heterogeneous properties with respect to parenchyma-stroma structure and blood/lymph vessel densities in the peri- and intra-tumor regions. Three-dimensional reconstruction analysis enabled to characterize the tumor-host border and penetrating blood/lymph vessels through the border zone. These results support that tumorigenicity and tumor architecture in the host tongue environment depend on the origin and properties of the cell-lines and that metastatic progression may take place through heterogeneous tumor-host interactions.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-94　口腔扁平上皮癌における DKK3 の発現と機能解析

○片瀬　直樹

川崎医大　医　分子生物

【目的】我々は口腔扁平上皮癌（OSCC）の発生と進展に関わる特異的な癌関連遺伝子の検索から DKK3 に注目した．DKK3 は多くの腫瘍で発現が低下しており，癌抑制遺伝子として機能すると考えられているが，我々のこれまでの研究では，OSCC では DKK3 はむしろ高頻度に発現しており，DKK3 発現群は予後不良であることが明らかとなっている．本研究では OSCC 由来細胞株を用いて DKK3 遺伝子の機能解析を行った．【方法】各種の腫瘍細胞株での DKK3 発現を Real-time PCR と western blotting で確認した後，OSCC 由来細胞に対して，DKK3 発現プラスミドのトランスフェクションによる強制発現系と，shRNA の導入によるノックダウン系を構築した．これらの細胞を用いて，細胞増殖，浸潤，遊走性への影響を検討した．また，DKK3 発現の増減による Wnt signal の変化を検討した．【結果と考察】DKK3 発現は OSCC などの一部の癌のみに限られており，ほとんどの癌では発現が減弱していた．OSCC 細胞での強制発現系では，DKK3 発現は mRNA レベルでもタンパクレベルでも有意に増加した．細胞増殖への影響は明らかではなかったが，浸潤性，遊走性は増加する傾向を認めた．ノックダウン系では DKK3 発現の有意な低下に伴い，細胞増殖，浸潤，遊走も全て有意に低下した．強制発現系での TOP/FOP assay では Wnt/$\beta$-catenin 系の亢進が示唆された．DKK family は oncogenic Wnt signal を抑制するが，DKK3 のみは Wnt signal を抑制することはできないとされ，その機能は不明である．本研究からは OSCC では DKK3 は組織特異的に oncogenic にふるまい，腫瘍の浸潤や転移を促進している可能性が示唆された．（共同研究者：寺田久美子，鈴木貴弘，西松伸一郎，山村真弘，山内明，濃野勉）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression and functional analyses of DKK3 in oral head and neck squamous cell carcinoma（OSCC）

○Katase N

Dept Mol Dev Biol, Kawasaki Med Sch

We identified DKK3 as a key gene that are involved in cancer progression in OSCC. DKK3 belongs to the DKK family, which is known as a negative regulator of oncogenic Wnt signaling. Although some reports indicate that DKK3 may not modulate Wnt signaling and its function is still unknown, DKK3 is believed to be a common and powerful tumor suppressor in many kinds of malignancies. However, we reported that DKK3 is predominantly expressed by OSCC cells, and that patients with DKK3 expression showed poorer prognosis, implying oncogenic roles of DKK3 in OSCC. To explain this paradoxical situation, we performed functional analyses on DKK3 in OSCC cell lines. Overexpression of DKK3 resulted in elevated cellular migration and invasion, and conversely, DKK3 knockdown resulted in significantly reduced cell proliferation, migration and invasion. Detailed analyses revealed that these phenotypic changes associated with altered DKK3 expression may be the results of modulation of Wnt/beta-catenin signaling. These results strongly imply that DKK3 may tissue-specifically exert oncogenic function in OSCC, and might be the clinical target for metastasis management.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-95　歯肉扁平上皮癌における Galectin-1 の発現と腫瘍免疫の関連について

○野田　百合，佐藤　　淳，廣瀬　勝俊，豊澤　　悟

大阪大　院歯　口腔病理

【初めに】Gaectin-1（Gal1）は β-Galactoside に親和性を有する動物レクチンで，脳，血管，消化管などの幅広い組織で発現が確認されている．Gal1 は発生や炎症反応に関与する一方で，癌組織では過剰に産生され，腫瘍免疫の抑制や腫瘍血管の増生に関与するとされている．特に，Gal1 が T リンパ球のアポトーシスを誘導することで起こる腫瘍免疫の抑制作用は，癌細胞を腫瘍免疫から回避させるため，生命予後にも深く関与すると考えられる．そこで本研究では，ヒトの病理組織切片を用いて，癌組織における Gal1 発現や T リンパ球のアポトーシスを免疫組織化学的に評価し，臨床病理学的特徴との関連について検討した．【方法】歯肉原発扁平上皮癌一次症例 80 症例を対象に，倫理委員会の承認を得て Envision 法により免疫組織化学的検討を行った．腫瘍での Gal1 発現は，抗 Gal1 抗体を用いた免疫染色で検討し，T リンパ球のアポトーシスについては抗 CD3 抗体と抗 Cleaved-caspase3 抗体，抗 CD8 抗体と抗 Cleaved-caspase3 抗体の組合せを用いた二重免疫染色で検討を行った．Gal1 発現は，腫瘍細胞と間質における発現を 3 段階に評価し，T 細胞のアポトーシスやリンパ節転移等を含めた臨床病理学的特徴との関連について統計学的に解析を行った．【結果】歯肉扁平上皮癌胞巣での Gal1 の発現レベルは，病期別分類やリンパ節転移の有無，組織学的分化度と有意な相関を示したが，腫瘍間質での Gal1 発現レベルは有意な相関を示さなかった．また，歯肉扁平上皮癌胞巣での Gal1 の発現レベルは，腫瘍に浸潤する CD3 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球のアポトーシス頻度と有意な相関を示した．以上から口腔歯肉扁平上皮癌胞巣における Gal1 発現は，細胞傷害性 T リンパ球のアポトーシス誘導を介して，予後に関与することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Relationship between galectin-1 expression and tumor immunity at gingival squamous cell carcinoma

○Noda Y，Satou S，Hirose K，Toyosawa S

Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Galectin-1（Gal1）is the beta-Galactoside-binding protein which regulates cell-cell adhesion, anti-inflammation response in normal tissue. Gal1 overexpresses in cancer plays important roles in cancer progression for regulating cell cycle, migration and immune escape. About tumor immunity, it is considered that Gal1 suppresses the immune response by inducing apoptosis of activated T-cells in the tumor. However, there is not shown histological evidence of the T-cell apoptosis in human tumor specimens. In this study, we analyzed the relationship between Gal1 expression and apoptotic T-cells of gingival squamous cell carcinoma（GSCC）and other clinicopathological factors. Eighty specimens of GSCCs were stained by immunohistochemistry using the anti-Gal1, the anti-CD3/anti-Cleaved-caspase3 and the anti-CD8/anti-Cleaved-caspase3 antibodies. Gal1 expression and T-cell apoptosis were evaluated on 6 high-power fields（3 in the tumor and 3 in the stroma）. We showed that Gal1 expression of GSCC was significantly correlated with T-cell infiltration, and apoptosis of the CD3+ and CD8+ T-cells. Moreover, it was significantly correlated with some clinicopathological features, such as lymph node metastasis, histological differentiation and overall survival. These findings suggest that the Gal1 may contribute to the immune escape of GSCC cells, and that the Gal1 expression level may serve as a candidate marker for prognosis of GSCC.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-96　多形腺腫の細胞分化における Notch の役割

○高峰　圭介[1]，中野　敬介[2]，落合　隆永[1]，杉田　好彦[3]，久保　勝俊[3]，前田　初彦[3]，長谷川博雅[1]，川上　敏行[1]

[1]松本歯大　院　病態解析
[2]岡山大　院医歯薬　口腔病理
[3]愛院大　歯　口腔病理

【緒言】多形腺腫は発生頻度の高い唾液腺腫瘍であり，多様な組織像が特徴であるが，充実性に増殖した腫瘍胞巣の細胞の分化は研究があまりなされていない．本研究では，腫瘍実質細胞における細胞の分化について着目し行った．【材料と方法】材料は愛知学院大学歯学部口腔病理学講座にて取り扱われ，WHO の分類に基づく典型的な病理組織像を呈する 30 症例（平均年齢は 51.5 歳，男性 13 症例，女性 17 症例）である．Notch1 の免疫組織化学的検討を加えたのち，細胞種を特定するために Notch と CK7 ないし CK13 との蛍光免疫染色による重ね合わせにて検討した．【結果】病理組織学的に随所に小型円形ないし嚢胞状の腺腔を形成する導管上皮細胞とその周囲に位置する筋上皮細胞の主として 2 種類の増殖からなっていた．間葉様部分には筋上皮細胞の増殖からなり，これが次第に粗になって形成された特徴的な組織構造“mixed appearance”像があった．また腫瘍細胞が扁平上皮へと化生し胞巣内に著しく角質変性を起こしている部位もあった．Notch1 は腫瘍細胞の多くの細胞種に発現していた．とくに腺管様構造ないし，その外層に分布する小型立方形細胞やそれに連続して増殖する細胞，さらに腫瘍胞巣内部の扁平上皮化生が生じた部位の基底細胞様細胞と有棘細胞層に強く陽性に反応した．蛍光染色で確認したところ，これらの部位では Notch1 の核内移行が明確に確認できると共に，Notch1 と CK7 および Notch1 と CK13 の陽性部との位置関係が明瞭になった．腺管様構造の外層に分布する小型立方形細胞では核内移行が生じていた．【考察と結論】多形腺腫の特徴である様々な細胞への分化，導管上皮細胞がその特徴を失って充実性に増殖する部や扁平上皮化生部には，Notch1 のシグナルが大きく関与していることが強く示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of Notch in cell-differentiation of pleomorphic adenomas

○Takamine K[1]，Nakano K[2]，Ochiai T[1]，Sugita Y[3]，Kubo K[3]，Maeda H[3]，Hasegawa H[1]，Kawakami T[1]

[1]Hard Tissue Pathol Unit, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Oral Med
[2]Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[3]Dept Oral Pathol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

There are well known that Notch signaling was some roles of cell differentiation at the development tissues, especially the oral and maxillofacial regions of some developmental stages. Therefore, to determine Notch signaling in the pleomorphic adenoma tissues, we examined. The expression of Notch1 as well as the distribution of various cytoskeletal proteins CK7 and CK13 was examined in 30 cases of pleomorphic adenoma by immunohistochemistry. Notch1 was detected in almost tumor cells. The peripheral columnar cells in squamous metaplasia and small cuboidal cells in or just outside of the duct-like structures were strongly positive to Notch1. Although, nuclear translocation was observed in small cuboidal cells and in some basaloid cells. The immunofluorescent staining pattern of Notcht1 and CK7 as well as Notch1 and CK13 was consistent with IHC results. Thus, in pleomorphic adenoma, Notch1 is involved in tumor cell differentiation of peripheral cuboidal cells forming solid nests from small peripheral columnar cells of duct-like structures. Furthermore, peripheral columnar cells in solid tumor nests and in squamous metaplasia are governed. Therefore, Notch signaling may be involved in the 'mixed' differentiation characteristic of pleomorphic adenoma although another signaling may also be possibly working in other parts of the tumor tissue.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-97 *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染はマクロファージを介して肝星細胞を活性化し非アルコール性脂肪性肝炎の病態を進行させる

○長﨑　敦洋，古庄　寿子，宮内　睦美，髙田　　隆

広島大　院医歯薬保　口腔顎顔面病理病態

近年，非アルコール性脂肪性肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis :NASH）の病態進行機序として，マクロファージ（MΦ）による肝星細胞活性化を介した線維化亢進が注目されている．我々は *Porphyromonas gingivalis(P.g.)*歯性感染が NASH の炎症や線維化を促進することを報告したが，その機序は不明である．今回，*P.g.*歯性感染の誘導する NASH の病態進行機序における MΦ-肝星細胞相互関係の重要性を検討した．

1）PMA 刺激 THP-1（MΦ）の *P.g.*-LPS 誘導サイトカイン発現をパルミチン酸処理/非処理条件下で調べた．いずれの条件でも *P.g.*-LPS は TNF-$\alpha$-, IL-1$\beta$-mRNA やタンパク発現量を増加させた．また，TLR2（*P.g.*-LPS の受容体）阻害剤による *P.g.*-LPS-TLR2 経路の遮断はサイトカイン産生量を有意に減少させた．2）*P.g.*-LPS 刺激 MΦ の培養上清で培養した肝星細胞では，$\alpha$-smooth muscle actin などの分化マーカーの発現が上昇した．3）高脂肪食誘導脂肪肝マウスモデルに *P.g.*を歯性感染させ，6 週後に抗菌薬の経口投与や根管貼薬治療を行った．その後，3 週目の肝組織で，MΦ の出現状況を組織計測学的に検討した．*P.g.*歯性感染により増加した MΦ の集簇巣（hepatic Crown-Like Structure）の数や浸潤面積は治療群で有意に減少した．

以上の結果から，*P.g.*歯性感染で増加した MΦ は，*P.g.*-LPS 刺激による過剰な炎症性サイトカイン産生を介して 肝星細胞の線維形成を促進し，NASH の病態を進行させる可能性が示された．歯科治療や抗菌薬による *P.g.*歯性感染制御は，肝組織での MΦ 数を減少させ，NASH の病態を改善する可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Odontogenic infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates pathological progression of NASH through activation of hepatic stellate cells by macrophages

○Nagasaki A，Furusho H，Miyauchi M，Takata T

Dept Oral Maxillac Pathobiol, Hiroshima Univ Grad Sch Biomed Health Sci

Hepatic stellate cell activation by macrophages plays important roles in pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis（NASH）. Although we previously reported *Porphyromonas gingivalis*（*P. g.)* exacerbated inflammation and fibrosis in NASH, underlining mechanism is still unclear. In the present study, we investigated importance of macrophage-hepatic stellate cell interaction in *P. g.*-odontogenic infection-induced NASH progression.

1）The cytokine-expression in human macrophages with *P.g.*-LPS stimulation was examined with/without palmitate-treatment. *P.g.*-LPS upregulated TNF-$\alpha$ and IL-1$\beta$ expressions in both conditions. TLR2（a *P. g.*-LPS receptor）significantly inhibited *P.g.*-LPS induced cytokine production. 2）Fibrosis markers like $\alpha$-smooth muscle actin were upregulated in hepatic stellate cells cultured with conditioned medium of *P.g.*-LPS stimulated macrophages. 3）At 6-week after *P. g.*-infection from pulp of High fat diet（HFD）-induced fatty liver mouse model, oral application and/or root canal treatment of antibiotic was done as treatment. Then after 3 weeks, macrophage-localization is histomorphometrically analyzed. The *P. g.*-odontogenic infection-increased macrophages-foci and macrophages-area were significantly reduced in treatment groups.

Therefore, it is suggested that macrophages increased by *P. g.*-odontogenic infection exacerbates pathological progression of NASH through stimulating fibrogenic activity of hepatic stellate cell via excessive cytokines-production. Moreover, elimination of *P. g.*-infection by dental treatment/antibiotic application may be a beneficial impact on NASH through reducing macrophages in the liver.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-98 がんの肺転移抑制におけるケモカイン CXCL14/BRAK と NKT 細胞との相乗作用

○陽　暁艶[1]，宮本　千央[1,2]，居作　和人[1,2]，加藤　靖正[3]，畑　隆一郎[1,2]

[1]神奈川歯科大　口腔難治疾患研究センター
[2]神奈川歯科大　口腔科学
[3]奥羽大　歯

## Mechanisms of tumor suppression by chemokine CXCL14: Synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells on the suppression of metastasis on the lung

○Yang X[1], Miyamoto C[1,2], Izukuri K[1,2], Kato Y[3], Hata R[1,2]

[1]Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Biol Kanagawa Dent Univ
[3]Dept Oral Fxn Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent

［Purpose］We reported previously that high expression of chemokine CXCL14/BRAK（CXCL14）gene in the host animals resulted in suppression of carcinogenesis, growth and metastasis of tumor cells, and extended life span of tumor carrying animals（Scientific Reports 5:9083, 2015）. The aim of this study was to find the mechanisms of tumor metastasis suppression by CXCL14.［Materials & Methods］Melanoma cells or Lewis lung carcinoma（LLC）cells were injected via a tail vein into wild type（Wt）or CXCL14 transgenic（Tg）mice. Melanoma cells that had been engineered to express the CXCL14 gene under the control of doxycycline（B16-LMT3-Tet/OnBRAK）were also injected via a tail vein into Wt, T-cell and B-cell deficient SCID mice, or T-cell, B-cell and NK cell-deficient NOG mice to investigate colonization to the lungs. Some of the Tg and Wt mice were also pre-injected with NK cell depleting anti-asialo-GM1 or NK cell and NKT cell depleting anti-NK1.1 antibodies. We also pretreated mice with alpha-galactosylceramide, an NKT cell activator, to see the roles of NK cells and NKT cells in CXCL14-dependent tumor suppression in vivo.［Results］Expression of CXCL14 whether in host mice or in tumor cells suppressed rate of tumor metastasis on the lung. Injection of anti-asialo-GM1, anti-NK1.1 antibodies to the mice attenuated the suppressing effects of CXCL14 on the tumor metastasis but still rate of tumor suppression was higher in the CXCL14 Tg mice. Injection of alpha-galactosylceramide to the mice before and after injection of tumour cells enhanced the suppressing effects of CXCL14 on the tumor metastasis, and extended life span of tumor carrying animals.［Conclusion］Our results indicate that there are synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells, which secrets interferon gamma, on the suppression of tumor metastasis on the lung.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-99 哺乳類細胞を使ったリコンビナント・ヒトアメロジェニンの発現と精製法の確立

○高橋亜友美[1]，森田　貴雄[2]，倉重　圭史[1]，村田　佳織[1]，齊藤　正人[1]，谷村　明彦[2]

[1]北医療大　歯　小児歯
[2]北医療大　歯　薬理

【目的】アメロジェニンはエナメル質形成時に大量に分泌され，エナメル質の石灰化と共に分解・除去されていくことが知られており，細胞の増殖や分化のシグナル分子としての作用が報告されている．今回，歯周組織を構成する細胞に対するアメロジェニンの作用を解析するために哺乳類細胞にリコンビナント・タンパク質を発現させて，その性状を解析した．【方法】AMELX 遺伝子を c-Myc-DDK-HisTag Entry vector に挿入してヒトアメロジェニン発現プラスミドベクター（pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag）を作製した．このベクターを使ってタンパク質発現用哺乳類浮遊細胞（EXPI 細胞）に遺伝子を導入し，培養上清中のリコンビナント・タンパク質を DDK アガロースビーズを用いてアフィニティー精製した．サンプルはウエスタンブロッティング，銀染色，MemCode stain kit を用いて解析した．【結果と考察】pAMELXv3-Myc-DDK-HisTag を使って遺伝子を導入した EXPI 細胞の培養上清および細胞質サンプルのウエスタンブロッティング解析において，抗 DDK 抗体，抗 c-Myc 抗体，および抗アメロジェニン抗体に反応する 30 KDa，33 KDa，65 KDa の複数のバンドが確認された．DDK ビーズを用いたアフィニティー精製後のウエスタンブロッティング解析では，単量体アメロジェニンと考えられる 27 KDa バンドに加えて，2 量体と思われる 54 KDa のバンドが認められた．銀染色および MemCode stain kit によるタンパク質染色でも同じバンドが認められたことから DDK ビーズによって，高純度のリコンビナント・アメロジェニンが精製されたことが示された．この方法では，培養液 10 mL あたり 20～40 μg のリコンビナント・アメロジェニンの精製が可能であった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Production and purification of human recombinant amelogenin in mammalian cells

○Takahashi A[1]，Morita T[2]，Kurasige Y[1]，Murata K[1]，Saitoh M[1]，Tanimura A[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido
[2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Purpose : Amelogenin is the major secretory product of ameloblast in the developing teeth, and plays a crucial role for enamel mineralization. Recent evidence also suggests that amelogenin has biological activities for the cell differentiation of dental epithelial cells. In this study, we expressed a recombinant human amelogenin in a mammalian cell line and purified for structural and functional studies. Methods : Amelogenin vector, human AMELX, transcript variant 3, with Myc-DDK-Histag was construct, and was transfected into EXPI cells. Recombinant amelogenin was purified by DDK agarose beads, and were characterized by Western blotting, silver staining, and MemCode Stain Kit. Results and Conclusion : Western blot analyses with anti-DDK, anti-cMyc, and anti-amelogenin antibodies showed multiple protein bands with molecular mass of 30 KDa, 33 KDa, and 65 KDa in the culture media and cell sample of AMEL-expressing cells. The molecular mass of the recombinant proteins in affinity purified sample was 27 kDa and 54 kDa. Essentially identical bands were detected with silver staining and MemCode Stain Kit. The 27 KDa and 54 KDa bands are thought to be the monomer and dimer of recombinant amelogenin, respectively. In this method, 20～40 μg of purified recombinant amelogenin was obtained from 10 mL culture media of EXPI cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-100 Shh は EGF/ErbB カスケードを介して分枝形態形成を調節している

○水越　堅詞，小山　典子，林　　徹，柏俣　正典

朝日大　歯　薬理

分枝形態形成は器官形成過程において重要な現象であり，胎生期における上皮・間葉相互作用やそれらの関連因子によって制御されている．一方，ヘッジホッグファミリーである Shh は器官発生の際に働く重要なモルフォゲンとして唾液腺，膵臓，腎臓などの多くの発生現象に関与していることが知られている．これまでに，我々は顎下腺原基に Shh を作用させることで，EGF の発現を増加させ，分枝形態形成を促進させることを報告してきた．本研究では Shh が誘導する分枝形態形成と EGF/ErbB シグナルの関係を明らかにするため，器官培養，リアルタイム RT-PCR，イムノブロット解析を用いて詳細に検討を行った．その結果 Shh は 1,000 ng/ml 以上の濃度で分枝形態形成を促進した．Shh 処理後 6 時間で Egf，12-24 時間で Nrg1 の mRNA 発現が有意に上昇した．処理後 3 時間から Erbb1，Erbb2 および Erbb3 の mRNA の有意な増加が確認された．Shh 処理後 6 時間から ErbB1 のリン酸化の上昇と ErbB1 のタンパク質量の増加が見られた．ERK1/2 のリン酸化状態については Shh 処理後 6 時間と 48 時間の 2 つにピークが認められ，二相性の変化を示した．AG1478 を前処理した場合，ErbB1 と ERK1/2 のリン酸化状態に変化は認められなかった．さらに，Shh 刺激により，Egf は間葉で，Erbb1，Erbb2 および Erbb3 の mRNA 発現は上皮で特異的に上昇することが確認された．分離上皮に直接 Shh を作用させてもクレフト形成は認められなかった．以上のことから，Shh は間葉における EGF ligand の発現上昇と上皮での ErbB 量の増加により EGF/EGFR（ErbB）シグナルの活性化を介して分枝形態形成を促進させていることが明らかになった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Shh/Ptch and EGF/ErbB are cooperatively regurated branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands

○Mizukoshi K，Koyama N，Hayashi T，Kashimata M

Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent

Hedgehog family including Sonic hedgehog（Shh）Desert hedgehog and Indian hedgehog are well known as a morphogen that plays many important roles during development of numerous organs such as the tongue, pancreas, kidney, cartilage, teeth including salivary glands（SMG）. In Shh null mice, abnormal development of the salivary gland is seen after embryonic day（E）14. Shh is also induced lobule formation and lumen formation in acini-like structures in cultured E14 SMG. In this study, we investigated the relationship between Shh and epidermal growth factor（EGF）/ErbB signals of developing fetal mouse SMG. Administration of Shh in cultured E13 SMG stimulated branching morphogenesis（BrM）and induction of mRNAs synthesis for EGF ligand and ErbB family. Shh also stimulated activation of ErbB signaling system such as ERK1/2. AG1478, a specific inhibitor for ErbB receptor, completely suppressed BrM and activation of EGF/ErbB/ERK1/2 cascade in cultured E13 SMGs cultured with Shh. The expressions of mRNA for Egf in mesenchyme and mRNA for Erbb1, Erbb2 and Erbb3 in epithelium of E13 SMG were specifically induced by administration of Shh. These results suggested that Shh stimulates BrM of fetal mouse SMG through an activation of EGF/ErbB/ERK1/2 signaling systems.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-101　胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成におけるインテグリン a5 サブユニットの役割

○赤井　崇浩[1]，水越　堅詞[2]，小山　典子[2]，林　　徹[2]，住友伸一郎[1]，柏俣　正典[2]

[1]朝日大　歯　口腔外科
[2]朝日大　歯　歯科薬理

胎生期の唾液腺は上皮組織と間葉組織で構成されており，発達にともなって上皮の形態変化することで器官形成が進行する．胎生期マウスの唾液腺は無血清培地に浮かべたポリカーボネート膜に静置することで器官培養を行うことができる．培養中は生体内と同様に唾液腺の器官形成反応が進行し，導管系が構築される．この現象は分枝形態形成とよばれ，すべての外分泌腺，腎臓や肺の発生過程で共通して観察される．分枝形態形成は器官を構成している上皮と間葉の組織間相互作用で制御されていると考えられている．現在までに，これらの制御因子には細胞成長因子や細胞接着因子などが複数関わっているとの報告がある．本研究では，分枝形態形成おける細胞接着因子の一つであるインテグリン，とくにインテグリン a5 サブユニットの役割について検討することを目的する．胎生 13 日の唾液腺原基の器官培養を実施した．インテグリン a5 サブユニットの中和抗体を添加して培養を行った場合，分枝形態形成は用量依存的に著しく抑制された．間葉を取り除き，上皮組織をマトリゲルで覆う実験系では a5 インテグリン抗体が上皮の形態形成を抑制することが明らかになった．以上の結果から，a5 インテグリンは胎生期マウス顎下腺の分枝形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of a5 integrin subunit in branching morphogenesis fetal mouse submandibular glands

○Akai T[1]，Mizukoshi K[2]，Koyama N[2]，Hayashi T[2]，Sumitomo S[1]，Kashimata M[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Dent Pharmachol, Asahi Univ Sch Dent

Branching morphogenesis（BrM）is a developmental process for formation of many organs, such as lung, kidney and all exocrine glands including salivary glands. BrM is a dramatic biological event regulated by epithelial-mesenchymal interactions. The fundamental process of epithelial-mesenchymal interactions depended on both on a variety of growth factors and their receptors, and on the extracellular matrix（ECM）and integrins. The mouse submandibular gland（SMG）is a well-characterized model system for the study of epithelial-mesenchymal interactions involved in fetal organogenesis both in vivo and in vitro. There are several reports describing the molecular mechanisms of BrM of SMG rudiments. For example, BrM requires both the mesenchyme and the epithelial basement membrane, and these components involve the interactions of both several integrins and their ligands in ECM. In this study, we demonstrated the role of intergrin a5 subunit in BrM of developing mouse SMG. The BrM of cultured E13 SMG was dose-dependently suppressed by administration of a blocking antibody for a5 integrin subunit. The suppression of epithelial morphogenesis of SMG rudiment was also shown in mesenchyme-free epithelial culture system. These results suggest that integrin a5 have critical role in branching morphogenesis of fetal mouse SMG.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-102 ラット唾液腺における PAC1-R，StAR，CYP11A1 の発現に及ぼすジアゼパムの効果

○塚越　絵里[1]，川口　　充[2]，吉川　正信[1,3]，四宮　敬史[1]，大久保みぎわ[1]，笠原　正貴[1]
[1]東歯大　薬理，[2]東歯大，[3]東海大　臨床薬理

【目的】中枢型ベンゾジアゼピン受容体と末梢型ベンゾジアゼピン受容体（PBR）は唾液腺に存在し，唾液分泌を抑制的に調節している．これまでに我々は，ラット唾液腺においてジアゼパムの継続投与はジアゼパム結合阻害因子（DBI）と PBR の遺伝子量を増加させ，唾液分泌の低下を引き起こすことを明らかにした．中枢神経系においては，DBI は星状細胞で下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド受容体（PAC1-R）を介して放出され，ミトコンドリアにある PBR に作用することが知られている．また，PBR はコレステロールの輸送タンパク質（StAR）とステロイドの合成酵素（CYP11A1）の産生に関与しており，プレグネノロンの産生を促進することが報告されている．本研究の目的は，DBI の唾液腺での作用経路と唾液分泌との関係を明らかにするために，PAC1-R，StAR，CYP11A1 の mRNA の発現量を調べることである．【方法】ラットにジアゼパム（0.4 mg/kg）を腹腔内投与し，1 回投与する単回投与群と，14 日間にわたって投与する継続投与群とに分けた．ジアゼパム最終投与の 2 時間後と 16 時間後にラットの大脳皮質，耳下腺，顎下腺，舌下腺を摘出し，qRT-PCR 法を用いて，PAC1-R，StAR，CYP11A1 の mRNA 量を測定した．【結果と考察】単回投与群では，投与の 2 時間後と 16 時間後ともにすべての唾液腺において mRNA 量に変化は認められなかった．継続投与群では，最終投与の 2 時間後にすべての唾液腺において PAC1-R，StAR，CYP11A1 の mRNA 量が有意に増加した．これらの結果により，中枢神経系と同様のメカニズムが唾液腺にも存在し，唾液分泌の抑制経路に PAC1-R，StAR，CYP11A1 が関与することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Diazepam enhances expression of PAC1-R, StAR and CYP11A1 in rat salivary glands

○Tsukagoshi E[1]，Kawaguchi M[2]，Yoshikawa M[1,3]，Shinomiya T[1]，Okubo M[1]，Kasahara M[1]
[1]Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll，[2]Tokyo Dent Coll，[3]Dept Clin Pharmacol, Tokai Univ Sch Med

Central-type benzodiazepine receptor and peripheral-type benzodiazepine receptor（PBR）in salivary gland play a role in the inhibitory regulation of salivary secretion. Previous study have reported that repetitive administration of diazepam increased diazepam-binding inhibitor（DBI）and PBR mRNA in rat salivary gland, causing a decrease in salivary secretion. The purpose of this study was to determine the relationship between pathway of action of DBI and salivary secretion, we investigated expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor（PAC1-R）, steroidogenic acute regulatory protein（StAR）and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme（CYP11A1）mRNA. Rats were injected intraperitoneally with 0.4 mg/kg diazepam as a single administration or once daily for 14 days as repetitive administration. Parotid gland, submandibular gland, lingual gland, or cerebral cortex was removed at 2 or 16 h after final administration for analysis of expression of mRNA. The mRNAs of PAC1-R, StAR and CYP11A1 were analyzed by qRT-PCR. Repetitive administration, but not single administration, of diazepam enhanced expression of PAC1-R, StAR and CYP11A1 mRNA in rat salivary gland. These results suggest that repetitive administration of diazepam stimulates PAC1-R, StAR and CYP11A1 expression, which may result in an increase in the suppressive effect of diazepam on salivary secretion.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-103 α7 ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬が骨代謝に及ぼす影響

○盛林　昭仁[1]，萱島　浩輝[1]，佐伯万騎男[3]，矢谷　博文[1]，江草　　宏[1,2]

[1]大阪大　院歯　クラウンブリッジ
[2]東北大　院歯　分子　再生補綴
[3]新潟大　院医歯　歯科薬理

【目的】近年，骨代謝制御へのα7 ニコチン性アセチルコリン受容体（α7-nAChR）の関与が報告されている．本研究の目的は，α7-nAChR の特異的拮抗薬である Methyllycaconitine（MLA）が破骨細胞分化および骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討し，α7-nAChR を標的とした骨代謝制御の可能性を探索することである．【方法】破骨前駆細胞株（RAW264.7）を RANKL 依存性に分化誘導する過程で MLA を添加し，5〜6 日後に TRAP 染色から陽性の多核細胞数を計測した．また，ラット骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を MLA 含有骨芽細胞分化誘導培地中で 21 日間培養し，リアルタイム RT-PCR 解析から骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現を検討し，Alizalin Red 染色を行った．ラット頭蓋骨欠損実験モデルに MLA を投与し，21 日後の骨組織再生を HE 染色による組織学的観察およびマイクロ CT 撮影を用いた画像解析により評価した．【結果】RAW264.7 の TRAP 陽性多核細胞数は 10 nM の MLA の添加により有意に減少した．また，100 nM の MLA は分化誘導 14 日目の MSC の Runx2 および osteocalcin 遺伝子の発現を有意に促進した．Alizalin Red 染色の結果，MLA は MSC の細胞外基質の石灰化を有意に促進した．組織切片標本では MLA 投与群および非投与群ともに頭蓋骨欠損部位に新生骨の形成を認めたが，MLA 投与群により多くの新生骨の形成を認めた．また，MLA 投与群における頭蓋骨欠損部の骨体積および骨塩量は非投与群と比較して濃度依存的に増加した．【結論】MLA は破骨細胞の分化を抑制する一方で，骨芽細胞分化を促進し，局所的骨欠損部位における骨形成を促進させる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist on bone metabolism

○Moribayashi A[1]，Kayashima H[1]，Saeki M[3]，Yatani H[1]，Egusa H[1,2]

[1]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[3]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Objectives: Recently, alpha7 nicotinic acetylcholine receptor（α7nAChR）has been reported to be involved in regulation of bone remodeling. Methyllycaconitine（MLA）is a specific antagonist of α7nAChR. The objective of this study was to investigate the effects of MLA on osteoclastogenesis and osteogenesis. Methods: RAW264.7 osteoclast progenitor cells were cultured with RANKL and MLA. Osteoclast formation was determined by TRAP staining. Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells（MSCs）were maintained in osteogenic induction medium containing MLA. The expression of osteogenic marker genes and the mineralized matrix formation of the MSCs were evaluated by real-time RT-PCR analysis and Alizarin red staining. Collagen graft material containing MLA was transplanted into the rat calvarial bone defects. After 21 days, bone formation was assessed by HE staining and microCT analysis. Results: The number of TRAP-positive multinucleated osteoclasts significantly decreased by the addition of MLA. MLA enhanced the expression of osteogenic marker genes and matrix mineralization of MSCs. At the 3rd week, MLA enhanced the mineral content and volume of the new bone in the calvarial defect in a concentration-dependent manner. Conclusion: MLA inhibits osteoclastogenesis, while it accelerates osteogenesis, which may enhance the bone regeneration at the bone defect site.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-104　交感神経系による骨形成制御には $\alpha_{1B}$-アドレナリン受容体が関与する

○田中健二郎，平居　貴生，戸苅　彰史

愛院大　歯　薬理

【目的】近年，骨代謝制御における神経系の関与が明らかになっている．我々は骨芽細胞に発現する $\alpha_{1B}$-アドレナリン受容体（AR）が細胞機能を制御していることを既に見出しているが，$\alpha_1$-AR を介する骨代謝制御については不明な点が多く残されている．したがって，本研究では骨組織における $\alpha_1$-AR シグナルの生理的役割について詳細に検討した．【方法】8 週齢 C57B6J 雄性マウスに，選択的 $\alpha_1$-AR 阻害剤であるプラゾシン（0.01，0.03 mg/kg/日）を 14 日間腹腔内投与し，対照群には生理食塩水を同様に投与した．投与終了後，摘出した大腿骨の $\mu$CT 解析を行った．また，8 週齢 $\alpha_{1B}$-AR 欠損（$\alpha_{1B}$ KO）マウスおよび野生型対照マウス（WT）の大腿骨を摘出した後，$\mu$CT 解析とリアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った．【結果】マウスにプラゾシンを投与した後，大腿骨遠位部における $\mu$CT 解析と骨形態計測を行った結果，BV/TV 値と骨形成パラメーターである MS/BS 値，MAR 値，BFR 値の減少が明らかとなった．また，骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における $\alpha_1$-AR の mRNA 発現解析を行った結果，MC3T3-E1 細胞における $\alpha_{1B}$-AR の mRNA 発現が確認された．さらに，$\alpha_{1B}$ KO マウスおよび野生型対照マウス（WT）の大腿骨遠位部の $\mu$CT 解析と骨形態計測を行った結果，WT と比較して $\alpha_{1B}$ KO マウスでは BV/TV 値，MS/BS 値，MAR 値，および BFR 値の有意な低下がみられた．また，$\alpha_{1B}$ KO マウスでは骨組織おける *Runx2*, *osterix*，および *osteocalcin* mRNA 発現の有意な減少が認められた．【考察】以上の結果より，骨量の制御には $\alpha_{1B}$-AR シグナルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された．また，これら制御機構には骨芽細胞における $\alpha_{1B}$-AR シグナルによる骨形成制御が関与することが考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of $\alpha_{1B}$-adrenergic receptor signaling in bone formation

○Tanaka K，Hirai T，Togari A

Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Sympathetic nervous system regulates bone remodeling in part through the $\beta$-adrenergic receptor（AR）in osteoblasts and osteoclasts, and our recent work demonstrated that the $\alpha_{1B}$-AR signaling in osteoblasts are important for noradrenaline-mediated cell proliferation. To evaluate the functionality of $\alpha_{1B}$-AR signaling on bone, we investigated the effects of pharmacological blockade of $\alpha_1$-AR signaling on bone mass by performed micro-CT based bone densitometry in bones after the systemic administrations of prazosin, an $\alpha_1$-AR antagonists for 2 weeks. The BV/TV of the femur distal portion was significant lower in prazosin-administrated mice in a dose-dependent manner than in saline-administrated mice. In addition, we compared the bone phenotype of $\alpha_{1B}$-AR null mice（$\alpha_{1B}{}^{-/-}$）with that of WT littermates. The results of micro-CT based bone densitometry showed that BV/TV of the distal portion of the femurs was significantly lower in $\alpha_{1B}{}^{-/-}$ mice than in WT mice. Moreover, BFR was also significantly decreased by approximately 40 % in $\alpha_{1B}{}^{-/-}$ mice. Furthermore, The mRNA expression of *Runx2*, *osterix*, and *osteocalcin* in bone was significantly lower in $\alpha_{1B}{}^{-/-}$ mice than in WT littermates. Taken together, these results revealed that $\alpha_{1B}$-AR signaling is required for bone formation in mice

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-105 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットへの新規ビスホスホネート投与による骨量改善と作用機序について

○滝澤　愛子[1,2]，千葉　美麗[2,4]，太田　　岳[2]，安田　真弓[1,2]，鈴木　恵子[3]，篠田　　壽[4]，五十嵐　薫[1]

[1]東北大　院歯　口腔障害科学，[2]東北大　院歯　口腔生理，[3]奥羽大　歯　歯科薬理，[4]東北大　院歯　環境歯

【目的】新規ビスホスホネート［4-（methylthio）phenylthio］methanebisphosphonate（MPMBP）は，側鎖にNを含まず，Sを含有するメチルチオフェニルチオ基を持ち，ビスホスホネート共通の骨吸収抑制作用に加えて，抗炎症作用を持つことが示唆されている．本研究は，卵巣摘出術により骨量が減少したラットを用いてMPMBPを全身投与した場合の効果を検討した．【方法】12週齢雌性Sprague-Dawleyラットに卵巣摘出術（OVX）と擬似手術（Sham）を施行し，12週間の飼育後に骨粗鬆症モデルの確立を確認した．その後，OVX群は週1回，合計12 回，12 週間にわたって，各濃度のMPMBP（0.2，1.0，5.0 mgP/kg）もしくは0.9% NaClを各群10匹のラットに皮下注射し，テトラサイクリンおよびカルセインによる硬組織時刻描記を施した．屠殺後摘出した骨はmicro-CTにて解析するとともに，非脱灰切片および脱灰切片を作製し，組織学的に評価した．【結果】MPMBPの全身投与により，OVX群において骨量，骨密度の増加だけでなく，骨梁の機械的強度が増加した．MPMBPはOVXによるカテプシンK陽性破骨細胞の増加を抑制し，さらに，骨髄の脂肪細胞の数と大きさを減少させた．MPMBPの投与により一次海綿骨の長軸方向の骨形成幅の増加は抑制されたが，骨幹端部の骨量と骨密度は増加した．さらに，骨幹部皮質骨横断面においては内骨膜性骨形成幅が増加し，一次海綿骨でのタイプIコラーゲンの蓄積も増加した．【結論と考察】MPMBPは，エストロゲン欠乏性骨粗鬆症モデルラットにおいて，骨吸収を抑制するだけでなく骨形成を促進し，骨髄における脂肪細胞増加を抑制する作用を有することが示唆された．炎症性サイトカインの関与が示唆されている閉経後骨粗鬆症の骨量改善に対して，抗炎症作用を持つMPMBPが有効であると考えられた．【会員外共同研究者】昭和大　薬　薬化学　伊藤　喬，金光卓也　**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanism of action of a novel bisphosphonate that increases bone mass in OVX rats

○Takizawa A[1,2], Chiba M[2,4], Ota T[2], Yasuda M[1,2], Suzuki K[3], Shinoda H[4], Igarashi K[1]

[1]Div Oral Dysfunction Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, [4]Ctr for Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent

The novel bisphosphonate（BP）disodium dihydrogen-4-［(methylthio）phenylthio］methanebisphosphonate（MPMBP）is a non-nitrogen-containing compound, possessing a sulfur moiety within one of the side-chains, which confers anti-inflammatory properties upon it. The aim of this study was to investigate the systemic effects of MPMBP on the bone loss induced by ovariectomy（OVX）in rats. Micro-computed tomography revealed that administration of MPMBP to OVX model rats increased bone mass and density both in the metaphysis and the diaphysis of the examined tibiae compared with control treated animals. In addition, improved structural properties of bone mechanical strength were noted in MPMBP-treated animals. Bone labeling with tetracycline and calcein indicated that MPMBP treatment of OVX osteoporotic models decreased the longitudinal growth of the primary spongiosa, yet stimulated cortical bone formation in the diaphysis compared with controls. The administration of MPMBP increased type I collagen accumulation in the primary spongiosa and decreased both the number of bone marrow adipocytes and cathepsin K-positive osteoclasts in OVX rats. In conclusion, we suggest that MPMBP may act to stimulate bone formation and inhibit both bone resorption and bone marrow adipogenesis to provide a net increase in bone mass in cases of estrogen-deficiency induced bone loss.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-106 ATP ならびに *Porphyromonas gingivalis*（Pg）局所注入により惹起されるミクログリア突起の集積とその日内変化に関する生体イメージング解析

○高山扶美子[1,2]，林　　良憲[1]，武　　洲[1]，中西　　博[1]

[1]九大　院歯　口腔機能分子
[2]日本学術振興会特別研究員（DC2）

【目的】ミクログリアは時計遺伝子 PER の転写調節によるオートフィードバックループを主軸とした分子時計をもつことが明らかとなり（林　他，Sci Rep 2013），ミクログリア機能の日内変化の解明は健全な脳機能ならびに感染時の脳病態を理解するうえで重要となっている．私たちはミクログリア分子時計の支配下にあるミクログリア特異分子 P2Y12 受容体ならびにカテプシン S（CatS）がミクログリアの突起構造，シナプス密度ならびにシナプス活動性の日内変化に関与することを報告してきた．ミクログリアは P2Y12 受容体を介して ATP の局所注入部位に向かって突起を一斉に伸展することが知られており，この現象は ATP を放出するシナプス部位との接触を介したミクログリア突起によるシナプス機能の調節に関わっているものと考えられる．そこで今回は高速多光子共焦点レーザー顕微鏡を用い，ATP 局所注入によるミクログリア突起の集積の日内変化について検討した．【結果】CX3CR1+/GFP マウス大脳皮質体性感覚野への ATP 局所注入を行った．その結果，ミクログリア突起の集積に日内変化が認められ，夜間（ZT14）の方が昼間（ZT2）よりもミクログリア突起の集積が有意に多いことが明らかとなった．ATP 局所注入によるミクログリア突起の集積は P2Y12 受容体阻害剤 PSB あるいは CatS 阻害剤 Z-FL-COCHO で有意に抑制された．また非常に興味深いことに Pg 菌（ATCC33277 株，長崎大学　門脇知子先生より供与）の局所注入によってもミクログリア突起の集積が認められた．一方，Pg 菌由来の LPS 局所注入では変化は認められなかった．【結論】P2Y12 受容体ならびに CatS の発現は ZT14 の方が ZT2 よりも有意に高いことから，ミクログリアはこれらの 2 つの分子を用い特に夜間に活動性の高いシナプス部位に突起を伸展することが示唆される．現在，Pg 菌局所注入によるミクログリア突起の集積メカニズムならびにこの現象の日内変化について解析している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## In vivo imaging analyses for the diurnal variation of microglial process accumulation following microinjection of ATP and *Porphyromonas gingivalis*（Pg）

○Takayama F[1,2], Hayashi Y[1], Wu Z[1], Nakanishi H[1]

[1]Dept Aging Sci and Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]JSPS Research Fellowship for Young Scientist（DC2）

［Purpose］We have provided that microglial intrinsic molecular clock regulates the diurnal variations of microglial morphology, dendritic spines and synaptic activities of cortical neurons using clock-regulated microglia-specific molecules in the brain, P2Y12 and cathepsin S（CatS）.（Hayashi et al., Sci Rep, 2013）. It is known that microglia extend their processes towards the injection site of ATP through P2Y12 receptors. Therefore, we examined a possible diurnal variation of microglial response following a microinjection of ATP to the brain from CX3CR1+/GFP mice by in vivo imaging.［Results］Microglia accumulated to the site of ATP injection at both ZT2 and ZT14. However, the response was significantly larger at ZT14 than ZT2. After the application of a P2Y12 receptor inhibitor PSB or a CatS inhibitor Z-FL-COCHO, the responses were significantly reduced at both times. Interestingly, the microglial response was also observed by Pg（ATCC33277, kindly provided from Dr. Tomoko Kadowaki, Nagasaki Univ.）.［Conclusion］Considering that the microglial molecular clock drives the expression of P2Y12 and CatS with peak at ZT14, microglia extend their processes toward highly active synaptic sites utilizing P2Y12 and CatS, especially at the dark phase. Experiments attempted to clarify the mechanism underlying Pg-induced extension of microglial processes are now in progress.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-107 慢性ストレスは，雌マウスの海馬 GABA 脱抑制を伴った行動異常を起こす

○塚原　飛央，増原　正明，佐藤　友昭

鹿児島大　院医歯　応用薬理

海馬における，GABA 神経機構の異常がストレス脆弱性精神疾患に関与するという報告は多数ある．しかし，GABA が抑制性に機能するために，必須である細胞内 $Cl^-$（$[Cl^+]i$）を低く保つ $K^+/Cl^-$ 共輸送体（KCC2）と逆に $[Cl^-]i$ 高めて GABA の抑制機能を低下させる $Na^+/K^+/Cl^-$ 共輸送体（NKCC1）に関する報告は少ない．また，舌痛症を含む不定愁訴，気分障害など多くの精神疾患が女性に多いにも関わらず，雌性動物に関する報告は皆無である．本研究では，21 日間 1 日 1 回胃管チューブによる水 10 μl/g の強制経口投与ストレスが雌性マウスの行動および GABA 神経伝達物質，KCC2 と NKCC1 の海馬での発現に与える影響を解析した．結果，ストレス負荷により高架十字迷路試験，新規物質探索試験において，それぞれコントロール群に対して，不安感の減少の指標となるオープンアーム滞在時間と探索時間の増加を認めた．しかし，オープンフィールド試験では，注意力の指標となる rearing の回数が減少し，認知試験，社会行動試験においても有意に成績が下がった．また，ストレス負荷により，コントロール群と比較して KCC2 は減少し，NKCC1 の内在化は減少した．これは，繰返し強制経口投与ストレスが海馬の KCC2 と NKCC1 の発現，局在変化を引き起こし，GABA の抑制機能低下による注意力，認知機能，社会行動性を低下させたことが示唆される．本研究は，海馬での KCC2, NKCC1 の総発現量だけでなく膜発現，内在化が，ストレスによる神経疾患と関連することを示唆した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Repeated forced water administration stress on female mice behavior disorders associated with GABAergic dysfunction

○Tsukahara T，Masuhara M，Sato T

Dept Appl Pharm, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

Despite of accumulating evidence that GABAergic dysfunction and stress are major pathology factors in psychiatry disorders, the relations between chronic stress, $K^+/Cl^-$ cotransporter（KCC2）and $Na^+/K^+/Cl^-$（NKCC1）are poorly understood in hippocampus. KCC2 maintains low intracellular $Cl^-$ concentration $Cl^-$（$[Cl^+]i$), whereas, NKCC1 increases $[Cl^-]i$ and favor rather excitatory response in GABAA-R activation. Therefore, the balance of KCC2 and NKCC1 are important for GABAergic inhibitory signal. Thus, to investigate relation between the effect of chronic stress and the $Cl^-$ transporter expression in female hippocampus, female mice were provided repeatedly forced water administration stress（RS), evaluated performances or GABAergic signal molecules by several behavior tests or immunohistochemistry study, respectively. RS induced cognitive an sociability deficits, while RS increased the time spent in the open arms in the elevated plus maze test, suggesting augmentation of anxiolytic effect. In addition, RS showed negative effect in cognition and awareness in other tests, suggesting reduction of awareness. RS decreased active KCC2 and increased active NKCC1 expression in the hippocampus. This might contribute to GABAergic disinhibition, associated with cognition impair and social behavior, while reduced attention. Therefore, we propose KCC2 and NKCC1 expression and localization as a key relying factor in stress induced behavior disorders.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-108 ケモカイン CXCL14 の発現がセツキシマブ（抗上皮増殖因子受容体抗体）の腫瘍抑制活性を決定する

○生駒　丈晴[1,2]，小澤　重幸[1,2]，鈴木　健司[1]，岩渕　博史[1]，陽　　暁艶[2,3]，宮本　千央[2,3]，前畑洋次郎[2,3]，畑　隆一郎[2,3]

[1]神奈川歯科大　顎顔面外科
[2]神奈川歯科大　院歯　口腔難治疾患研究センター
[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学

［背景］上皮増殖因子受容体（EGFR）を標的分子とするセツキシマブ（ヒト-マウスキメラ化モノクローナル抗体）は，現在，大腸癌や頭頸部癌の治療に用いられており，良好な結果を得ている．しかし，セツキシマブが治療効果を示す機構は明らかではない．今回我々は，抗腫瘍性ケモカインである CXCL14 の発現の有無がセツキシマブの抗腫瘍効果に関与するかどうかを検討するため，セツキシマブが抗腫瘍効果を示す HSC-3 細胞と，効果を示さない YCU-H891 細胞を用いて実験を行った．［方法と結果］HSC-3 細胞ではセツキシマブによって CXCL14 の遺伝子発現の上昇が確認されたが，YCU-H891 細胞においては CXCL14 の発現は検出できなかった．YCU-H891 細胞の CXCL14 の発現消失の原因として，CXCL14 のプロモーター領域のメチル化が考えられたため，パイロシークエンスやメチル化特異的 PCR で検討したところ，HSC-3 細胞ではプロモーターはメチル化していなかったが，YCU-H891 細胞ではメチル化していることが確認された．さらに，in vivo の実験系を用いて YCU-H891 細胞に脱メチル化剤であるアザデオキシシチジン（デシタビン）をセツキシマブと併用投与し，セツキシマブの抗腫瘍効果を確認したところ，CXCL14 の遺伝子発現の回復に伴い，セツキシマブは抗腫瘍効果を示すようになった．また，CXCL14 の発現ベクターを導入した YCU-H891 細胞を用いて，CXCL14 が YCU-H891 細胞に対して抗腫瘍効果を示すかどうか確認したところ，CXCL14 を YCU-H891 細胞に強制発現させると，YCU-H891 細胞の腫瘍増殖能は抑制された．［結論］本研究結果から，CXCL14 の発現の有無がセツキシマブの腫瘍抑制効果を決めており，CXCL14 のプロモーターがメチル化している腫瘍では，セツキシマブと脱メチル化剤の併用療法が有用であると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression

○Ikoma T[1,2], Ozawa S[1,2], Suzuki K[1], Iwabuchi H[1], Yang X[2,3], Miyamoto C[2,3], Maehata Y[2,3], Hata R[2,3]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ
[2]Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ
[3]Dept Oral Sci, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ

［Purpose］Cetuximab, a monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, has been successfully applied in some patients with colorectal cancer and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). For effective treatment, it is essential to first identify Cetuximab-responsive patients.［Methods and Results］When we compared the expression of chemokine CXCL14 in HNSCC cells, both Cetuximab responsive HSC-3 and non-responsive YCU-H891 cells, we found expression of this chemokine only in the responsive HSC-3 cells. We also found that the promoter region of YCU-H891 cells were hyper methylated, and demethylation of this promoter recovered CXCL14 mRNA expression together with in vivo tumour-growth suppression by Cetuximab. Additionally, YCU-H891 cells were engineered to express CXCL14 in the presence of doxycycline in mice. Cetuximab-dependent tumour suppression was observed in vivo by doxycycline administration in the drinking water of the mice.［Conclusion］These results indicate that CXCL14 expression would be a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-109 ビタミンDによる分化誘導時の歯原性上皮細胞における$Ca^{2+}$応答の発生機序

○村田　佳織[1]，倉重　圭史[1]，森田　貴雄[2]，高橋亜友美[1]，齊藤　正人[1]，谷村　明彦[2]

[1]北医療大　歯　小児歯科
[2]北医療大　歯　薬理

【目的】近年，Stim，Orai，TRIPなどのカルシウム（$Ca^{2+}$）流入に関与する分子が同定され，それらの異常によって骨形成やエナメル質形成の不全が起こることが報告されている．このことから，$Ca^{2+}$応答がエナメル芽細胞の分化誘導において重要な働きを担っている可能性が考えられる．本研究は活性型ビタミンD3（VD3）による歯原性上皮細胞（SF2細胞）の分化誘導における$Ca^{2+}$応答とその役割について明らかにすることを目的とした．
【方法】$Ca^{2+}$センサーであるG-GECOをアデノウイルスベクターを用いてSF2細胞に導入し，37℃，5% $CO_2$条件の培養下で共焦点レーザー顕微鏡を用いて長時間ライブセルイメージング観察した．また，細胞分化の指標としてameloblastin（AMBN）の免疫組織化学染色と，アリザリンレッドS染色とALP assayによる石灰化能の解析を行った．
【結果と考察】VD3はSF2細胞の増殖能を低下させ，AMBNの発現増加，石灰化の亢進，アルカリフォスファターゼの酵素活性の増加を起こした．さらにG-GECOを使った長時間ライブセルイメージングによって，培養条件下のSF2細胞において間欠的で自発的な$Ca^{2+}$濃度上昇が認められ，その頻度はVD3刺激で増加することが明らかになった．この$Ca^{2+}$応答は非特異的$Ca^{2+}$流入阻害剤（$CdCl_2$）で完全には阻害されなかった．このことから小胞体からの$Ca^{2+}$放出の関与の可能性が考えられた．また，$IP_3$受容体阻害剤（50 $\mu$M 2-APB），PLC阻害薬（U73122），プリン受容体阻害薬（PPADS）やmGluR阻害薬（LY341495）存在下で$Ca^{2+}$応答は抑制されたことから，これらのGタンパク質共役受容体の関与が示唆された．今後，VD3によるSF2細胞の分化誘導と$Ca^{2+}$応答の関連性について明らかにする．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanism of the spontaneous calcium responses in the vitamin D-induced differentiation of dental epithelial cells

○Murata K[1]，Kurashige Y[1]，Morita T[2]，Takahashi A[1]，Saitoh M[1]，Tanimura A[2]

[1]Dept Pediatric Dent, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido
[2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Objectives: Deficiency of Stim1 and Orai1, essential molecules for the store-operated calcium entry, and some types of TRP channels causes osteogenesis imperfecta or amelogenesis imperfecta. These findings suggest important roles of $Ca^{2+}$ responses in ameloblastic differentiation. We examined the mechanisms and functions of $Ca^{2+}$ responses during the VD3-induced differentiation of SF2 cells.
Methods: $Ca^{2+}$ indicator, G-GECO, was expressed using an adenoviral vector, and fluorescence images were captured with confocal laser scanning microscopy for 4-15 hr in the normal culture condition. Cell differentiations were examined with immunocytochemistry, Alizarin red S staining, and ALP assay.
Results: VD3 decreased cell proliferation, and increased the expression of ameloblastin and the calcification of SF2 cells. The $Ca^{2+}$ imaging revealed intermittent rises in intracellular $Ca^{2+}$ concentration in cultured SF2 cells. VD3 increased the frequency this spontaneous $Ca^{2+}$ responses. The nonselective $Ca^{2+}$ channel blocker, $CdCl_2$ failed to block the VD3-induced $Ca^{2+}$ responses, whereas the $IP_3R$ inhibitor, 2-APB, PLC inhibitor, U73122, purinegic antagonist, PPADS, and mGluR inhibitor, LY341495 suppressed these $Ca^{2+}$ responses.
Conclusions: Increase in spontaneous $Ca^{2+}$ responses were observed during the VD3- induced differentiation of SF2 cells. Our results suggest that these $Ca^{2+}$ responses are primarily induced by $Ca^{2+}$ releases from intracellular stores through G-protein coupled receptors.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-110 アムホテリシン B 含有バブルリポソーム製剤と超音波併用によるカンジダ発育阻止効果について

○山本　雅史[1]，沖永　敏則[1]，岩永賢二郎[2]，有吉　　渉[1]，西原　達次[1]

[1]九歯大　院　感染分子
[2]九歯大　顎顔面外科

【目的】アムホテリシン B は，真菌細胞膜のエルゴステロールと結合し膜に小孔を形成することで，殺菌作用を示す．近年，リン脂質二重膜構造のリポソーム内にパーフルオロプロパンガスを封入したリポソーム型微小気泡（バブルリポソーム）に超音波を照射することで，内包された薬剤の導入効率が向上することが報告されている．そこで今回の研究では，アムホテリシン B のバブルリポソーム製剤と，超音波を併用することにより，低濃度で効果的なドラッグデリバリーシステムを開発することを試みた．【方法】真菌株として *Candida albicans* ATCC18804 を用いた．抗真菌薬として，アムホテリシン B をリン脂質二重膜内に封入したリポソーム製剤のアムビゾームを使用した．アムビゾームにパーフルオロプロパンガスを封入し，バブルアムビゾームを作製した．バブルアムビゾームのみ，超音波処理，バブルアムビゾームと超音波併用の 3 群にて，吸光度，colony forming unit（CFU）を計測し，*C. albicans* の増殖能を評価した．さらに YM 寒天培地においてコロニーの直径を計測し，それぞれの発育阻止効果を評価した．【結果】アムホテリシン B 含有バブルリポソーム製剤と超音波を併用させ，*C. albicans* に作用させる実験系の確立に成功した．そこで得られた最適条件で超音波照射を試みたところ，バブルアムビゾームおよび超音波を併用した群において，より低薬剤濃度で著明な発育阻止効果が確認された．【考察】*In vitro* において，今回作成したバブルアムビゾームと超音波を併用することにより，真菌に対する効率的なドラッグデリバリーシステムを構築できる可能性が示唆された．今後，動物実験において同様の効果が得られるかを確認する予定である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Growth inhibition of *Candida albicans* by combination bubble liposomes and amphotericin B together with ultrasonication

○Yamamoto M[1]，Okinaga T[1]，Iwanaga K[2]，Ariyoshi W[1]，Nishihara T[1]

[1]Div Infections and Molecular Biol, Kyushu Dent Univ
[2]Div Oral and Maxillofacial Surg, Kyushu Dent Univ

Objective: We reported that ultrasound-mediated destruction of microbubbles has been proposed as an innovative non-invasive drug delivery system. AmBisome is a single bilayer liposomal drug delivery system and consists of these unilamellar bilayer liposomes with amphotericin B intercalated within the membrane. In the present study, we developed a novel fungicidally drug delivery system using ultrasound and bubble liposomes. Methods: Candida albicans ATCC18804 was used in this study. We used bubble liposomal amphotericin B by enclosing the perfluoropropane gas to AmBisome. We detected the growth inhibition of *C. albicans* by measuring optical density（OD）, counting the number of colony forming unit（CFU）and measuring the colony diameters. Result: We found that the treatment of bubble liposomal amphotericin B and ultrasound have more significant reduction to the turbidity, CFU and diameter of colonies of *C. albicans*, compaired with ultrasound-treated group and bubble liposome group. Conclusion: These results represented that the treatment of bubble liposomal amphotericin B efficiently inhibited the growth of *C. albicans* together with ultrasound, suggesting that this novel approach may play a beneficial role as a method for the treatment of oral candida disease.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-111 オピオイド受容体による無顆粒島皮質におけるシナプス伝達修飾作用の解明

○横田　英子[1]，越川　憲明[2]，小林　真之[2]

[1]日本大　歯　麻酔
[2]日本大　歯　薬理

【目的】代表的な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネは，高次痛覚中枢である無顆粒島皮質（AI）において，オピオイド受容体を介して下行性抑制を賦活化し，鎮痛作用を発揮することが報告されている．しかし，そのシナプスレベルでのメカニズムは不明である．本研究は，AI から同時ホールセル記録を行い，オピオイド受容体サブタイプ別によるシナプス伝達修飾作用について検討した．さらに光学計測法を用いて AI の応答性について *in vivo* 標本で検討した．
【方法】ラット脳スライス標本を作製し，AI の錐体細胞（Pyr）および抑制性介在ニューロンである fast-spiking 細胞（FS）から同時ホールセル記録を行った．単一抑制性シナプス後電流（uIPSC）に対するオピオイド受容体サブタイプの作用を FS → Pyr と FS → FS シナプスで検討した．また，歯髄刺激によって誘発される AI の神経活動に対する上記受容体の作用を光学的に記録した．
【結果と考察】同時ホールセル記録では，$\mu$ 受容体アゴニストである DAMGO（1 $\mu$M）灌流投与により，FS → FS で uIPSC の振幅が減少し，FS → Pyr では有意な変化は見られなかった．一方，$\delta$ 受容体アゴニストである DPDPE（1 $\mu$M）により，uIPSC の振幅は FS → Pyr および FS → FS いずれにおいても減少した．$\kappa$ 受容体アゴニストである U50488（1 $\mu$M）は，uIPSC の振幅を変化させなかった．次に，光学計測法では，DAMGO は興奮伝播を抑制し，DPDPE は興奮伝播を増大させた．以上の結果からオピオイド受容体は，受容体サブタイプおよびシナプスを形成する細胞の種類により抑制性シナプス伝達修飾作用が異なることが明らかとなった．さらに $\mu$ 受容体は，抑制性シナプス伝達において，Pyr よりも FS に対する uIPSC を選択的に抑制する事で脱抑制を抑制し，AI からの出力を抑制して下行性抑制を賦活化している可能性が示唆された．
共同研究者；小柳　裕子，大井　良之（日本大学歯学部歯科麻酔学講座）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Opioidergic effects on synaptic transmission in rat insular cortex

○Yokota E[1]，Koshikawa N[2]，Kobayashi M[2]

[1]Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent

The insular cortex（IC）plays a key role in modulation of nociception, and the major analgesics such as morphine are thought to produce analgesic effects through opioid receptors in IC. There are three major subtypes of opioid receptors: mu, delta, and kappa receptors, however, it is still unknown how these receptor subtypes modulate synaptic transmission in IC. We performed paired whole-cell patch-clamp recordings from fast-spiking interneurons（FS）and pyramidal cells（Pyr）of rat IC, and examined the effects of selective agonists of opioid receptors on unitary inhibitory postsynaptic currents（uIPSCs）. In addition, we performed in vivo optical imaging, and measured the amplitude and area of cortical excitation responding to electrical stimulation of the dental pulps in rats. DAMGO, a selective mu opioid receptor agonist, suppressed the amplitude of uIPSCs in FS-FS synaptic connection but not in FS-Pyr, whereas DPDPE, a selective delta opioid receptor agonist, suppressed uIPSCs in both connections. Optical imaging study revealed that DAMGO suppressed dental pulp stimulation-induced excitatory propagation in IC, but DPDPE facilitated the excitation. These results suggest that opioid receptors differentially regulate synaptic transmission in IC depending on their subtypes. Mu opioid receptor may activate the descending inhibition by suppressing disinhibition in IC.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-112 歯周病とアルツハイマー（AD）（1）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS によるマクロファジー活性化と脳髄膜を介した末梢炎症シグナルの脳内伝達とミクログリア活性化

○劉　訳聡，武　洲，中西　博

九大　院歯　口腔機能

## A possible role of leptomeninges for transduction of systemic inflammatory signals to microglia in response to lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*

○Liu Y，Wu Z，Nakanishi H

Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Purpose: We have attempted to clarify the pathways that transduce inflammatory signals from the periphery during periodontitis to the brain. In this study, we examined whether diffusible factors secreted by gingival macrophages during periodontitis can communicate with the brain-resident microglia through the leptomenings covering the surface of the brain parenchyma. Materials Method: The gingival tissues were prepared from the chronic periodontitis patients. The amounts of proinflammatory cytokines secreted in the culture medium, including tumor necrosis factor（TNF）-alpha and interleukin（IL）-1beta were measured in RAW264.7 macrophages, primary leptomeningal cells and MG6 microglia cells. Results: The expression of Toll-like receptor 2（TLR2）, TLR4, TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase were mainly detected in the gingival macrophages of the chronic periodontitis patients. To examine the roles of diffusible factors secreted by macrophages can stimulate leptomeningeal cells, primary cultured leptomeningeal cells were incubated with the conditioned medium from lipopolyssacharide from Porphyromonas gingivalis（LPS-PG）-stimulated RAW264.7 macrophages. The conditioned medium from LPS-PG-stimulated RAW264.7 macrophages induced secretion of proinflammatory cytokines by the primary cultured leptomeningeal cells, including TNF-alpha and IL-1beta. Furthermore, the conditioned medium from LPS-PG-stimulated leptomeningeal cells in turn induced the secretion of proinflammatory cytokines by MG6 microglia, including TNF-alpha. Conclusion: These observations suggest that leptomeningeal cells serve the redundant pathway that transduce inflammatory signals from the peripheral macrophages to the brain-resident microglia, provoking neuroinflammation during periodontitis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-113 歯周病とアルツハイマー病（AD）（2）：*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS の慢性的末梢投与によって誘発される AD 様フェノタイプにおけるカテプシン B の役割

○倪　軍軍，武　洲，中西　博

九大　院歯　口腔機能

## Critical roles of cathepsin B in AD-like phenotypes following chronic systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*

○Ni J，Wu Z，Nakanishi H

Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Purpose: We have attempted to clarify the exacerbating effects of periodontitis on AD pathologies. In this study, we examined effects of systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*（LPS-PG）on AD-like phenotypes, including amyoid beta（Abeta）accumulation, microglial activation and cognitive impairment. Furthermore, critical roles of cathepsin B（CatB）, a typical lysosomal cysteine protease, in LPS-PG-induced AD-like phenotypes, because CatB can work as a key enzyme necessary for the IL-1beta production by microglia and a beta-secretase for production of Abeta in the regulated secretory pathway of neurons. Materials & Methods: Young（2 month-old）and middle-aged（12 month-old）female wild-type and CatB-/- mice were subjected to a consecutive systemic treatment with LPS-PG for five weeks. Results: Systemic treatment with LPS-PG for five consecutive weeks induced Abeta accumulation and microglial activation evidenced by increased interleukin（IL）-1beta expression in the hippocampus of middle-aged wild-type mice, but not in middle-aged CatB-/- mice. Furthermore, chronic systemic treatment with LPS-PG significantly impaired learning and memory ability evaluated using a step-through passive avoidance test in middle-aged wild-type mice, but not in either young wild-type or middle-aged CatB-/- mice. Next, a possible connection between the Abeta accumulation and microglial activation was examined in in vitro studies. The mean expression levels of amyloid precursor protein and CatB were significantly increased in primary cultured hippocampal neurons in a CatB-dependent manner after treatment with the conditioned medium from LPS-PG-stimulated microglia, but not by LPS-PG. Conclusion: Chronic systemic treatment with LPS-PG can induce AD-like phenotypes, including Abeta accumulation, microglial activation and cognitive impairment in middle-aged mice in a CatB-dependent manner.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P1-114　酪酸ナトリウムの抗うつ効果に関連するミクログリアの遺伝子発現解析

○山脇　洋輔，兼松　　隆

広島大　院医歯薬保　細胞分子薬理

【背景】うつ病の発症には遺伝的要因のみならずヒストンアセチル化やDNAメチル化などのエピジェネティクスな遺伝子発現調節が関与している．我々はこれまでに，ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACi)が海馬における遺伝子発現変化を伴って抗うつ効果を示すことを報告した．一方，動物モデルにおいて，慢性ストレスによる脳内炎症性サイトカインの上昇や，ミクログリア活性化が引き起こされるなど，脳内における炎症反応がうつ病の病態に関与していることが明らかとなってきた．本研究では，ミクログリアに着目したHDACiの抗うつ効果の機序解明を目的として検討を行った．【方法】7週齢のC57BL/6マウスにLPSを腹腔内投与し，翌日から7日間，HDACiであるsodium butyrate(SB)を投与した．SB投与後，強制水泳試験を行った．ミクログリアの活性化はそのマーカーであるIba-1 mRNAの発現量を測定することで評価した.【結果・考察】LPS（5 mg/kg)の腹腔内投与7日後，海馬ミクログリアは活性化状態を維持していた．また，ミクログリア活性化時のマウスにおいて，行動量に変化はない一方で，強制水泳試験における無動時間の延長を観察した．SBの投与はマウスの海馬において，LPSによって発現が上昇したIba-1 mRNAの発現および，延長した強制水泳試験における無動時間を減少させた．次いで，LPSおよびSBを投与したマウス海馬から単離したミクログリアから得たRNAをもとにcDNAマイクロアレー解析を行った結果，LPS処置後のSB投与によって発現増加する238個の遺伝子と，発現低下する280個の遺伝子が明らかとなった．これらの中には，マクロファージの機能に関連するものや，抗うつ薬の作用に関する報告がなされている分子などが含まれていた．本研究において，慢性的なミクログリアの活性化がうつ病の病態に関与していることを示すとともに，HDAC阻害薬による抗うつ効果が海馬ミクログリアの活性化の抑制による可能性を示している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Gene expression analyses in microglia related in antidepressant-like effect of sodium butyrate

○Yamawaki Y，Kanematsu T

Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Neuro-inflammation is involved in a pathophysiology of major depressive disorder. Chronic stress significantly increased pro-inflammatory cytokines and activates microglia in the rodent brain. Thus, microglia plays a key role in brain immune system. Previously, we reported that histone deacetylase inhibitors（HDACi）act as an antidepressant-like effect mediated by changing of gene expression in the hippocampus. However, the detailed mechanisms of HDACi remain unclear. To elucidate the pharmacological actions of HDACi in antidepressant-like effects, we investigated whether HDACi inhibits activated microglia and depressive state induced by chronic neuro-inflammation. C57BL/6 mice were subjected to intraperitoneal（IP）injection of LPS. The mouse hippocampal microglia were activated over one week, which was determined by Iba-1 mRNA expression. One week after the injection, mice showed the increase of immobility time in forced swim test（FST）without changing locomotor activities. Interestingly, repeated treatment with sodium butyrate, an HDACi, reduced the immobility time in the FST and inhibited microglial activation in the hippocampus. Furthermore, cDNA microarray in microglia obtained from the hippocampus treated with LPS/SB showed some candidate genes related in functions of brain and effect of antidepressant. These results suggest that the antidepressant-like effect of HDACi is due to inhibition of microglial activation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-1　細胞誕生の時期と孤束核および傍腕核における分布部位との関係

○諏訪部　武，安尾　敏明，硲　　哲崇

朝日大　歯　生理

【緒言】胎生期の不良な栄養状態により，生まれてきた仔ラットに味覚障害が生じることが報告されていることから，胎生期は味覚にとって重要な時期であると考えられる．味覚伝導路の一次中継核である孤束核を構成する細胞は胎生 11 日目～14 日目の間に誕生することが報告されている．本研究では，この時期の孤束（孤束核に投射する求心性神経線維束）の成長と誕生した細胞の移動との関係，および細胞誕生の時期と孤束核における分布部位との関係を調べた．【材料と方法】交配日確認妊娠ラットにチミジン類似体を胎生 11 日目～14 日目のいずれかの日に 1 回のみ腹腔内投与した．生まれてきた仔の脳をパラホルムアルデヒドで固定し，脳幹のスライス標本を作製した．EdU 陽性細胞を蛍光色素で標識した後，共焦点レーザー走査型顕微鏡で孤束核の各亜核を撮影した後，取得した画像上で EdU 陽性細胞の数をカウントし，各亜核の EdU 陽性細胞の割合を算出した．【結果と考察】胎生 11 日目～14 日目の間に孤束から孤束核の方向へ神経線維の伸長が進み，また誕生した細胞が細胞誕生の場所から孤束・孤束核の方向へ移動を開始することが明らかになり，この時期が孤束核における神経回路の初期形成に重要な時期であることが示唆された．移動した細胞は孤束核を形成するが，細胞誕生の時期によって孤束核における分布部位が異なることが明らかになった．また傍腕核においても同様に細胞誕生の時期によって分布部位が異なることが明らかとなり，細胞誕生の時期が孤束核および傍腕核における分布部位を決定している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Correlation between timing of cytogenesis and cellular distribution in the nucleus of the solitary tract and parabrachial nucleus in rat

○Suwabe T，Yasuo T，Sako N

Dept Oral Physiol, Sch Dent, Asahi Univ

The nucleus of the solitary tract（NST）and the parabrachial nucleus（PBN）are the first and second central relay in the ascending gustatory pathway, respectively. Cells constructing the NST and PBN are generated in the period between embryonic day（E）11 thru E14. This study shows that E11- and E12-generated cells are differentially distributed in the NST and PBN. In these nuclei, the percentage of E11-generated cells becomes high in the region reported to be responsive to mechanical stimuli to the oral cavity, whereas there are many E12-generated cells in the region known to be responsive to taste stimuli. This result indicates the possibility that cell distribution and function in the NST and PBN are determined by the timing of the cytogenesis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-2　ライオン糸状乳頭の微細血管構築について

○竹村　明道，戸田　伊紀，上村　　守，川島　　渉

大阪歯大　解剖

目的:ライオンの糸状乳頭について，微細血管構築(以下 MVA)に関する報告は無い．演者らは，ライオン 2 頭の舌にアクリル樹脂を注入して微細血管鋳型標本を作製し，走査電顕を用いて糸状乳頭の MVA を観察した．観察にあたっては舌背を便宜上 4 等分し，それぞれの舌縁部と中央部を観察した．結果:MVA の基本構造は，1 個の毛細血管叢(以下 P)と複数のヘアピン型毛細血管ループ(以下 CLs)で構成されていた．P は，最も咽頭側に位置し，咽頭側に傾斜し，どの CL よりも大きかった．1. 舌尖部　1) 舌尖部舌縁部 MVA は，1 個の P と 6〜10 個の CLs で構成されていた．2) 舌尖部中央部 MVA は，1 個の巨大な円柱状の P と 24〜30 個の CLs で構成されていた．2. 前部 1)前部舌縁部 1 個の円錐状の P と 6〜10 個の CLs(で構成されていた．2)前部中央部 1 個の円錐状の P と 16〜24 個の CLs で構成されていた. 3. 中部 1) 中部舌縁部 1 個の円錐状の P と 12〜18 個の CLs で構成されていた．2) 中部中央部 1 個の円錐状の P と 16〜20 個の CLs で構成されていた．4. 後部 1)　後部舌縁部 1 個の円錐状の P と 18〜22 個の CLs で構成されていた．2)　後部正中部　1 個の円錐状の P と 18〜22 個の CLs で構成されていた．まとめ：疋田ら(2015)は，ネコ上皮乳頭の形態を環状円錐，複円錐，複円柱，単円柱，単円錐糸状乳頭の 5 型に分類し，上皮乳頭の形態と MVA の形態を比較していた．ライオンの舌尖部舌縁部ならびに前部舌縁部の MVA は，ネコにみられた環状円錐糸状乳頭上皮下にみられた MVA と類似し，ライオンの舌尖部正中部の MVA は，ネコにみられた単円柱糸状乳頭上皮下にみられた MVA と類似し，ライオンの中部，後部の MVA は，ネコにみられた単円錐糸状乳頭上皮下にみられた MVA と類似していた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Microvascular architecture of the lion filiform papillae

○Takemura A，Toda I，Uemura M，Kawashima W

Dept Anat, Osaka Dent Univ

OBJECTS There have been no reports regarding the microvascular architecture（MVA）of lion filiform papillae（FP）. We used a scanning electron microscope to observe MVA of the FP in two lion tongue. RESULTS The basic morphology of the MVA was composed of a capillary plexus（P）and multiple capillary loops（CLs）. Lingual apex regionMarginal portion: a single conical P and 6 − 10 CLs. Central portion: a single giant columnar P and 24 − 30 CLs. Anterior regionMarginal portion: a single conical P and 6 − 10 CLs. Central portion: a single conical P and 16 − 24 CLs. Middle regionBoth portions: a single conical P and 12 − 20 CLs. Posterior regionBoth portions: a single conical P and 18 − 22 CLs. CONCLUSION MVA of marginal portion of the lingual apex and anterior regions in the lion were similar to MVA existing under the circular conical FP in the cat. MVA of central portion of the lingual apex region in the lion was similar to MVA of the cat's simple columnar FP. MVA of middle and posterior regions in the lion were similar to MVA of the cat's simple conical FP.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-3　口唇の老化における組織化学的研究

○奈良　倫之，北村　　啓，山内　真人，山本　将仁，阿部　伸一

東歯大　院　解剖

【目的】近年，組織化学的研究において，老化とともに口唇内を走行する口輪筋の筋線維が萎縮し，その代わりに脂肪ならびに線維性の組織が増加することが分かってきた．しかしながら，残存歯数ならびに下顎骨の吸収と口唇老化の関係をみた報告はなく不明な点が残されている．そこで今回は，高齢者献体を用いて，マクロとミクロの両面から観察することにより，残存歯数及び下顎前歯部における下顎底-歯槽頂間距離が口唇の形態に与える影響ついて検索を行った．【方法】試料として，80～98 歳の高齢者献体 5 体を用いた．献体より下唇を採取し，パラフィン包埋後，通法に従い連続切片を作製した．形態学的観察のために H-E 染色を，また口輪筋萎縮の個人差を評価する為にデスミン抗体による反応性を観察し，さらには口輪筋の長径と幅径を計測した．加えて，各献体の下顎前歯部における下顎底-歯槽頂間距離を計測した．【結果と考察】下顎無歯顎の献体 3 体において口輪筋は萎縮傾向にあり，筋線維が口唇内でまばらに観察できた．一方下顎に歯が残存している 2 体では口輪筋は萎縮しておらず，筋線維の集団が皮膚側と粘膜側のあいだに認められた．口輪筋の長径と幅径の計測では，両者ともに無歯顎に対して有歯顎のほうが優位に増加傾向を認めた．デスミン抗体の反応については有歯顎と無歯顎において差は認められなかった．下顎底-歯槽頂間距離の小さい下顎無歯顎の献体では口輪筋の萎縮が認められ，この差は優位なものであった．今回の研究結果により，歯牙の脱落は口輪筋全体の萎縮を助長する事が示唆された．また口輪筋の萎縮は垂直的・水平的に起こり，下顎底-歯槽頂間距離の小さい無歯顎の献体では萎縮が大きくなる事が示唆された．これらは歯牙の喪失により顎骨の吸収が起こった為，機能時に障害が起こり，口輪筋の萎縮が亢進する結果と考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histochemical study on aging of the lips

○Nara M，Kitamura K，Yamauchi M，Yamamoto M，Abe S

Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent

In the present study, we examined the effects of remaining teeth and distance from the mandibular base of the lower front teeth to the alveolar crest on lip shape by observing the macro and micro aspects of lip samples taken from elderly cadavers.

We observed lip morphology using H-E staining and desmin antibody reactivity. We also measured the length and width of the orbicularis oris, and the distance from the mandibular base of the lower front teeth to the alveolar crest.

The lip samples of the 3 lower edentulous cadavers exhibited atrophy in the orbicularis oris and thin strands of muscle fiber inside the lips. Measurements of the length and width of the orbicularis oris showed that dentate individuals had longer and wider muscles when compared with their edentulouus counterparts. Significantly more atrophy of the orbicularis oris was observed in the lower edentulous cadavers with a smaller distance between the mandibular base and alveolar crest. The research results suggested that tooth loss promoted atrophy of the entire orbicularis oris, We concluded that resorption of the jaw bone caused by tooth loss led to functional impairment that enhanced the atrophy of the orbicularis oris.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-4 ハイイロジネズミオポッサムにおける耳下腺および顎下腺の超微細構造学的検討

○河野　哲朗[1]，鈴木久仁博[2]，玉村　　亮[1]，菅野　岳志[1]，寒河江登志朗[1]，岡田　裕之[1]

[1]日大松戸歯　組織
[2]日大松戸歯　生物

【目的】有袋類は発達した胎盤を持たないため，新生児は非常に未熟な状態で出産される．このため消化腺である唾液腺の発達は有胎盤類とは異なることが予想される．ハイイロジネズミオポッサム（Monodelphis domestica）はゲノム解析の完了した有袋類であり，今後も様々なレベルで有胎盤類との比較がなされ，新しい知見が見出されることが期待される．そこで本研究では透過型電子顕微鏡を用いてハイイロジネズミオポッサムの耳下腺および顎下腺の超微細構造学的検討を行った．【方法】生後24ヶ月齢雄性ハイイロジネズミオポッサム3匹の両側耳下腺，および顎下腺を用いた．透過型電子顕微鏡観察では通法に従い超薄切片を作製し，酢酸ウラン-クエン酸鉛の二重染色を行った．【結果】耳下腺は漿液細胞のみで構成されており，腺房細胞内には電子密度が高い分泌顆粒を認めた．一方，顎下腺は漿液細胞と粘液細胞からなる混合腺であった．顎下腺の漿液細胞内の分泌顆粒は電子密度が均質なタイプ，2種類の二相構造を示すタイプおよび環状構造を示すタイプが存在した．細胞ごとに分泌顆粒のタイプや分布は異なっており，各タイプの分泌顆粒が混合する細胞も観察された．耳下腺の線条部導管は基底陥入がある上皮細胞だけであったが，顎下腺は基底陥入のある細胞とない細胞の両方が存在した．【考察】ハイイロジネズミオポッサム顎下腺の漿液細胞において特異的な分泌顆粒を認めた．これらは個々の細胞の性質の違いによるものでなく，顆粒の成熟過程によるものと考えられたが，他の哺乳類との系統発生や個体発生の差異による特徴である可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Ultrastructure of the parotid and submandibular glands in the short tailed opossum（Monodelphis domestica）

○Kono T[1]，Suzuki K[2]，Tamamura R[1]，Kanno T[1]，Sakae T[1]，Okada H[1]

[1]Dept Hist, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
[2]Dept Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

The salivary help keep the mouth and other parts of the digestive system moist. There had been only a few reports on the salivary glands of the gray short-tailed opossum（Monodelphis domestica）, one of the marsupials. The aim of this study was to reveal ultrastructure of the parotid and submandibular glands in the gray short-tailed opossum using transmission electron microscopy（TEM）. In TEM, the parotid glands consisted of the only serous acinar cells. These secretory granules were high electron density. The submandibular glands composed both of serous and mucous acinar cells, showing mixed glands. And, the submandibular glands possessed the special serous cells. Secretory granules were divided into homogeneous density type, two biphasic types and annulate form types. The properties of the granule were different in each cell. However, there were some cells that every type of granules were mixed. It seems that variety of granules in the special serous cells represent stages in the cell cycle not the property of the cell. Striated ducts of submandibular glands include both basal infolding epithelium and cells without invagination, although typical striated ducts are shown in parotid glands.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-5　マウス軟骨組織における MEPE の発現について

○藤川　芳織，守田　　剛，田巻　玉器，柴田　俊一

医科歯科大　院医歯　顎顔面解剖

〔目的〕我々はこれまでに，マウスの下顎頭軟骨における骨・軟骨基質タンパク質についての発現について検索してきた．SIBLING family の分子は石灰化において重要な働きを担うが，非石灰化組織にも存在することが知られている．MEPE は SIBLING family に属し，主に骨細胞に発現する．我々はこれまでに，ヒト，ラットおよびマウスを用いた免疫組織学的検索を行い，これらのメッケル軟骨で MEPE の陽性反応が検出されたことを報告している．しかし，マウス下顎頭軟骨における MEPE の発現は未だ明らかになっていない．そこで我々は，マウス下顎頭軟骨発生過程における MEPE の発現を肢芽軟骨と比較し，軟骨特有のマーカー分子と成りうるか否かを検討した．また，MEPE の比較対象として，軟骨形成に必須の分子である Perlecan と，SIBLING family の一つである DMP-1 の発現についても検索した．〔方法〕胎生 12.0-18.0 日齢（E12.0-18.0）のマウス下顎頭軟骨および脛骨軟骨，生後 3 週齢の気管軟骨を摘出し，切片を作成し，in situ hybridization，免疫組織化学で遺伝子発現とタンパクの局在を検索した．また Western immunoblotting により MEPE 分子の抗原特異性について検討した．〔結果〕E14.0-16.0 の下顎頭軟骨および E12.0-E14.0 の肢芽軟骨のいずれにおいても，in situ hybridization 法では MEPE mRNA は検出されなかった．一方，免疫染色では両軟骨で MEPE の陽性反応が認められた．この陽性反応の特異性を調べるために行った Western immunoblotting では，軟骨組織由来のサンプルから 55 kDa および 70 kDa の 2 つのバンドを検出した．〔考察〕以上の結果から免疫陽性反応は非特異的なものではないものの，軟骨における MEPE の mRNA 発現は in situ hybridization 法で検出出来ない程微量であり，タンパクの蓄積を検出したものであると推測された．従って，MEPE を軟骨のマーカー分子と位置づけることはできないと結論づけた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of MEPE in mouse cartilage

○Fujikawa K，Morita T，Tamaki T，Shibata S

Dept Maxillofacial Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

We have investigated expression patterns of bone or cartilage-related matrix components in mouse mandibular condylar cartilage. Expression of MEPE mRNA, however, during initial cartilage formation was not investigated in mouse condylar cartilage. Thus, the purpose of this study is to examine MEPE mRNA expression in the developing mandibular condylar cartilage, compared with the developing limb bud cartilage and to confirm whether MEPE is identified as a marker protein of cartilage. The heads and limbs were removed from ICR mice at E12.0-18.0 and the tracheal cartilage were removed from ICR mice at 3-week-old. These samples were prepared serial section and were used for in situ hybridization and immunohistochemistry. To confirm antigen specificity of MEPE, Western immunoblotting was used. MEPE mRNA was not detected in condylar cartilage at E14.0-16.0 and in tibial cartilage at E12.0-E14.0. MEPE immunoreactivity was, however, detected throughout cartilage matrix in condylar and tibial cartilage. MEPE antibody recognized two bands of ～ 70 kDa and ～55 kDa in cartilage-derived samples. It is conceivable that MEPE protein was gradually accumulated in the cartilage, although MEPE mRNA was not detected in chondrocyte due to fewer levels of expression. We cannot, however, place MEPE as a marker protein for cartilage.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-6　ヒアルロン酸は歯髄幹細胞を CD44 を介して象牙芽細胞様に分化させる

○梅村　直己，坂上　　宏

明海大　歯　薬理

歯髄細胞は多くの未分化間葉系細胞をを含み，様々な細胞に分化する能力があると言われている．近年，幾つかの研究者グループが歯髄由来 iPS の再生医療への転用を模索している．その一方，歯髄組織には石灰化誘導に重要と言われている CD44 が過剰発現している．そこで，我々は歯髄幹細胞において，CD44 のリガンドとして知られるヒアルロン酸の効果を調べた．その結果，ヒアルロン酸は DMP-1（dentin matrix protein-1）と DSPP（dentin sialophospho protein）を誘導していることが明らかとなり，そのシグナル伝達を解析した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Hyaluronan precipitates odontoblastic differentiation via CD44 in dental pulp stem cells

○Umemura N，Sakagami H

Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent

It's common knowledge that dental pulp tissues contain a lot of undifferentiated mesenchymal cells, and retain the ability to differentiate themselves into mature cells. Resent year, many research groups seek to develop iPS, and its application possibility dental pulp derived stem cells. Furthermore, dental pulp tissues overexpress cell-adhesion factor CD44 involved inducing mineralization. Therefore, We investigated the effect of hyaluronan that is known as CD44 ligand on dental pulp stem cells. As a result, hyaluronan induce both of DMP-1 and DSPP are known as maker of odontoblastic differentiation. Moreover, the odontoblastic differentiation by hyaluronan mediates not Akt signaling and smad signaling.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-7　タウ蛋白質は象牙芽細胞の最終分化マーカーである

○宮崎　敏博[1]，馬場　友巳[2]，小守　壽文[1]

[1]長崎大　院医歯薬　細胞生物
[2]長崎大　院医歯薬　口腔生化

【序論】我々は，骨芽細胞分化に必須の転写因子 Runx2 を *Col1a1* プロモーターを用いて象牙芽細胞特異的に発現させたトランスジェニック［*Tg(Col1a1-Runx2)*］マウスを用いた解析により，歯牙形成において Runx2 は象牙芽細胞への最終分化を抑制し，象牙芽細胞特有の突起形成が阻害されることを明らかにした（Miyazaki et al., 2008）．本研究の目的は，象牙芽細胞特有の突起形成メカニズムを解明することであり，今回我々は，野生型マウスと *Tg(Col1a1-Runx2)*マウス臼歯における遺伝子発現比較をマイクロアレイ解析し，さらに組織学的解析を行った結果，象牙芽細胞突起形成に必須と考えられる因子の一つとして，微小管関連蛋白質の一種であるタウ蛋白質（Mapt）が象牙芽細胞特異的に発現することを明らかにした．【方法】マイクロアレイは，生後 2 週齢マウス下顎臼歯を摘出後，Agilent 社の SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray 8x60 K を用いて行った．変動が認められた象牙芽細胞分化関連および細胞骨格関連遺伝子について，Real-time PCR による発現の再現性確認後，生後 1 日～6 週齢マウス臼歯について免疫組織化学による局在検索を行った．【結果及び考察】マイクロアレイと Real-time PCR 解析により，*Tg(Col1a1-Runx2)* マウス臼歯歯胚において，従来から象牙芽細胞マーカーとして知られている *Nestin* と *DSPP* に加え，*Mapt* の発現が野生型マウス歯胚と比較して顕著に減少していた．さらに，免疫組織化学および免疫電子顕微鏡により，タウ蛋白質は最終分化した象牙芽細胞に特異的に発現し，象牙芽細胞突起の微小管に沿って局在している事が明らかになった．以上の結果より，タウ蛋白質は象牙芽細胞の最終分化マーカーの一つであり，象牙芽細胞突起形成に関与する可能性が示唆された（Miyazaki et al., 2015）．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Microtubule-associated protein tau（Mapt）is a useful marker protein for terminally differentiated odontoblasts in mice

○Miyazaki T[1]，Baba T[2]，Komori T[1]

[1]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

We have previously reported that the terminal differentiation of odontoblasts is inhibited in Runx2 transgenic {*Tg(Col1a1-Runx2)*} mice under the control of 2.3 kb *Col1a1* promoter（Miyazaki et al., 2008）. Odontoblasts in *Tg(Col1a1-Runx2)* mice lose their characteristic polarized morphology, including a long process extending to dentin. The purpose of this study is to examine the essential factors for odontoblast morphogenesis. Using microarray, we compared the gene expression profiles in the molars between wild-type and *Tg (Col1a1-Runx2)* mice, and found that microtubule-associated protein tau（Mapt）, a neuronal phosphoprotein, was highly expressed in wild-type mouse molars but its expression was severely reduced in *Tg(Col1a1-Runx2)* mouse molars. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that Mapt was exclusively localized in terminally differentiated odontoblasts including their processes in wild-type molars. Mapt was ultrastructurally present around the tubulin-positive filamentous structures（Miyazaki et al., 2015）. The present report shows the details of these findings and indicates that Mapt may be an important factor for odontoblast morphogenesis and is a useful marker protein for evaluating the terminal differentiation of odontoblasts in mice.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-8　ミドリフグの歯に関する発生学的観察

○山本　　仁，藤関　元也，山崎　貴希

東歯大　組織発生

【目的】ミドリフグは脊椎動物で最も小さいサイズのゲノムを持ち，ゲノムに含まれる遺伝子の割合が高く，かつ固有の機能を持たない遺伝子が少ないという特徴を持つ．そのため遺伝学におけるモデル動物とされ，すでにゲノムのドラフト配列が発表されていることから，ゼブラフィッシュやメダカのように実験動物として将来様々な研究に用いられる可能性が高いと考えられるが，その歯や周囲の組織構造についての報告はない．そこで演者は体長 3 cm ほどのミドリフグの歯と周囲組織について組織学的に観察したところ，この時期の左右の顎骨は上下顎とも正中で嵌合しており，それぞれ 1/4 顎には 8－9 個の歯（歯胚：頬側歯胚）が垂直的に存在するだけではなく，舌側の一部分に垂直的に連続して形成されている歯（歯胚：舌側歯胚）が存在することを見出し，第 56 回歯科基礎医学会学術大会で発表した．そこで今回このような特殊な形態を示す歯と周囲組織について発生学的に検索した．【方法】孵化後 3 週から 8 週まで 1 週毎にミドリフグ各 3 匹を 4%パラフォルムアルデヒド溶液で浸漬固定し，Plank-Rychlo 液で脱灰後，通法に従ってパラフィンに包埋した．厚さ 5 $\mu$m の矢状断切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン重染色を施して光学顕微鏡観察を行った．【結果と考察】孵化 3 週では形成中の顎骨内にすでに 2－3 個の頬側歯胚と舌側歯胚が観察された．頬側歯胚の数は週齢を追うごとに多くなり，孵化 8 週にはおよそ 6 個が垂直的に形成されていたが，舌側歯胚の数は孵化 8 週まででは増えていなかった．また舌側歯胚は口腔粘膜から連続した上皮から形成されていることを示す像がみられた．孵化 3 週の形成過程にある顎骨の正中部では左右の顎骨の嵌合示す像が観察された．以上の所見からミドリフグの歯（歯胚）は唇側歯胚，舌側歯胚共に孵化の早い時期に口腔粘膜上皮から形成が開始されること，左右の顎骨は形成初期の段階で嵌合することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histological studies on the tooth development of green spotted pufferfish（*Tetradon nigroviridis*）

○Yamamoto H，Fujiseki M，Yamazaki T

Dept Histol Dev Biol, Tokyo Dent Coll

INTRODUCTION: Green spotted pufferfish（hereafter, GSPfish）has the smallest genomes among vertebrates, GSP fish is selected as a model animal in genetics. In addition, because the draft genome sequence was announced, it is considerable that GSPfish is used as an experimental model like medaka and zebrafish. Thus, we reported the structure of tooth and jawbone of GSP fish（body height 3 cm）in the 56th annual meeting of Japanese Association for Oral Biology. We attempted to observe tooth formation of GSP fish developmentally in this study. MATERIALS AND METHODS: GSPfishes of each week from 3 to 8 weeks after hatching was fixed with 4% paraformaldehyde solution. After decalcification and dehydration, specimens were embedded as a conventional method. Sections（5 micrometer thickness）were stained with H-E. RESULTS AND DISCUSSION: At 3 weeks after hatching（AH 3w）, 2-3 tooth germs on both labial and lingual side in 1/4 jaw were observed in the developing jawbone. The number of tooth germ on the labial side increased until AH 8w, although the number of the tooth germ on lingual side did not increased. These findings suggest that labial tooth may be more functionally compared with lingual tooth in case of GSPfish.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-9 ラット臼歯歯髄断髄後の Prostaglandin Transporter に対する免疫組織学的局在解析

○大倉　直人[1]，枝並　直樹[1]，吉羽　永子[1]，吉羽　邦彦[1]，依田　浩子[2]，大島　勇人[2]，興地　隆史[3]

[1]新潟大　院医歯　う蝕
[2]新潟大　院医歯　硬組織形態
[3]医科歯科大　院医歯　歯髄生物

急性炎症や痛みの重要な生体内調節因子である prostaglandin（PG）の機能は，prostaglandin transporter（PGT）と呼ばれる膜輸送タンパクによって調節されていると考えられているが，歯髄における PGT の局在や機能は十分解明されていない．そこで本研究では，歯髄の炎症や創傷治癒過程における PGT の機能解明の緒端として，生活断髄を施されたラット臼歯における PGT の局在を免疫組織化学的に解析した．8 週齢 Wistar 系雄性ラットを使用し，全身麻酔下で上顎左側第一臼歯をカーバイドバーで断髄し，MTA セメント（ProRoot MTA; Dentsply Tulsa Dental）を用いて封鎖後，歯冠歯髄における PGT の局在を酵素抗体法で確認した．また，neurofilament（NF；神経細胞マーカー）あるいは S-100β サブユニット（S-100；シュワン細胞マーカー）と PGT との蛍光二重染色を行い，PGT 陽性細胞の同定を行った．その結果，正常ラット第一臼歯では PGT 陽性反応を象牙芽細胞層に認めた．さらに，断髄後 3 日では MTA 直下に細い線維状の PGT 陽性細胞が確認されたが，蛍光二重染色によりこれらが S-100 陽性，NF 陰性を示すことが確認された．以上より，ラット臼歯歯髄では PGT が象牙芽細胞に発現していることが確認されるとともに，断髄後では創傷部直下においてシュワン細胞の一部が一過性に PGT を発現することが観察された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunohisitochemical analysis of prostaglandin transporter in pulpotomized rat molars

○Ohkura N[1]，Edanami N[1]，Yoshiba N[1]，Yoshiba K[1]，Ida-Yonemochi H[2]，Ohshima H[2]，Okiji T[3]

[1]Div Cariol, Oper Dent Endod, Dept Oral Health Sci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[3]Dept Pulp Biol Endod, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

Prostaglandins（PGs）are known to act as modulators of acute inflammation and pain perception. Prostaglandin transporter（PGT）is a membrane transport protein that controls the function of PGs by mediating the transmembrane uptake or efflux of PGs. However, the distribution and role of PGT in the dental pulp is unclear. As a first step toward the understanding of the function of PGT on the pulp inflammation and wound healing process, this study aimed to immunolocalize PGT in pulpotomized rat molar dental pulp. The maxillary first molars of 8-week-old Wister rats were pulpotomized and capped with mineral trioxide aggregate（MTA）. After 1-3 days, the teeth were immunoperoxidase stained for PGT, and double-immunofluoresce stained for PGT and neurofilament（NF; neuron cell marker）or S-100 beta-subunit（S-100; Schwann cell marker）. PGT-immunoreactivity was detected on odontoblasts in normal and pulpotomized rat first molars. At 3 days, PGT-immunoreactive fibrous structure co-expressing S-100 was detected beneath the MTA-capped area. However, the PGT-immunoreactive structure did not express NF-immunoreactivity. This study confirmed our previous finding that odontoblasts express PGT, and further demonstrated that, in pulpotomized pulp tissue, PGT was transiently expressed in Schwann cells beneath the MTA-capped area.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-10 レーザー照射による齲蝕予防に関する研究－μCT 法による表層下脱灰と再石灰化の観察

○東理　頼亮，岡田　康男

日歯新潟　病理

【目的】近年，レーザー機器の治療への応用が著しい．今回，歯面へのレーザー照射によるう蝕病変回復プロセスを明らかにする目的で，表層下脱灰を伴うヒト臼歯白斑モデルを用いて，炭酸ガスレーザー照射による歯質内部の質的・量的変化を非破壊的・経日的に観察を行い，病巣の広がり範囲と石灰化度の変化を時間軸で評価した．【方法】当病院診療科で抜歯し，本学倫理委員会規定にて使用が許可された大臼歯のなかで平滑面白斑う蝕を有する部分を対象にバンドソーにてブロック状に作製し，2%フッ化ナトリウム塗布と炭酸ガスレーザー照射の併用を経日的に行った．試料は島津製作所マイクロフォーカスエックス線撮影装置 SMX-100CT と RATOC 社画像解析ソフト TRI/3D BON を用いて，時系列での μCT 画像と無機塩濃度変化を定量解析した．【結果】レーザーが直接照射されるエナメル質表面の色調は，経日的に周囲の健常な部分と類似する傾向をみせたが，μCT 画像観察結果から深部の齲蝕病巣の形状や無機塩濃度に著明な変化はみられなかった．また，レーザー照射試料と未照射の試料における脱灰深度に有意な差はみられなかった．【考察／結論】同様の技法で有効な効果を得られた報告はあるが，今回，初期齲蝕へのレーザー応用の効果を検証した結果，表層下脱灰域へのフッ素塗布と炭酸ガスレーザーの照射の併用は，従来報告されている最表層部での耐酸性の向上は期待できるが，再石灰化の効果は困難であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Study of the preventive effect of initial enamel caries by carbon dioxide laser irradiation

○Kanri Y，Okada Y

Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

Objective: The purpose of this study is to investigate the longitudinal remineralization study of $CO_2$ laser irradiation with application of 2% sodium fluoride pastes on enamel white spot carious lesions. Materials and methods: We have trimmed the teeth of white spot caries lesion in the smooth surface of enamel to the cuboid shape. Remineralization method used were application 2% sodium fluoride and $CO_2$ laser irradiation to the white spot carious lesions chronologically. The teeth were monitored over remineralization periods for 14 days. All micro CT data were acquired from individual tooth blocks submerged in the artificial saliva using Nittetsu ELE-SCAN apparatus. Reconstruction and visualization was conducted using RATOC 3D-BON software. Results: In the macroscopic image, the laser irradiated enamel surface similar changes to normal color tone was observed as compared to before the irradiated. These specimens were not significantly change in shape and volume of caries lesions. No remarkable evidence of remineralization was detected any sample. Conclusion: Sodium fluoride pastes application and laser irradiation to the initial enamel caries that contribute to the improvement of acid resistance. It suggested the possibility that subsurface demineralization of early enamel lesions is not inhibited by $CO_2$ laser irradiation with application of sodium fluoride.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-11 ラット歯髄由来線維芽細胞におけるポリリン酸誘導 MMP-3 は Wnt5-Lrp5 シグナルを介して細胞増殖を制御する

○尾関　伸明[1]，山口　秀幸[1]，檜山　太希[1]，川合　里絵[1]，茂木眞希雄[2]，中田　和彦[1]

[1]愛院大　歯　歯内治療
[2]愛院大　薬　生体機能

**【研究目的】**生体適合性の高いポリリン酸は，リン酸が直鎖状に重合したリン酸ポリマーであり，ヒト歯肉線維芽細胞の増殖促進や骨芽細胞に作用することで骨形成を誘導することが報告されている．本研究では，精製したラット歯髄由来線維芽細胞に対するポリリン酸の新規な生理的役割を明らかにするため，MMP-3, Wnt5 および Lrp5 の siRNA を用いてシグナルカスケードの詳細な検討を行った．**【材料および方法】**歯髄は雄性 Wistar 系ラット切歯より採取・初代培養し，3-5 継代目をラット歯髄由来線維芽細胞（DPFCs）とし，実験に用いた．ポリリン酸を添加後，Real time-PCR 法と Western-blot 法により，MMP-3 mRNA，タンパク質発現ならびに細胞増殖活性を評価した．MMP-3 siRNA を用いて，ポリリン酸による細胞増殖に対する評価を行った．各々の siRNA を用いて，DPFCs の増殖過程における MMP-3, Wnt5 および Lrp5 を介したシグナルカスケードの検索を行った．**【結果】**ポリリン酸添加群（0.1 mM）において細胞増殖の亢進，MMP-3 および Wnt5 遺伝子発現ならびにタンパク質産生の亢進，さらに，MMP-3 酵素活性の上昇が統計的有意に認められた．さらに，siRNA を用いたシグナルカスケードの検索により，ポリリン酸による細胞増殖は Wnt5 → Lrp5 → MMP-3 シグナルカスケードを介して制御されていることが明らかとなった．**【考察および結論】**低濃度（0.1 mM）のポリリン酸は，MMP-3 発現の亢進に伴い，DPFCs の増殖を亢進させることを初めて明らかにした．さらにポリリン酸は，Wnt5 → Lrp5 シグナルを介して MMP-3 酵素タンパク質を誘導し, DPFCs の増殖を制御することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Inorganic polyphosphate-induces MMP-3-mediated proliferation in rat dental pulp fibroblast-like cells is mediated by a Wnt5-Lrp5 signaling cascade

○Ozeki N[1]，Yamaguchi H[1]，Hiyama T[1]，Kawai R[1]，Mogi M[2]，Nakata K[1]

[1]Dept Endo, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent
[2]Dept Med Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ

**Purpose:** Inorganic polyphosphate［Poly（P）］induces the differentiation of osteoblasts. In this study, matrix metalloproteinase（MMP）-3 small interfering RNA（siRNA）was transfected into purified dental pulp fibroblast-like cells（DPFCs）to investigate whether MMP-3 activity was induced by Poly（P）and/or is associated with cell proliferation in DPFCs. **Materials & Methods:** Real-time PCR, western blotting, an MMP-3 activity assay and cell proliferation were used in this study. This approach enabled evaluation of siRNA-mediated down-regulation of MMP-3 expression and activity, and changes in the proliferative response associated with this reduction in expression. **Results:** Poly（P）induced expression of MMP-3 mRNA and protein, and increased MMP-3 activity and cell proliferation. Silencing of MMP-3 expression with siRNA yielded potent and significant suppression of Poly（P）-induced MMP-3 expression and activity, and decreased cell proliferation. Poly（P）also increased mRNA and protein levels of Wnt5 and the Wnt receptor Lrp5. Although exogenous MMP-3 could not induce Wnt5, exogenous Wnt5 were found to increase MMP-3 activity and, interestingly, the proliferation rate of these cells. Transfection with Wnt5a siRNA suppressed the Poly（P）-induced increase in MMP-3 expression and suppressed cell proliferation. **Conclusion:** These results demonstrate the sequential involvement of Wnt5 and MMP-3 in Poly（P）-induced proliferation of DPFCs.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-12　歯周健常マーカーとなる検査キットの開発

○内堀　聡史[1]，小林　　平[1]，續橋　　治[2]，會田　雅啓[1]

[1]日大松戸歯　クラウンブリッジ
[2]日大松戸歯　微生物免疫

【目的】近年，次世代シークエンサーなどによるメタゲノム解析における報告の中で *Rothia dentocariosa*（*R.d*）が歯周健常者に有意に認められるとの報告が多数散見される．同様に，我々が以前行った研究の結果，歯周健常者では有意に *R. d* の菌数が多く，慢性歯周炎患者では少なかったことより，*R. d* の菌数は歯周組織健常マーカーの指標となり得ることが示唆された．すなわち，*R. d* の菌数はリアルタイムに歯周組織状態を把握できるため，*R. d* 選択培地の組成を応用して臨床の場で簡便に実施できる検査キットの開発を行った．【方法】歯周健常マーカーとなる検査キットの開発には，以前我々が開発した *R. d* 選択培地の組成を改良して行った．さらに，*R. d* は培地中に含まれている高濃度スクロースを分解し酸を産生する性状を応用し，改良した培地の組成に pH 指示薬であるブロモクレゾールパープル（BCP）を添加した選択液体培地を作製した．PCR チューブに本選択液体培地を分注したものを検査キットの試作品とした．そして慢性歯周炎患者 30 名から歯肉溝浸出液を採取し，本キットを用いて同菌の定量的検出を行うとともに，従来の選択平板培地による検出結果と比較検討を行うことにより，本検査キットが有用であるか否かを調査した．【結果と考察】選択性は従来の選択培地を改良することで顕著に歯肉溝浸出液中の目的外菌は抑制された．本検査キットに BCP による色調変化によって *R. d* の菌数を正確に定量可能であることが確認された．臨床試料においても，本検査キットにおける *R. d* 検出菌数と選択平板培地による *R. d* の菌数に相関が認められたことより，菌数定量にも優れていることが確認できた．これらの結果から，本検査キットは歯肉溝浸出液試料から *R. d* を定量的に検出することができ，臨床において歯周組織状態を正確にモニタリングすることが可能であると推察された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Development of an applicable clinical kit which are useful for an indicator of the healthy periodontal tissue

○Uchibori S[1]，Kobayashi T[1]，Tsuzukibashi O[2]，Aida M[1]

[1]Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
[2]Dept Microbiol and Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Objectives: Recent high-throughput 16S rRNA pyrosequencing studies reported that *Rothia dentocariosa*（*R. d*）dominated the health-associated subgingival plaque communities. Our previous study has also showed that the number of *R.d* in gingival crevicular fluid（GCF）samples has represented the periodontal tissue conditions. Purpose of this study was to develop an easily applicable clinical kit for estimating the level of *R.d* in GCF samples. Methods: A clinical kit was developed using the selective medium broth made from an improved composition, i.e. addition of bromocresol purple, of the selective medium agar for the isolation of *R.d*. The prototype was made by pouring the selective medium broth into PCR tubes. For examination of clinical efficacy, GCF samples were collected from 30 periodontal healthy persons and 30 chronic periodontal patients. The result obtained by using this kit was compared with that of selective medium agar. Results and conclusions: The growth of oral bacteria other than *R.d* was markedly inhibited in this clinical kit. The results obtained by using a clinical kit were similar to the results of selective medium agar. Since this clinical kit is able to estimate accurately the level of *R.d* in GCF samples, it will be useful for the clinical.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-13 歯牙神経線維における蛍光色素 AM1-43 の蛍光顕微鏡的および電子顕微鏡的局在

○西川　純雄

鶴見大　歯　生物

AM1-43 は styryl 色素で側線器や内耳の有毛細胞の陽イオンチャネルを通過して，細胞を標識することが知られている．口腔領域においても口蓋や歯肉，歯根膜，歯髄の神経線維を標識することが知られている．本研究では新生仔ラットを用いて，このことを確認し，さらに photoconversion 法を用いて切歯周囲の結合組織の標識部位での超微局在の同定を試みた．Wistar 系ラット出生後 1 日と出生後 2 日のものを用いた．動物は背部皮下に約 10-20 μL の AM1-43（1 mg/mL PBS）を注射した．対照の動物には PBS だけを注射した．生後 1 日の動物は 3 時間後，生後 2 日の動物は注射の翌日生後 3 日で麻酔下に屠殺し，4%パラフォルムアルデヒドまたは 4%パラフォルムアルデヒドに 0.5%グルタルアルデヒドを加えたもので固定し，凍結切片を作製し蛍光顕微鏡で観察した．AM1-43 を注射した生後 3 日の 1 個体は切片にジアミノベンチジン存在下に蛍光顕微鏡の青色光を照射し，蛍光部位の photoconversion を行った．青色光を照射しなかったものを対照とした．切片は四酸化オスミウム 後固定を行い．エポン包埋をした．この結果，蛍光顕微鏡では切歯周囲の結合組織中の線維が標識されていた．photoconversion 法による電子顕微鏡では神経線維束が標識され，神経線維のミトコンドリア，小胞，短い棒状の構造が標識された．一部は細胞質が染まっていた．これらの結果は AM1-43 が神経線維の中に取り込まれ，さらにその中の特定の細胞小器官に取り込まれることを示唆している．口腔組織において AM1-43 が神経マーカーとして利用できることを示している．さらに今後例数を増やしていきたいと考えている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Localization of AM1-43 in the tooth nerve fibers using fluorescence and electron microscopy

○Nishikawa S

Dept Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

AM1-43 is a styryl dye and labels the hair cells of lateral line organ and inner ear by internalization via passage of their cation channels. Sensory nerve fibers of secondary palate, gingiva, periodontal ligaments and pulp were also labeled by AM1-43. In this study, new born rats were injected with small amount of AM1-43（10 to 20 μL, 1 mg/mL in PBS）at the back skin. Animals（1 and 3 day old）were fixed with 4% paraformaldehyde or 4% paraformaldehyde plus 0.5% glutaraldehyde solution. Cryosectons were examined with a fluorescence microscope. Thin sections of an animal was further examined by electron microscopy after photoconversion of AM1-43 by blue light irradiation in the presence of diaminobenzidine. The results showed that AM1-43 labeled thin fibers in fluorescence microscopy, and mitochondria, vesicles and small rod-shaped structures of nerve fibers in the connective tissues besides the incisor in electron microscopy. This confirms the dye internalization into the nerve fibers. AM1-43 is a useful marker to identify nerve fibers in the oral tissues, although further study is clearly needed.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-14　ヒト歯根膜幹細胞に対する新規合成ペプチド効果の遺伝子的解析

○富永　和也[1]，嘉藤　弘仁[2]，岡村　友玄[1]，和唐　雅博[1]，西川　哲成[1]，田中　昭男[1]

[1]大阪歯大　口腔病理
[2]大阪歯大　歯周病

市販のエムドゲインをラット背部皮下に注射し，生じたエオジン好性の円形小体をもとに MALDI-TOF-MS によって 7 つのアミノ酸シークエンス（WYQNMIR）から構成されていることを明らかにした．その物質はアメロジェニンエクソン 5 と同じアミノ酸配列であった．この物質の作用を明らかにするためにヒト歯根膜幹細胞を用いた．すなわち，歯列矯正のため便宜抜去された歯，あるいは抜去された埋伏智歯の歯根膜から分離した歯根膜幹細胞（PDLSCs）は間葉系マーカー（Vimentin）および間葉系幹細胞マーカー（STRO-1，SSEA-4）を用いて免疫組織化学的に間葉系幹細胞であることを確認した．PDLSCs は（1）通常の培地で培養したもの，（2）骨芽細胞用培地で培養したもの，および（3）骨芽細胞用培地で培養のものに我々が開発した WYQNMIR のアミノ酸シークエンスからなる新規合成ペプチドを添加したものの 3 種類について網羅的遺伝子解析であるマイクロアレイ解析を行った．（1）および（2）をコントロールとして（3）との比較を行った．その結果，Leucine-rich repeat-containing protein（LRR）の 遺伝子発現が（1）と比較して 23 倍，（2）と比較して 30 倍増強していた．LRR 遺伝子は骨芽細胞に強く発現する遺伝子であるので，新規合成ペプチドは，PDLSCs を骨芽細胞へ分化させる機能を有している可能性が示唆された．その他の遺伝子では，PIP，SAA1，FKBP5，GPM6B，IGF2，CPM，RASL11B，XPNPEP3，STK31，MT1X，ANGPTL4，LEP，RERG，DPT，BMP 6 Precursor が増強した．また，thymosin-$\beta$ も若干増強したが，osteopontin，osteonectin，osteocalcin は若干低下した．骨芽細胞に発現するといわれている LRR およびエナメルタンパクの発現に係る thymosin-$\beta$ 発現の増強が新規合成ペプチド刺激でみられたことから，本ペプチドの作用を分子レベルで解明できつつある．本研究は医の倫理委員会の承認を得た研究（110712）である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Whole genome analysis of human periodontal ligament stem cells stimulated by a synthetic peptide

○Tominaga K[1]，Kato H[2]，Okamura T[1]，Wato M[1]，Nishikawa T[1]，Tanaka A[1]

[1]Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ
[2]Dept Periodontol, Osaka Dent Univ

Commercially-available Emdogain® was cutaneously injected into the backs of rats and round bodies were formed. The bodies analyzed by MALDI-TOF-MS showed a seven-amino acid sequence composed of WYQNMIR. This sequence is the same as amelogenin exon 5 sequences. To elucidate the function of this novel synthetic peptide, the peptide was applied to culture of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs), cells isolated from tooth periodontal ligaments extracted for orthodontic reasons. Isolated cultured cells were confirmed by immunohistochemical staining using mesenchymal marker（vimentin）and mesenchymal stem cell markers（STRO-1, SSEA-4）. PDLSCs were cultured by three methods: routine culture medium, osteoblast medium, and osteoblast medium with the synthetic peptide. These cultured cells were subjected to whole-genome gene expression analysis. Leucine-rich repeat-containing protein（LRR）expression was enhanced greatly and thymosin-beta expression slightly. These results indicate that this synthetic peptide possesses an inducible hard tissue-forming function.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-15　光機能化処理によるインプラント周囲骨形成と微小循環について

○松尾　雅斗，奥寺　俊允，前田　信吾

神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態

［目的］近年，光機能化処理によるインプラント表面性状の改良が注目されている．本法は紫外線を照射によりチタン表面の親水性を増すことにより，インプラント体表面に血管や骨芽細胞を積極的に誘導しオッセオインテグレーションを速やかに獲得する事が可能とされる．本研究では，光機能化処理が実験的インプラント周囲炎の防御機構に影響するか形態学的な視点から検討を行なった．［方法］実験動物にはビーグル犬 4 頭を用い，全身麻酔下において，下顎左右前臼歯部を抜去し，歯槽骨頂縁を平坦に整形した．第二前臼歯の遠心歯槽窩と第四前臼歯の近心歯槽窩内に純チタンスクリュー型インプラント（直径 3.3 mm，長さ 8 mm，表面性状 SLA）を即時埋入した．片側のインプラント体には光機能化処理を行い，他方は対照群とした．実験は血管鋳型標本を作製し，走査型電子顕微鏡（SEM）にて観察を行った．［結果および考察］術後 14 日，対照群では骨-インプラント界面には血管が新生し，インプラント体に沿った周囲骨は多孔性の幼若骨であった．未だオッセオインテグレーションは充分に獲得されていない状態であった．それに対して UV 群では新生血管を覆うインプラント周囲骨が観察された．術後 30 日，UV 群では骨の石灰化が進み一定の厚さを持つ緻密な骨となっていた．対照群では周囲骨の石灰化は進んでいるが UV 群に比較すると粗造な骨形成を示していた．術後 60 日，両群ともほぼオッセオインテグレーションは達成されていた．骨梁の構造は UV 群において骨梁の幅，配列とも明確に再生していることが観察された．［結論］以上の結果より紫外線を用いた光機能化処理により，インプラント周囲には血管新生とそれに伴う骨形成がより明確に生じることがわかった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Microvasculature and peri-implant tissue changes after photo functionalization

○Matsuo M，Okudera T，Maeda S

Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Introduction : Ultraviolet photo functionalization is a new method for improving the surface characteristics of titanium implants. The purpose of this study was to examine the effect of photo functionalization on morphological analysis. Materials & Methods: The use of experimental beagle dogs were in accordance with the Animal Care Committee guidelines of our institution. Titanium screw implant was immediately inserted into mandibular premolars extraction socket. The implant on one side was photo functionalized with UV light（UV group）. The implant on the other side was served as the control group（control group）. Synthetic resin was injected from the inferior alveolar arteries. Resin cast specimens were examined by SEM. Results: In the control group, peri-implant bone was not observed clearly along the implant surface. Instead of bone, regenerated blood vessels were observed around the implant surface. In the photo functionalization group, peri-implant bone was thicker than the control group. Blood vessels were buried under newly formed bone tissue. Bone trabeculae are attached to the thick peri-implant bone. Discussion and Conclusion: The photo functionalization of implants using the photocatalytic activity of titanium improved the bone-binding strength of implants. Moreover, it increased the bone implant contact ratio.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-16 Advanced Platelet-rich fibrin（A-PRF）を用いた歯槽骨再生の試み

○奥寺　俊允[1]，三好代志子[2]，前田　信吾[1]，松尾　雅斗[1]

[1]神奈川歯科大　口腔科学　歯科形態
[2]神奈川歯科大　口腔科学

【目的】歯槽骨再生療法は失われた顎骨を増大する治療法として注目されている．近年，これらの移植材に改良型多血小板フィブリン（Advanced Platelet-rich fibrin：A-PRF）を適応することで速やかな骨形成が得られることがわかってきた．A-PRF には各種成長因子が含まれており，血管新生や骨組織再生を促進する効果があると考えられている．また，同様の目的を持つ多血小板血漿（PRP）と比較すると密なゲル状を呈するため骨造成の足場としての可能性も考えられる．本研究では骨形成プロセスについて形態学的に検討を行なった．【材料と方法】実験は全身麻酔下においてビーグル犬 6 頭を用いた．右側前臼歯を抜去し実験群とし抜歯窩中に A-PRF を密に充填した．また，反対側は抜歯のみの対象群とした．両群とも歯肉弁は緊密に縫合を行った．手術後 14，30 日後，HE 標本を作製し光学顕微鏡観察を行った．【結果と考察】対照群では術後 14 日に抜歯窩中に周囲既存骨から幼弱な骨再生が始まっていた．しかし抜歯窩中央は血餅で満たされ骨形成量は少なかった．実験群では 14 日後に抜歯窩内は中央部に至るまで幼若骨で満たされていた．対照群では骨再生は 30 日後に骨梁形成が見られた．骨梁は再生途上にあり配列は部分的であった．実験群では 30 日後，骨再生は進み，放射状に配列する骨梁が観察された．【結論】これらの結果より，A-PRF を骨欠損部に適応すると，骨新生が明確に促進することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Regenerating processes of alveolar bone after application of advanced platelet-rich fibrin（A-PRF）

○Okudera T[1]，Miyoshi Y[2]，Maeda S[1]，Matsuo M[1]

[1]Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent

Introduction : Application of Advanced Platelet-rich fibrin（PRF）is expected to use the one of the bone regeneration therapy. Platelet contains a lot of growth factors. It is thought these factors accurate the vascular and bone. In this study, regeneration processes of alveolar bone are observed under morphological analysis. Materials and Methods: The use of experimental beagle dogs were in accordance with the Animal Care Committee guidelines of our institution. Premolars were extracted in order to use the experimentally sockets. Then PRF, which made for own experimental animal was applied to the one side of tooth sockets. At 14, 30 days days after, HE stained sections were observed under Light microscope. Results and Discussion: 14 days after operation, Center part of tooth sockets was not observed the bone tissue. In the PRF group, the socket is filled in the newly formed porous bone. 30 days after, The inside the socket of PRF group was filled with newly formed porous bone. These results suggest that PRF promoted the bone addition. It was thought that most benefits of PRF are safety and acceleration of bone formation
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-17　取り下げ

## P2-18 全身麻酔下のラットの歯肉への *Porphyromonas gingivalis* の LPS の局所投与が血液中の TNF-α 量に及ぼす影響

○青野　悠里，三枝　　禎

日大松戸歯　薬理

歯周病による糖尿病悪化の一因として，歯周病関連細菌の内毒素が惹起した TNF-α の作用増大によるインスリン抵抗性促進が想定されている．我々は *P gingivalis*（*Pg*）由来の LPS（*Pg*-LPS）のラットの歯肉への局所投与が同部位の IL-6 には影響を与えずに TNF-α を一過性に増大させることを報告してきた（Taguchi et al., 2015）．しかしこの *Pg*-LPS 処置が血液中の IL-6 と TNF-α に及ぼす効果は明らかでない．本研究では全身麻酔下のラットを用い，歯肉への *Pg*-LPS の投与の血液中の IL-6 と TNF-α に及ぼす影響について解析した．*Pg*-LPS の作用には TLR2 の関与が指摘されている（Burns et al., 2010）ので，作用発現に TLR4 が関与する *E coli*（*Ec*）由来の LPS（*Ec*-LPS）の投与実験も比較のため行った．
実験には，urethane（1.5 g/kg i.p.）による全身麻酔を施した S-D 系雄性ラット（体重約 300 g）を用いた．上顎切歯遠心部の歯肉に 0.44 mm，膜長 2 mm のポリエチレン製透析膜（cut-off 分子量 1000 kDa）とその表面に薬物注入用ニードルを備えた probe を挿入した．外頚静脈へカテーテルを留置し自動採血装置により 1 時間毎に血液を 500 μl 回収した．*Pg*-LPS または *Ec*-LPS を含む溶液 1 μl は，血液回収開始 2 時間後にマイクロシリンジにより 30 秒かけて薬物注入用ニードルから歯肉へ局所投与した．血漿中の IL-6 と TNF-α は，ELISA により定量した．
その結果，血漿中の IL-6 は約 250 pg/ml であったのに対し TNF-α は検出限界（5 pg/ml）以下だった．*Pg*-LPS（1 μg）の投与後，IL-6 には殆ど変化はなかったが TNF-α は一過性に増大した．一方，溶媒または *Ec*-LPS（1 μg）の投与では IL-6，TNF-α に目立った影響は見られなかった．
*Pg*-LPS は *Ec*-LPS とは異なり TNF-α を増大させたので，この効果の発現には歯肉の TLR2 刺激が関与した可能性が考えられた．また本研究から，歯肉内で増加した *Pg*-LPS は血液中の TNF-α の増大を介して全身状態へ影響を及ぼすことが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide increases plasma TNF-α levels in anaesthetised rats

○Aono Y，Saigusa T

Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

We have shown that intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide（*Pg*-LPS）in anaesthetised rats increases gingival TNF-α without affecting IL-6（Taguchi et al., 2015）. We analysed the effects of intragingival *Pg*-LPS on plasma TNF-α and IL-6 levels of urethane-anaesthetised rats. We also studied the effects of *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide（*Ec*-LPS）on blood cytokines, since it has been suggested that *Pg*-LPS and *Ec*-LPS induce cytokines via TLR2 and TLR4, respectively. The external jugular vein was cannulated and connected with Teflon tubing to a blood sampling system. Either *Pg*-LPS（1 μg), *Ec*-LPS（6 μg）or vehicle was injected into gingiva of upper incisors via a microsyringe, with 500 μl of blood sampled every 1 hr. Plasma TNF-α and IL-6 levels were determined by enzyme-linked assays. Basal plasma IL-6 level was 260 pg/ml. Basal TNF-α levels were lower than the detection limit（5 pg/ml）. *Pg*-LPS failed to affect IL-6 levels but markedly increased TNF-α. Neither IL-6 nor TNF-α were altered by *Ec*-LPS. These results indicate that TLR2, but not TLR4, in gingival epithelium may mediate the *Pg*-LPS-induced increase of TNF-α. It is suggested that increased *Pg*-LPS in gingiva may have systemic effects through induction of plasma TNF-α.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-19 ストレス反応性タンパク質による歯根膜線維芽細胞の増殖調節機構

○定岡　直[1]，八上　公利[1,2]，川原　一郎[1,2]

[1]松本歯大　衛生
[2]松本歯大　院歯独　健康増進口腔科学
[3]松本歯大　口腔インプラント

【目的】生体外から受けるあらゆるストレス因子に対し，生体内では糖タンパク質であるクロモグラニン A（CgA）を産生する．神経内分泌系の生理活性物質で，自律神経系の活動指標である．また，抗菌ペプチドの産生，サイトカインの産生に関与するなど，全身および局所の免疫調節機構と密接に関係している．また，歯周病との関連性が報告されており，これまでに口腔分野からは唾液中の CgA 測定による，診療時の患者のストレス，口腔乾燥症や高齢者の歯周疾患との関連性が報告されている．我々はこれまでに歯根膜線維芽細胞に対するストレスに対して細胞自体が CgA を産生することで TGF-$\beta$ や IL-8 の産生増加による細胞内情報伝達機構への関与を報告してきた．今研究発表では神経組織内で CgA により活性するとされる nf-$\kappa\beta$ が歯根膜線維芽細胞でも同様の作用を示すのではないかと考え，新たな CgA による細胞調節機構を探ることにした．
【方法】歯周組織のモデルとして正常ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPdLF）を用いて，非添加群（対照）とクロモグラニン A 添加群を一定時間培養した．そして細胞内の nF-$\kappa\beta$ 発現量を InstantOne™ ELISA Kit（ebiosicience 社）で測定した．
【結果】CgA 添加群における nF-$\kappa\beta$（Total/Phospha）共に増加した．
【考察】歯根膜線維芽細胞においても CgA の作用により転写因子である nF—$\kappa\beta$ の発現量が増加した．一方アポトーシスに関与し，nF-$\kappa\beta$ と相互作用があるとされる p38/JNK の発現量に変化は見られなかったことから歯根膜線維芽細胞では nF-$\kappa\beta$ が他組織とは異なる調節機構に関与している可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Stress-responsive protein is involved in the increase regulatory mechanism of the periodontal ligament fiberblasts

○Sadaoka S[1]，Yagami K[1,2]，Kawahara I[1,2]

[1]Dept Oral Health Sci, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Health Promotion Stomatol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Oral Implant, Matsumoto Dent Univ Hosp

For every stress factor to receive from vitro, we produce chromogranin A（CgA） which is a glycoprotein in vivo. With physiologically active substance of the neurosecretory system, it is activity index of the autonomic nervous system. Also, we are involved in production of the antibacterial peptide, production of cytokine and are associated with systemic and local immunomodulation mechanism closely. We reported participation in intracellular signal transduction mechanism by the production increase of transforming growth factor-beta and IL-8 so far because cells in itself produced CgA for the stress for the periodontal ligament fibers blast. It increased to nF（Total/Phospha） in the CgA addition group. Expression of nF which was a transcription factor increased by an effect of CgA in the periodontal ligament fibers blast. Whereas we were associated with apoptosis, and the possibility that nF was associated with the regulatory mechanism which was different from other tissue with the periodontal ligament fibers blast because the change was not found in expression of nF and p38/JNK said to that we provided it mutually was suggested.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-20 PKR やインフラマソームが *P. gingivalis* を感染させた骨芽細胞において骨吸収に関連する因子の発現に与える影響

○吉田　賀弥[1]，岡村　裕彦[2]，尾崎　和美[3]

[1]徳島大　院医歯薬　口腔保健教育学
[2]徳島大　院医歯薬　口組
[3]徳島大　院医歯薬　口腔保健支援

［背景］Double-stranded RNA-dependent kinase（PKR）はウイルスや細菌感染により誘導され，免疫や代謝，炎症に関与するキナーゼである．インフラマソームは NLRP3 などから構成される複合体で，カスパーゼ 1 を活性化する．近年，PKR が NLRP3 と結合しインフラマソームを活性化することや，歯周病原菌 *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞において NLRP3 を誘導し炎症性サイトカイン産生を亢進することが報告されたが，歯周病による歯槽骨吸収における PKR や NLRP3 の機能は不明である．［目的］PKR やインフラマソームが歯周病における骨吸収に果たす役割を解明するために，P. gingivalis を感染させた骨芽細胞において，PKR や NLRP3 が骨吸収に関連する因子（炎症性サイトカイン IL-6，骨関連遺伝子 RANKL や OPG，骨形成因子 HMGB1）の発現に与える影響を検討した．［方法］標識蛋白質 SNAP26b を発現させた *P. gingivalis*（SNAP-P.g.）を，骨芽細胞株 MC3T3-E1 の培養上清中に添加した後，ウエスタンブロットやリアルタイム PCR により各因子の発現を検出した．PKR の関与を shRNA，NLRP3 の関与をカスパーゼ阻害剤により検討した．［結果と考察］SNAP-P.g.添加により，PKR や NLRP3，IL-6，RANKL，OPG の発現は亢進し，HMGB1 の発現は抑制した．SNAP-P.g.は骨芽細胞に感染した後，PKR や NLRP3 を活性化して炎症や骨吸収を引き起こす可能性がある．PKR は NLRP3 が制御する HMGB1 や IL-6 の発現には影響しなかった．SNAP-P.g.が誘導した RANKL 発現は，PKR sh RNA やカスパーゼ阻害剤により抑制された．今後，PKR や NLRP3 による RNAKL 発現誘導機構について，詳細に検討する必要がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effects of PKR and NLRP3 on the bone-regulated gene expression in *P. gingivalis*-treated osteoblasts

○Yoshida K[1]，Okamura H[2]，Ozaki K[3]

[1]Dept Oral Healthcare Education, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci
[2]Dept Histol and Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci
[3]Dept Oral Healthcare Promotion, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

Double-stranded RNA-dependent kinase（PKR）is a kinase which regulates the process of immune, inflammation and metabolism. The inflammasome is a multi-protein complexes formed by NLRP family. It was reported that PKR and *Porphyromonas gingivalis* activate the inflammasome, however, little is known about the relationship between PKR/NLRP3 and bone resorption in periodontal diseases. In this study, to investigate whether PKR and NLRP3 influence the bone resorption in periodontal disease, we examined the effects of PKR and NLRP3 on the expression of genes which induce bone resorption in *P. gingivalis*-infected osteoblasts. The mouse osteoblasts MC3T3-E1 were treated with SNAP26b-tagged *P. gingivalis*（SNAP-P. g.）. SNAP-P. g. induced the expression of PKR and NLRP3. The results of real-time PCR showed that the expressions of IL-6, RANKL and OPGwere increased in SNAP-P. g.-treated osteoblasts. The expression of HMGB1, a bone-forming factor, was decreased by SNAP-P.g. The RANKL expression induced by SNAP-P.g. was attenuated by inhibition of PKR or NLRP3. Our results suggested that SNAP-P. g. may activate PKR and NLPR3, leading to the increase of bone resorption. To understand the role of PKR and NLRP3 in periodontal diseases, further studies investigating how they regulate RANKL expression in the osteoblasts infected with *P. gingivalis* are needed.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-21　高齢者の口蓋における動脈と神経の分布について

○佐藤　　巌，三輪　容子，春原　正隆

日本歯大　生命歯　解剖 1

【目的】口蓋は唇側中央にある切歯孔と左右の大・小口蓋孔から脈管や神経が口蓋に分布しているが，表面は固い肥厚した重層扁平上皮で覆われているためにその走行を把握することは肉眼的には難しい．歯周外科の分野では外科的侵襲が小さく合併症回避のための部位の解剖学的把握が重要であるが，その分布についての詳細な情報は少ないことからこの部における解剖学的評価を提供することを目的とした．【方法】今回，頭頸部に腫瘍等の疾患のない献体されたご遺体男女 20 例を（70 歳代-100 歳）を用いて，実体顕微鏡下で口蓋における脈管や神経の分布を解析した．また一部は光学顕微鏡下で脈管や神経の分布の立体的な位置関係を抗体マーカーを用いて顕鏡した．すでに我々は先行研究（17 回臨床解剖研究会記録）で上顎骨口蓋突起にある溝や管の存在によりこれらの脈管や神経の分布が左右の大・小口蓋孔を出たところで制限されることを報告したが，今回は切歯孔からくる切歯枝と大・小口蓋孔からくる枝との吻合や大・小臼歯部や切歯部の唇側の走行を顕微鏡下で観察した．【結果と考察】血管と神経の分布には臼歯部で差異がみられ，マクロ的には個人差が大きく，局所的には唇側ほど神経が偏移し，やや正中側に血管が偏移した．この結果は老化すると唾液の分泌が減少する知られているが，口蓋ではほとんど解明されてこなかった．このため，今回は口蓋における小唾液腺の動態が血管供給と関係ことから，老齢者の口蓋腺の分布との関係も合わせて報告する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Macroscopic analysis of vessels and nerve supply in the elderly human palatine

○Sato I，Miwa Y，Sunohara M

Dept Anat Sch Dent The Nippon Dent Univ at Tokyo

Objectives: In the field of periodontal surgery, it is important anatomical understanding of the vessels and nerves in the palatine with risk for the surgical treatment, and we need provide anatomical evaluation in this part since detailed information about the distribution. Methods: In this study, 20 cadavers with the age at death ranging from 70 to 100 were used for our observation（without a disease such as a tumor in the head and nec）. We observed the distribution of the vessels and nerves in the palate. We also checked the three-dimensional positional relationship of the distribution of vessels and nerves. Already we reported them control by the presence of the bony structure such as groove and the tube in the maxillary palate in the previous study（17 times Japanese Research Society of Clinical Anatomy）. Results: The blood vessels and nerve distribution were observed differences in the molar region, individual difference is large, local nerves to shift about labial surface side. Conclusions: The secretion of saliva is known to be reduced aging, but there has hardly been elucidated at the palate. The salivary gland in the palate is associated with vascular supply from the distribution of palatine gland of the elderly.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-22　ラット歯肉局所循環調節機構に対する抗酸化生体因子（$BH_4$）の役割

○遠山　歳三[1]，塗々木和男[2]，高橋　俊介[3]，高橋　聡子[3]，吉野　文彦[3]，吉田　彩佳[3]，
渡辺　清子[1]，浜田　信城[1]

[1]神奈川歯科大　微生物感染
[2]神奈川歯科大　看護
[3]神奈川歯科大　院歯　口腔科学

【目的】我々は以前，歯肉において虚血解除後の血流増大反応である反応性充血が，一酸化窒素（NO）作動性神経からのNO遊離が密接に関係していることを報告した．本研究は，ラット歯肉における虚血・再灌流（I/R）による反応性充血の抑制メカニズムへのNOとスーパーオキシド（$O_2^{\cdot -}$）の関与を解明する目的で，$O_2^{\cdot -}$とNO合成酵素（NOS）のコファクターである$BH_4$の相互作用について検討した．【方法】雄性ラット（Wistar，250-300 g）をペントバルビタールで麻酔下，大腿動脈圧監視下で，上顎切歯口蓋側歯肉を30秒から60分間圧迫・解除することによる反応性充血をレーザードップラー血流計を用いて観察した．【結果】ラットの歯肉反応性充血は，歯肉を30秒から20分間圧迫することにより時間依存性に増大するが，60分間の圧迫では著しく減衰していた．また，30秒から20分間の圧迫/解除によって惹起する反応性充血は，NOS阻害薬である7-nitroindazoleの静脈内投与により有意に抑制された．さらに，60分間の圧迫/解除によるI/Rの再灌流開始20分後に実施した60秒間の圧迫/解除で惹起する反応性充血はコントロールに比べ著しく抑制され，この抑制は，I/Rの再灌流開始時にスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）あるいはNOSのコファクターである$BH_4$を静脈内投与することによりコントロールレベルまで有意に回復した．なお，実験期間中の動脈圧の変化は認められなかった．【考察】以上の結果から，ラット歯肉反応性充血にはNO作動性神経調節機構が関与していることが示唆された．さらに，歯肉虚血・再灌流による歯肉反応性充血の抑制は$O_2^{\cdot -}$によるNOSのコファクターである$BH_4$の枯渇に起因したNO産生量の低下が関与する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Protective effects of $BH_4$ on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactivehyperemia in rat gingiva

○Toyama T[1]，Todoki K[2]，Takahashi SS[3]，W-Takahashi S[3]，Yoshino F[3]，Yoshida A[3]，
Watanabe K[1]，Hamada N[1]

[1]Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ
[2]Dept Health Sci, Kanagawa Dent Univ
[3]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ

Local circulation regulatory mechanism caused by ischemia/reperfusion（I/R）in rat gingival reactive hyperemia（GRH）was examined. The GRH was measured by using a laser Doppler flowmeter. The GRH increased time-dependently when compression was applied on the gingival tissue from 30 sec to 20 min. However, GRH was suppressed markedly for 60 min compression. The GRH in 30 sec to 20 min was significantly inhibited with a NOS inhibitor, 7-nitroindazole. After 60 min compression, rat gingiva was reperfused for 20 min and then GRH was evaluated with 60 sec compression. However, GRH was not fully recovered. The depression of GRH was significantly recovered by the treatment with Superoxide dismutase（SOD）and $BH_4$, which is NOS cofactor applied 20 min before reperfusion in I/R. The results suggest that NO secreted by the nitrergic nerve played an important role in the regulation of local circulation in rat GRH. Decreased NO production, which is caused by inhibition of NOS activity subsequent to depletion of $BH_4$, by $O_2^{\cdot -}$ may play a partial role in the suppression of gingival reactive hyperemia.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-23 クエン酸刺激による耳下腺唾液分泌と浅側頭動脈血行動態変化との相関

○黒木　愛由[1,2]，小野堅太郎[1]，人見　涼露[1]，山科　　亮[3]，小幡亜希子[4]，吉野　賢一[2]，
稲永　清敏[1]

[1]九歯大　生理
[2]九歯大　歯　口腔保健管理
[3]日立ハイテク
[4]日立

【目的】唾液成分の水分や電解質などの主な供給源は血液であり，唾液分泌の増加は血流量の増加を伴って起こると考えられている．しかし，ヒトにおける唾液分泌と血行動態との関係についてはあまり知られていない．唾液の生成および分泌に伴い，水分や電解質の補給だけではなくエネルギー消費が起こることから，唾液腺への酸素供給が必要になる．酸素供給量の変化は，酸化ヘモグロビン信号(Oxy-Hb)値によって表され，血液量の変化を反映していると報告されている．本研究では，クエン酸刺激による耳下腺唾液分泌と浅側頭動脈 Oxy-Hb 値の経時的変化および定量的変化に対する両者間の相関関係について検討した．【方法】19～27 歳の健康な男女 10 名を対象とし，片側耳下腺開口部に改良型 Lashley cup を装着し，唾液分泌量の変化を測定すると同時に，顔側面部近赤外光測定装置(HITACHI, WOT-S20)を装着し浅側頭動脈の Oxy-Hb 値を経時的に測定した．味覚刺激は，基準刺激として水を，対象刺激としてクエン酸溶液(3.26 mM, 6.52 mM, 32.6 mM)を用いた．10 秒間口に含んで吐き出した．刺激は 4 分あるいは 6 分間隔で行った．【結果と考察】耳下腺唾液分泌はクエン酸刺激後直ちに増加して，ピークに達した後に減少した．耳下腺唾液分泌に僅かに遅れて Oxy-Hb 値が増加・減少した．クエン酸濃度が高くなるほど，最初のピーク値から基準値に戻るまでの両値の変化に有意な相関性が認められた．ピーク後 90 秒間の唾液分泌量と Oxy-Hb 積分値はクエン酸の濃度依存的に増加した．さらに，耳下腺唾液分泌量と Oxy-Hb の積分値との間には強い相関性が認められた．以上より，耳下腺唾液の分泌が起こると，それに見合った分の唾液を生成するため，僅かに遅れて血液が供給されることが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Relationship between parotid salivary secretion and hemodynamic change of superficial temporal artery after citric acid stimulation

○Kuroki A[1,2], Ono K[1], Hitomi S[1], Yamashina R[3], Obata A[4], Yoshino K[2], Inenaga K[1]

[1]Div Physiol, Kyushu Dent Univ
[2]Dept Oral Health Management, Kyushu Dent Univ
[3]Hitachi High-Tech, Corp
[4]Hitachi, Ltd

Since a major source of constituents such as fluid and electrolyte in saliva is the blood, an increase of salivary secretion is accompanied with an increase of blood volume. We investigated correlations between parotid salivary secretion and oxygenated hemoglobin signal（Oxy-Hb）of superficial temporal artery following citric acid stimulation. Here, Oxy-Hb value has been reported to indicate change of blood volume. Parotid salivary secretion was measured with a modified Lashley cup and Oxy-Hb around the superficial temporal artery was measured with Wearable Optical Topography（WOT-S20, HITACHI）in ten healthy subjects. Citric acid was used as stimulant（oral rinse for 10 sec）. After stimulation, parotid saliva was immediately increased and gradually decreased. OXY-Hb followed it with a slight delay. Significant relationships in returning to the basal levels from the first peaks between parotid salivary flow rate and Oxy-Hb were clearly found in higher concentrations of citric acid. Saliva and integrated Oxy-Hb values after the first peaks were increased in concentration-dependent manners. Further, a significant relationship was found between the saliva and the integrated Oxy-Hb. These suggest that blood is supplied after parotid saliva secretion, to produce the amount of saliva secreted.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-24　SNAP23 ノックアウト HAP1 細胞の機能解析

○荒川　俊哉[1]，岡山　三紀[2]，溝口　　到[2]，田隈　泰信[1]

[1]北医療大　歯　生化
[2]北医療大　歯　歯科矯正

【目的】我々はこれまでの研究で，イソプロテレノール刺激した耳下腺で SNAP23 が VAMP2 と一過性の複合体を形成するなど，調節的分泌では重要な役割を果たしているものの，siRNA を用いた解析により，培養細胞の構成的分泌には必須ではないことを報告してきた．しかし SNAP23 のノックアウト（KO）マウスは胎生 3.5 日で死滅するため，SNAP23 KO 細胞の機能解析は進んでいない．そこで今回 HAP1 細胞を用い SNAP23 の KO 細胞を作成し，その機能解析を試みた．【方法】人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を用い SNAP23 の KO 細胞を作成した．KO 細胞の標的配列を増幅し，シークエンスを解析した．KO 細胞と対照細胞の増殖速度と分泌機能を比較するとともに，DNA マイクロアレイにより遺伝子発現の違いを網羅的に解析した．【結果】遺伝子配列解析の結果，KO 細胞の SNAP23 遺伝子には 2 塩基の欠失が認められた．ウエスタン解析で SNAP23 タンパク質は検出されなかった．KO 細胞は，増殖速度が正常細胞に比べ約 40％低下したが，分泌型ルシフェラーゼ（CLuc）の分泌では両者に差はほとんど認められなかった．遺伝子発現を網羅的に解析したところ，レチノイン酸合成酵素やホメオボックス遺伝子など，発生・分化に関わるいくつかの遺伝子に強い発現低下が認められた．【結論】SNAP23 遺伝子の KO は，構成的分泌には影響がしないが，発生・分化に関わる遺伝子発現に影響している可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Study of function in SNAP23 knockout HAP1 cells

○Arakawa T[1]，Okayama M[2]，Mizoguchi I[2]，Takuma T[1]

[1]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido
[2]Div Orthod, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Objectives: We previously reported that isoproterenol treatments transiently increased SNARE complexes containing SNAP23 and VAMP2 in rat parotid gland, suggesting that SNAP23 plays an important role in the regulated exocytosis. On the contrary, nearly 90% knockdown of SNAP23 by specific siRNAs failed to block constitutive exocytosis from HeLa cells. SNAP23 knockout mice were reported to cease their development at 3.5 embryonic days. Thus, for the first time we prepared SNAP23 KO cells and evaluated the role of SNAP23 in HAP1 cells. Methods: SNAP23 KO cells were prepared by CRISPUR/Cas9. Cell proliferation and constitutive secretion were compared between normal HAP1 cells and SNAP23 KO cells. The gene expression was comprehensively analyzed by DNA microarray. Results: The KO cells had a 2-base-deletion in SNAP23 gene and SNAP23 was undetectable by western blotting. The growth rate of the KO cells was decreased by 40%, although the constitutive exocytosis was not markedly influenced. SNAP23 KO markedly decreased the expression of some genes that are involved in embryonic development and differentiation. Conclusion: These results suggest that SNAP23 KO had little effect on constitutive exocytosis, if any, but robustly perturbed the gene expressions that are critically engaged in embryonic development.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-25 幼若マウス耳下腺腺胞細胞における抗菌タンパク質 Bpifb1 の一過性発現上昇

○梨田　智子[1]，吉江　紀夫[2]，吉村　　建[3]，下村-黒木　淳子[4]，辻村麻衣子[2]，佐藤　律子[5]

[1]日歯新潟　生化
[2]日歯新潟　解剖 2
[3]日歯新潟　解剖 1
[4]日歯新潟　小児歯
[5]日歯新潟　短大

【目的】我々は，シェーグレン症候群モデル動物として使用されている非肥満型糖尿病（NOD）マウスの耳下腺腺胞細胞において，抗菌タンパク質の一種である Bpifb1 の mRNA（*Bpifb1*）が高発現していることを報告した（2nd IADR-APR, 2013）．さらに，*Bpifb*1 は正常マウス耳下腺でも成長過程において一過性に発現している現象が見られたので，今回正常マウスにおける発達および加齢による *Bpifb1* 発現の変化を明らかにすることを目的として本研究を行った．
【方法】正常マウスとして C57BL/6（C57BL/6JJcl）と ICR 系統のマウスを，さらに NOD（NOD/ShiJcl）マウスを比較のため用いた．胎生期の発現は Mouse MTC™ Panel I, cDNA（Clontech）を用いて検討した．*Bpifb1* の発現は cDNA microarray analysis, RT-PCR, real-time PCR および *in situ* hybridization により調べた．Bpifb1 タンパク質の発現は Western blotting および免疫組織染色により検討した．
【結果】耳下腺における *Bpifb1* の発現は，糖尿病の有無に関わらず，5～53 週齢の NOD マウスで有意に高かった. 8 週齢以降の正常な成獣マウスでは *Bpifb1* の発現は低レベルを維持していたが，5 週齢までの幼若マウスの耳下腺腺胞細胞および胎生後期においては高発現を示した．
【考察】*Bpifb1* の発現は正常な成獣マウス耳下腺腺胞細胞では低レベルであったが，正常マウスでも幼若期の耳下腺および胎生後期において一時的に Bpifb1 の高発現が認められたことから，Bpifb1 は自然免疫応答により発現上昇するだけではなく，発達過程においても何らかの役割を持つと考えられる．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Transient up-regulation of Bpifb1 expression in parotid acinar cells of infant mice

○Nashida T[1]，Yoshie S[2]，Yoshimura K[3]，Shimomura-Kuroki J[4]，Tsujimura M[2]，Sato R[5]

[1]Dept Biochem, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[2]Dept Histol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[3]Dept Anat, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[4]Dept Pediatric Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[5]Dept of Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata

**Objective:** Previously we reported up-regulation of mRNA expression of antibacterial protein; Bpifb1 in parotid acinar cells from non-obese diabetic（NOD）mice which are model mice for Sjogren's syndrome（2nd IADR-APR, 2013）. We further found the transient expression of Bpifb1 mRNA（*Bpifb1*）in parotid acinar cells of the normal C57BL/6（C57BL/6JJcl）mice in their developmental period. Here, we investigated the change of *Bpifb1* expression in their developmental or aging processes of the normal mice in order to define the role of Bpifb1.
**Methods:** Female C57BL/6 mice, mail ICR mice, and female NOD（NOD/ShiJcl）mice were used. Embryonic C57BL/6 cDNA in a Mouse MTC™ Panel I kit was used. Expression of *Bpifb1* was examined by cDNA microarray analysis, RT-PCR, real-time PCR, and *in situ* hybridization.
**Results:** The acinar cells in the C57BL/6 and ICR mice showed low expression of *Bpifb1* at the age over 8 weeks, but showed significantly high expression in 5 weeks old and in the fetus late stages mice.
**Conclusions and Discussion:** These results suggest that Bpifb1 has some roles in the developmental processes as well as in the innate immune response.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-26 胎仔マウス顎下腺における5-メチル化シトシンと5-ヒドロキシメチル化シトシンのダイナミクス

○林　　徹，小山　典子，水越　堅詞，柏俣　正典

朝日大　歯　薬理

DNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を調節し維持する仕組み，いわゆるエピジェネティクスを制御する機構として，シトシン塩基5位の炭素のメチル化（5-mc）が知られている．通常，5-mcは遺伝子発現の抑制に関係しており，例えば細胞分化にはメチル化パターンの変動を介した遺伝子発現制御機構が寄与している．近年，5-mcがさらに水酸化された5-ヒドロキシメチル化（5-hmc）という新規の塩基修飾が報告された．現在，5-mcから5-hmcへの変換はDNAが能動的脱メチル化される際に最も重要な反応であると考えられている．

胎仔マウス顎下腺（SMG）は器官発生の研究に利用されてきたモデル器官で，胎生期15日（E15）頃から分化し始めることが知られている．そのため，分化が始まる前後の時期にはSMGのDNAメチル化状態が変動すると考えられた．そこで本研究では，分化が始まるE15前後のSMG（あるいはそれらに相当する時間だけ培養したSMG）を用いて，5-mcおよび5-hmc変動パターンとその分布を，whole mount免疫染色にて調べた．

ICR系妊娠マウスを用いてE13，E14，E15，E16の胎仔マウスからSMGを採取した．また，E13 SMGを24時間，48時間，72時間，器官培養した．これらを免疫染色し共焦点顕微鏡で観察したところ，胎生期や培養時間に関わらずSMGの間葉で5-mcおよび5-hmcの強いシグナルが得られた．上皮の5-mcは全てのSMGで同程度のシグナルが得られた．しかしながら，E15 SMGおよび48時間培養後のSMG上皮において，5-hmcシグナルの著しい増強が見られた．このことから，胎仔マウス顎下腺上皮の分化には5-hmc，すなわち脱メチル化が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcitosine in fetal mouse submandibular gland development

○Hayashi T，Koyama N，Mizukoshi K，Kashimata M

Dept Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent

Methylation at the 5-position of cytosines（5-mc）is an important component of the epigenetic code, and is generally associated with gene repression. Alteration of 5-mc patterns contributes to the regulation of gene expression and cell specification. Recently, a novel cytosine modification, 5-hydroxymethylcytosine（5-hmc）, has been discovered. This conversion of 5-mc to 5-hmc is so far the most important and consistent mechanism underlying the active demethylation of DNA.

Fetal mouse submandibular gland（SMG）has been used to study organogenesis. Major cytodifferentiation is observed at E15. Therefore, it is reasonable to think that DNA methylation undergoes dynamic changes during the differentiation. This study investigated the temporal-spatial patterns of both 5-mc and 5-hmc in the developing SMG around E15 *in vivo*（E13, E14, E15, and E16）and *in vitro*（0 h-, 24 h-, 48 h-, and 72 h-cultured E13 SMG）using whole-mount immunofluorescence analysis.

The intensities of both 5-mc and 5-hmc signals were strong in mesenchyme. In epithelium, the 5-mc signal was detected at similar levels among all SMGs. However, strong 5-hmc staining started to appear drastically in the epithelium at the E15 and the 48 h cultured-SMG, suggested that the 5-hmc enrichment in the epithelium is related to the differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-27　唾液腺傷害時と回復時における前駆細胞マーカーの発現

○横山　　愛，加藤　　治，吉垣　純子

日大松戸歯　生理

【目的】唾液腺は唾液を分泌する器官であり，大唾液腺は左右で対に存在する．頭頸部癌の治療のための放射線照射により唾液腺がダメージを受けると，唾液分泌量は低下する．しかし，照射範囲が片側である場合には，非照射側の唾液腺が唾液分泌機能を補うという報告がある．大唾液腺は独立した臓器である．それにも関わらず，傷害側の機能を補うということは傷害側と非傷害側の唾液腺間でなんらかのコミュニケーションがあることが予測される．本研究は，唾液腺の代償性メカニズムを解明することを目的として，片側に傷害を受けた唾液腺と反対側の非傷害側の唾液腺について神経幹細胞マーカーである nestin の発現変化を検討した．【方法】マウス片側耳下腺排泄導管をマイクロクリップにて結紮後 4，7 日目に耳下腺を摘出した．また，結紮 7 日目にクリップの結紮を開放し，その後 3，5，7 日目に耳下腺を摘出した．全てのサンプルに HE 染色とイムノブロット法を施した．【結果】HE 染色では，結紮期間中には徐々に腺房細胞が萎縮し，炎症性細胞の増加が観察された．開放後では時間経過に伴い，萎縮していた腺房細胞が回復していた．非結紮側では全てのタイムポイントで変化が見られなかった．nestin のタンパク質発現量は結紮期間では結紮側で nestin の発現量が非結紮側と比べて増加した．一方で，開放後では結紮側の nestin の発現量が減少し，非結紮側の発現量が増加した．【結論】片側の唾液腺を傷害することで，傷害側のみならず非傷害側の唾液腺において nestin の発現量が増加した．従って，傷害側から非傷害側へなんらかのシグナル伝達があることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of precursor cell marker during injury and recovery in salivary gland

○Yokoyama M，Katsumata-Kato O，Fujita-Yoshigaki J

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

The injury of salivary gland causes the decline in ability to salivate. There are some reports that when one side of salivary gland receives injury, the other side of gland compensates for its function. In this study, for the purpose of analysis on compensatory mechanism, we examined the expression of stem cell marker nestin in both injured and opposite side of salivary glands. We carried out unilateral mouse parotid duct ligation and then released it. We compared expression of nestin in ligation and non-ligation side by immunoblot. The atrophy of acinar cells was observed in the ligation side. The parotid gland that has been released from duct ligation showed recovery from injury. During duct ligation, expression level of nestin was increased in the ligation side compared with the non-ligation side. After release of duct ligation, expression level of nestin was decreased in the ligation side. On the other hand, the expression level was continuously increased in the non-ligation side. Tissue injury by duct ligation induced the nestin expression both in ligated and non-ligated sides of salivary glands. Therefore, it was suggested that there are some kind of signaling pathways to the opposite side from the injured side.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-28 加齢に伴う唾液アミノ酸変動のメタボローム解析

○田中　庄二[1]，秋田紗世子[1]，谷口　　潔[1]，片山　　直[1]，坂上　　宏[2]

[1]明海大　歯　口腔診断
[2]明海大　歯　薬理

【目的】我々は，唾液中の水溶性低分子の中で相対的な量が多いアミノ酸に着目し，運動，食事，ストレス，加齢等に伴う量的変動を調べてきた．近年，開発された質量分析装置を用いたメタボローム解析技術を用いて我々は，加齢に伴い Gly, Pro が一定の比率を保ち増加することを前回報告した．本研究では，小児の唾液や成人の唾液の比較，更に成人の中でも年齢や歯周病の進行度に応じてどのように唾液中の代謝物が変化するか更に詳細に検討した．【方法】学内倫理委員会のガイドラインに従い，新たに小児（年齢：5～11 歳，男児 11 名，女児 3 名）及び 100 人の成人及び高齢者（年齢：27～98 歳，男性 23 名，女性 77 名から唾液を採取し，メタボローム解析を行った．【結果と考察】ヒートマップ上でのプロファイルでは，小児患者では全体的に均一なプロファイルになっており，成人では 濃度が高く，比較的分散したプロファイルになった．加齢に伴い Pro, Asp, Lys が他のアミノ酸に比べ顕著に増加した．特に，Gly 濃度は，細菌由来の口臭原因物質であるブチル酸と同程度の濃度まで達した．Gly と Pro 比は，成人（$R=0.8328$, $p<0.0001$）と同様に，小児（$R=0.9451$, $p<0.0001$）で一定値を示した．全代謝物質で $R>0.8$ 以上をつないだ相関ネットワークでは，Gly-Pro はやはり他のネットワークに含まれず単独で存在しているので，他と独立した動態を示すと考えられた．Pro/Gly 比は，口腔内または唾液腺状態を反映する指標になる可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Metbolomic analysis of age-related changes of salivary amino acids

○Tanaka S[1]，Akita S[1]，Taniguchi K[1]，Katayama T[1]，Sakagami H[2]

[1]Dept General Cli Dent, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent

We have previously reported the fluctuation of salivary amino acids during exercise, meal, stress and aging process. Using recently developed metabolomics analysis, we have reported that ratio of glycine/proline remained constant regardless of age. We investigated here the changes of salivary metabolites as a function of age and progression of periodontal diseases, with 14 children（5～11 years old）and 100 adults（27～98 years old）under the guideline of intramural ethic committee. The present study demonstrated that glycine, aspartic acid and lysine increased most prominently than other amino acids. Especially, glycine level in elderly persons reached comparable level with butanoate, a bacterial product that causes bad breath. Glycine/proline ratio was constant in both child（$R=0.9451$, $P<0.0001$）and adults（$R=0.8328$, $P<0.0001$）. Glycine and proline showed different patterns from other metabolites in correlation network with $R>0.8$. Proline/glycine ratio thus can be a marker that reflects the oral and salivary gland state.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-29 唾液ヒスタチンによるペプチドグリカンの Toll 様受容体 2 シグナル抑制

○今村　泰弘[1]，王　　宝禮[2]，十川　紀夫[1]

[1]松本歯大　歯科薬理
[2]大阪歯大　教育開発

【目的】唾液蛋白質ヒスタチンは自然免疫因子であり，歯周病原菌などに対して抗菌作用を有する．これまでに我々は，ヒスタチンが熱ショック蛋白質 HSC70 による Toll 様受容体 2（TLR2）及び TLR4 のシグナル伝達を抑制することについて示した．また，ヒスタチンは HSC70 刺激によるヒト歯肉繊維芽細胞（HGFs）の炎症性サイトカイン産生を抑制することも示唆した．本研究では菌体成分ペプチドグリカン（PGN）による TLR2 シグナル伝達に及ぼすヒスタチンの影響について検討した．【方法】TLR2 と CD14 を恒常的に発現している HEK293 細胞に NF-κB 結合配列含有ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し，ヒスタチン 3 存在下で *S. aureus*，*B. subtilis*，*E. coli* 由来 PGN にて刺激した．その後，細胞抽出液を調製し，ルシフェラーゼアッセイを行った．また，ヒスタチン 3 存在下で PGN を HGFs に添加後，IL-6，IL-8 の産生量を ELISA で測定した．【結果】上記 3 種の PGN 刺激による TLR2 シグナルを介した NF-κB の活性化は，ヒスタチン 3 存在下で抑制された．また，PGN 刺激による HGFs の IL-6，IL-8 の産生量は，ヒスタチン 3 存在下で減少した．【考察】ヒスタチン 3 は PGN 刺激による TLR2 シグナル活性化（特に NF-κB 活性化）を抑制し，HGFs の炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった．これらは，ヒスタチン 3 が口腔内で菌体成分由来 PGN による炎症誘導の抑制に関与することを示唆する．ヒスタチンは抗菌作用のみならず抗炎症作用にも関与する自然免疫因子であると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Inhibition of the peptidoglycan-mediated Toll-like receptor 2 signaling by salivary histatin

○Imamura Y[1]，Wang PL[2]，Sogawa N[1]

[1]Dept Pharmacol, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Dent Educ Innov, Osaka Dent Univ

［Purpose］Salivary histatins are innate immune factors, which have antimicrobial activities against periodontal pathogens. We have previously reported that histatin 3 inhibits heat shock protein HSC70-mediated Toll-like receptors（TLRs）2 and 4 signaling. Our studies also showed that histatin 3 inhibits the production of inflammatory cytokines by HSC70 in human gingival fibroblasts（HGFs）. Here, we examined the effects of histatin on TLR2 signaling by a bacterial component, peptidoglycan（PGN）. ［Methods］PGN（from *S. aureus*, *B. subtilis*, or *E. coli*）and histatin 3 was added to HEK293 constitutively expressing TLR2 and CD14 transfected with the NF-kappaB-dependent luciferase reporter plasmid. The cell lysates were prepared, and luciferase assays were performed. PGN and histatin 3 were added to HGFs, and the amounts of IL-6 and IL-8 released into the culture media were measured by ELISAs. ［Results］The activation of NF-kappaB and the production of IL-6 and IL-8 through TLR2 by PGN were inhibited by histatin 3. ［Conclusions］Histatin 3 inhibits PGN-mediated TLR2 signaling, thereby decreasing the production of inflammatory cytokines. These results suggest that histatin 3 may serve as a suppressive peptide for PGN-inducible inflammation in oral cavity. Consequently, histatin 3 has not only the antibacterial action but also anti-inflammatory effects.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-30　プロタミン分解ペプチド（HAP-100）は薬物性唾液腺機能低下を改善する

○大久保みぎわ[1]，川口　　充[2]，四宮　敬史[1]，塚越　絵里[1]

[1]東歯大　薬理
[2]東歯大

【目的】向精神薬，高血圧症治療薬，抗ヒスタミン薬など様々な薬物が口腔乾燥症の原因として問題となっているが，この症状を改善する治療薬は少ない．ムスカリン性薬物のピロカルピンやセビメリンが口腔乾燥症の治療に用いられるが，副作用も強く，新しい治療・改善物質の開発が望まれている．我々は非ムスカリン性物質による口腔乾燥症改善の可能性について，サケ白子由来のタンパク質であるプロタミンに着目した．これまでに，プロタミンの分解産物である HAP-100 を用いた研究において，唾液分泌促進作用や放射線障害からの口腔粘膜保護作用があることを明らかにした．本研究では顎下腺灌流装置を用いて，薬物性唾液分泌低下に対する HAP-100 の回復効果を調べた．【方法】ウィスター系雄性ラットの顎下腺動脈，顎下腺静脈，および，顎下腺分泌導管に実体顕微鏡下にてカニューレーションを行った後，HBSS（0.5 ml/min）を灌流させ顎下腺灌流系を作成し，ムスカリン受容体アゴニストのカルバコール（CCh:$10^{-6}$M）刺激時の唾液分泌量を測定した．【結果と考察】抗ヒスタミン薬のジフェンヒドラミン（$10^{-5}$M），三環系抗うつ薬のアミトリプチリン（$10^{-5}$M），利尿薬のブメタニド（$10^{-5}$M）向精神薬のジアゼパム（$10^{-6}$M）は CCh 刺激唾液分泌をそれぞれ 46，52，58，70％に低下させた．一方，抗うつ薬（SSRI）のパロキセチン（$10^{-5}$M），抗がん剤のシスプラチン（$10^{-5}$M）および，Ca 拮抗薬のアムロジピン（$10^{-5}$M）は本実験のような単回投与ではほとんど分泌抑制作用を示さなかった．抑制作用を示した薬物に対して HAP-100 を併用したところ，1～5 μg/ml で最大 50％前後の用量依存性の回復効果が認められた．以上の結果，プロタミン分解ペプチド（HAP-100）は薬物性唾液腺機能低下を改善することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## HAP-100, a fragment of protamine, is available for recovery of drug-induced xerostomia

○Okubo M[1]，Kawaguchi M[2]，Shinomiya T[1]，Tsukagoshi E[1]

[1]Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll
[2]Tokyo Dent Coll

HAP-100, a fragment of protamine, is available for recovery of drug-induced xerostomiaXerostomia, which caused serious oral dysfunction, is induced by many drugs, including psychotropic drugs, antihypertensive drugs and antihistamine. However, there are only a few recovery agents from xerostomia, such as muscarinic agent, pilocarpine and cevimeline. and induce strong side effects. We therefore seek non-muscarinic agents for improving xerostomia. This study investigated that HPA-100, a fragment of protamine from chum salmon milt, was available for recovery of drug-induced salivary dysfunction using rat submandibular gland perfusion method. The rat submandibular gland artery, veins, and duct were cannulated in situ and hank's balanced salt solution（pH 7.4）was perfused at a rate of 0.5 ml/min together with carbachol（CCh: $10^{-6}$ M）. The CCh-induced salivary secretion was decreased by diphenhydramine（$10^{-5}$M）, amitriptyline（$10^{-5}$M）, bumetanide（$10^{-5}$M）and diazepam（$10^{-6}$M）to 46％, 52％, 58％ and 70％, respectively. Whereas, paroxetine（$10^{-5}$M）, amlodipine（$10^{-5}$M）and cisplatin（$10^{-5}$ M）had no affects at single application. The inhibitory effects of each drugs were recovered with HAP-100（1-5 μg/ml）approximately 50％. These results suggested that protamine hydrolysate peptides（HAP-100）recovered from drugs-induced salivary dysfunction.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-31 膜融合分泌顆粒におけるアクチン被覆形成の分子機構 ―生体内顕微鏡によるリアルタイムイメージング解析―

○設楽　彰子

米国立衛生研　歯科　頭蓋顔面研

Regulated exocytosis は神経伝達，呼吸，消化，生殖，免疫応答などの様々な生理機能を制御する刺激依存性の開口分泌機構である．これまでの多くの研究からその分子機構が明らかになってきたが，分泌顆粒の膜融合以降の過程には未だ不明な点が多い．以前の研究で我々は，唾液腺細胞において膜融合した分泌顆粒上に形成されたアクトミオシン複合体からなる被覆が，顆粒の収縮を促進することにより内容物を放出させることを明らかにした．しかし分泌顆粒膜上にアクチン線維が集積する仕組みは不明であった．本研究ではアクチン線維形成の仕組みに着目し，開口分泌過程におけるアクチン形成促進分子の動態とその機能的役割を調べた．アクチン線維は構造の違いにより直鎖状と分枝状の二種類に分類され，それぞれ異なる分子により形成が制御される．免疫組織化学的解析 から，膜融合した分泌顆粒上に直鎖状および分枝状アクチン線維のそれぞれのアクチン形成促進分子が集積することが示された．アクチン形成促進分子の開口分泌における役割を調べるために，薬理学的解析およびノックアウトマウスを用いた解析に生体内イメージングを組み合わせて，アクチン形成促進分子を阻害または欠失させた条件下で開口分泌を観察したところ，膜融合した分泌顆粒の拡大および分泌顆粒の収縮の遅延が認められた．これらの結果から膜融合した分泌顆粒の収縮を促進する“機能的な ”アクチン被覆を形成するためには直鎖状と分枝状両方のアクチン線維形成が必須であることが明らかになった．膜融合した分泌顆粒上に集積したアクチン線維は ミオシンなどの様々な分子を顆粒上に 集積させる足場となることで，膜融合以降の分泌過程を制御していると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular mechanism of actin-coat formation on the membrane-fused secretory granules ―Realtime imaging analysis with intravital microscope―

○Shitara A

IMTS, OPCB, NIDCR, NIH

Regulated exocytosis is a stimulus-dependent exocytosis to regulate various physiological functions. Although its molecular mechanisms have been elucidated by a lot of previous studies, there are many unclear points for the processes after the secretory granules（SGs）fusion. In the previous study, we have shown actomyosin-complex coats the membrane-fused SGs, and facilitates collapse of the fused-SGs to extrude their contents in salivary cells. However, the machinery which mediates F-actin assembly onto the fused-SGs is not clear. In this study, we focus on the mechanisms of actin-filament nucleation, and examined the behavior and functional role of actin nucleation promoting factor（NPF）during exocytosis. Through immunohistochemical analysis, we identified both linear and branched NPFs are accumulated on the fused-SGs. To examine the functional role of NPFs, we combined the intravital imaging with a pharmacological approach or knockout mouse approach, and observed the exocytosis under inhibition or depletion of NPFs, and we observed the expansion of fused-SGs and delay of the fused-SGs's collapse. These results showed that both linear and branched actin filaments are necessary to constitute the functional actin-coat which facilitates collapse of the fused-SGs, and actin-coat is likely to serve as scaffold to recruit the molecules that regulate post-fusion exocytosis event.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-32 耳下腺腺房細胞における MARCKS リン酸化と局在変化のイソプロテレノール誘発性アミラーゼ分泌への関与

○佐藤慶太郎[1]，成田　貴則[2]，加藤　　治[3]，杉谷　博士[2]

[1]獨協医大　医　生理
[2]日本大　生物資源　獣医生化
[3]日大松戸歯　生理

Myristoyrated alanine-rich C kinase substrate（MARCKS）は PKC の主な基質として知られている．MARCKS はいくつかの細胞において膜輸送への関与が考えられている．MARCKS は PKC によりリン酸化を受けると，細胞膜から細胞質へ局在を変化させる性質をもつ．また，MARCKS は脂質ラフトでのホスホイノシタイドの調節を通じて，アクチン細胞骨格の調整に関与しているという報告がある．耳下腺腺房細胞において，βアドレナリン受容体の活性化はアミラーゼの開口分泌を引き起こす．本研究は，ラット耳下腺腺房細胞を用いて，βアゴニストであるイソプロテレノール（IPR）誘発性アミラーゼ分泌における MARCKS リン酸化と局在変化を検討した．IPR 刺激は MARCKS のリン酸化ならびに細胞膜から細胞質への局在変化の関与を引き起こした．ショ糖密度勾配遠心法を用いて界面活性剤（1% Triton X-100）不溶画分を分離し，GM1a をマーカーとして脂質ラフトを解析した．無刺激時は GM1a-rich なマイクロドメイン（GM1a-rich DRMs）に MARCKS が検出されたが，IPR 刺激によりその量は著しく減少した．一方，MARCKS 特異的阻害剤である MANS ペプチドを腺房細胞に作用させると，IPR 刺激をしても GM1a-rich DRMs に MARCKS が検出された．さらに MANS ペプチドは IPR 刺激によるアミラーゼ分泌を抑制した．以上の結果から，耳下腺腺房細胞において MARCKS リン酸化と局在変化が IPR 誘発性アミラーゼ分泌に関与することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of MARCKS phosphorylation and translocation in isoproterenol-induced amylase release in parotid acinar cells

○Satoh K[1]，Narita T[2]，Kato O[3]，Sugiya H[2]

[1]Dept Regul Physiol, Dokkyo Med Univ Sch Med
[2]Lab Vet Biochem, Nihon Univ Coll Bioresource Sci
[3]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent Matsudo

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate（MARCKS）is known as a major cellular substrate for protein kinase C（PKC）. MARCKS is implicated in membrane trafficking in several cell types. Phosphorylation of MARCKS by PKC results in MARCKS translocation from the membrane to the cytosol. MARCKS has been reported to be involved in the actin cytoskeleton regulation through the modulation of phosphoinositide in lipid rafts. In parotid acinar cells, activation of β-adrenergic receptors provokes exocytotic amylase release. Here, we investigated the involvement of MARCKS phosphorylation and translocation in the β-agonist isoproterenol（IPR）-induced amylase release in rat parotid acinar cells. When IPR induced MARCKS phosphorylation, MARCKS translocation from the membrane to the cytosol occurred. Lipid rafts isolated as detergent-resistant membranes（DRMs）were separated by sucrose density-gradient centrifugation from the acinar cells lysed with 1% Triton X-100. MARCKS was found in monosialoganglioside GM1a-rich DRMs, but which markedly decreased in IPR-stimulated cells. When IPR stimulated cells in the presence of MARCKS-related peptide（MANS）, a MARCKS inhibitor, the decrease of MARCKS in GM1a-rich DRMs was prevented. The MANS peptide inhibited the IPR-induced amylase release. These results suggest that MARCKS phosphorylation and translocation are involved in IPR-induced amylase release in parotid acinar cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-33 ラット耳下腺分泌顆粒のタンパク質濃縮機構における膜ドメインの関与

○加藤　治，横山　愛，吉垣　純子

日大松戸歯　生理

耳下腺腺房細胞の分泌顆粒はゴルジ体から形成され，輸送小胞による膜のリモデリングを経て成熟していく．今回，我々は膜のリモデリング中に分泌タンパク質であるアミラーゼがどのように顆粒内に維持され，濃縮されるかを解明するため，顆粒に残る分泌タンパク質の性質と，顆粒から輸出される膜タンパク質の性質という 2 方向からの検討を行った．まず，分泌タンパク質自身に輸送シグナルが必要かどうかを検討するため，未成熟顆粒に膜結合性も膜透過性もない蛍光色素であるルシファーイエロー（LY）をトレーサーとして取り込ませ，成熟後の細胞内局在を観察した．未成熟顆粒への局在は形態的，かつ機能的評価により確かめた．同細胞を 2 日間培養すると，分泌顆粒は細胞内に充満し，大きく成熟した．このとき LY の蛍光は一部の分泌顆粒と一致したままであった．この結果は輸送シグナルをもたないトレーサー分子でも成熟過程の間に排除さることなく，分泌顆粒内に維持されることを示している．つづいてその維持機構を解明するため，分泌顆粒膜より膜ドメインの分離を試みた．膜ドメインは精製した分泌顆粒を 1% Brij-58 で可溶化後，蔗糖密度勾配超遠心法にて分画し，輸出されるタンパク質である syntaxin 6 と VAMP4，およびアミラーゼの各抗体を用いそれらの分布を検討した．未成熟顆粒の GM1a-膜ドメインには Syntaxin 6 と VAMP4，さらにアミラーゼ抗体に反応するバンドが検出された．一方，成熟顆粒ではアミラーゼ抗体に反応するバンドが GM1a-膜ドメインに検出されたが，Syntaxin 6 と VAMP4 は別の膜ドメイン画分に検出された．これらの結果は輸送小胞の出芽領域から分泌タンパク質の隔離機構に膜ドメインが関与していることを示しており，この膜ドメインの制御機構が顆粒内への分泌タンパク質濃縮機構に重要な働きをしていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The membrane microdomains is related to the concentration of secretory proteins into the rat parotid granules

○Katsumata-Kato O，Yokoyama M，Fujita-Yoshigaki J

Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Acinar cells of parotid gland are filled with many secretory granules（SGs）, which concentrate the digestion enzyme amylase. Although the maturation of SGs is accompanied with membrane remodeling such as fusion and budding of small vesicles, SGs contents are concentrated during maturation. To understand the mechanism, first, we examined whether secretory proteins need a specific signal to be retained in SGs. Lucifer Yellow（LY）dye as a tracer was internalized into new-formed SGs via the endocytosis pathway. The localization of LY into new-formed SGs was confirmed by morphological and functional studies. After cell culture for 2 days, we observed co-localization of LY and amylase. These results indicate that secretory proteins do not need a specific signal to be retained in SGs. Next, to examine the mechanism of retainment, we separated membrane microdomains from SGs. On the new-formed SGs, syntaxin 6, VAMP4 and amylase were detected in GM1a-rich domains. On the other hand, syntaxin 6 and VAMP4 were detected in the different membrane microdomains with amylase on the matured SGs. These results suggest that the membrane microdomains relate to concentration of SGs contents by separation of secretory proteins from budding site of small transport vesicles.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-34 アセチルコリン刺激によって惹起される顎下腺全体で同期する $Ca^{2+}$ オシレーションの発生機構

○根津　顕弘，森田　貴雄，谷村　明彦

北医療大　歯　薬理

【目的】唾液腺の水・イオン分泌は，腺房細胞の $Ca^{2+}$ 応答によって調節されている．これまでに我々は，生きたラット顎下腺の $Ca^{2+}$ 応答を可視化する intravital イメージング法により，低濃度のアセチルコリン（ACh）刺激によって顎下腺全体で同期した $Ca^{2+}$ オシレーションが起こることを見出し，本学会で報告した（第 56 回学術大会）．本研究では，薬物刺激によって起こる $Ca^{2+}$ オシレーションの発生機構を明らかにするため，顎下腺の $Ca^{2+}$ 応答および血流動態の生体イメージングにより解析した．【方法】顎下腺開口部から逆行性にウイルスベクターを注入し，非侵襲的に腺房細胞に蛍光 $Ca^{2+}$ センサーを発現させた．麻酔したラットの顎下腺を露出し，薬物の持続的な静脈投与による腺全体の蛍光比変化をマクロズーム蛍光顕微鏡により測定した．顎下腺の血流変化は，二次元血流計を用いて測定した．【結果と考察】低濃度 ACh（$3-9\times10^{-8}$ mol/min）刺激で顎下腺全体に同期した $Ca^{2+}$ オシレーションが惹起された．一方で，アドレナリン，サブスタンス P およびベタネコールでは，この $Ca^{2+}$ オシレーションは観察されなかった．ACh による $Ca^{2+}$ オシレーションは，アトロピンで完全に抑制され，ヘキサメトニウムおよびプラゾシンでは抑制されなかった．これらの結果は，$Ca^{2+}$ オシレーションの発生に交感神経系の関与がないことを示唆している．顎下腺の $Ca^{2+}$ 応答と血流動態を同時に測定すると，$Ca^{2+}$ オシレーションと同期した血流量の変動が観察された．血管拡張薬であるニフェジピンを前投与し，ACh 投与を行ったところ，$Ca^{2+}$ 応答と血流動態のオシレーション様反応の頻度は大きく減少した．【結論】ACh は，ムスカリン受容体を介して顎下腺全体で同期する $Ca^{2+}$ オシレーションを引き起こす．この $Ca^{2+}$ オシレーションの制御に，血管拡張と収縮による血流動態の変動が重要な役割を果たすことが明らかとなった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Mechanisms of acetylcholine-induced tissue-wide synchronization of $Ca^{2+}$ oscillations in rat submandibular gland

○Nezu A，Morita T，Tanimiura A

Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

To investigate the effect of $Ca^{2+}$ response on salivary secretion in live animals, we monitored agonist-induced $Ca^{2+}$ dynamics in rat submandibular gland（SMG）using the intravital $Ca^{2+}$ imaging system. The intravenous infusion of acetylcholine（ACh）induced $Ca^{2+}$ responses throughout the SMG in a dose-dependent manner（$3-36 \times 10^{-8}$ mol/min), and the tissue-wide synchronization of $Ca^{2+}$ oscillations were frequently observed at low concentrations（$3-9 \times 10^{-8}$ mol/min). Unlike ACh, adrenaline, substance P and bethanechol did not induce $Ca^{2+}$ oscillations. The ACh-induced $Ca^{2+}$ oscillations were completely blocked by atropine, but not by hexamethonium and prazosin, suggesting that the involvement of the activation of a sympathetic ganglion was not involved. When the blood flow was monitored with $Ca^{2+}$ responses using the laser speckle imaging flowmeter, the ACh-induced changes in the blood flow in SMG were synchronized with $Ca^{2+}$ oscillations. Preadministration of nifedipine strongly reduced the frequency of ACh-induced $Ca^{2+}$ oscillations and synchronized fluctuation of blood flow changes. These results suggest that the changes in blood flow via vasodilatation and vasoconstriction in SMG plays an important role for the tissue-wide synchronization of $Ca^{2+}$ oscillations.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-35　液状飼料飼育がラット顎下腺・舌下腺の成長に与える影響について

○高橋　　茂[1]，上北　広樹[2]，井上貴一朗[1]，土門　卓文[1]

[1]北大　院歯　口腔機能解剖
[2]北大　院歯　冠橋義歯補綴

【目的】演者らは昨年度の本学会において成長期ラットを液状飼料で飼育すると耳下腺の成長は阻害されること，これには腺房細胞の大きさの増加の抑制と増殖活性の抑制が関与していることを報告した．今回さらに組織学的構造の異なる顎下腺・舌下腺の成長にはどのような影響が及ぶのかについて検討した．【方法】実験には Wistar 系雄性ラットを用いた．3 週齢で離乳し，直後より対照群の動物には通常の固形飼料，実験群には粉末飼料に水を加えて作製した液状飼料を 0〜8 週間与えた．実験期間が終了した動物には 5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）を投与し，1 時間後に顎下腺と舌下腺を摘出，湿重量を測定した．試料より通法に従って HE 標本を作製し組織学的に検索するとともに腺房細胞の増殖活性を測定するために抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を行い，BrdU 陽性率を算出した．【結果と考察】顎下腺では，湿重量は対照群，実験群ともに実験期間中増加傾向を示し，両群間に有意差は認められなかった．組織学的には対照群では 0 週の腺房細胞は小型であったが経時的にその大きさが増加し，実験群の腺房細胞もほぼ同様の変化を示していた．腺房細胞の BrdU 陽性率は両群ともに経時的に減少し，各期間における有意差は認められなかった．舌下腺では，湿重量や組織学的変化に関しては顎下腺と同様に対照群と実験群の間に差異は認められなかった．腺房細胞の BrdU 陽性率は両群とも経時的に減少傾向を示し 4 週までは有意差が認められなかったが，8 週では実験群の方が対照群よりも有意に低かった．以上の結果より，成長期における液状飼料飼育は顎下腺に対しては影響を与えず，舌下腺に対しても軽度な影響しか及ぼさないことが明らかとなった．また，このような影響は成長が大きく阻害される耳下腺とは異なると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of liquid diet on growth of rat submandibular and sublingual glands

○Takahashi S[1]，Uekita H[2]，Inoue K[1]，Domon T[1]

[1]Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[2]Dept Crown Bridge Prosthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

The purpose of this study is to clarify how liquid diet affects growth of rat submandibular and sublingual glands. Male Wistar rats were weaned on day 21 after birth and fed a pellet diet for control group or a liquid diet for experimental group from 0 to 8 weeks. Then submandibular and sublingual glands were taken, weighed, and examined histologically and immunohistochemically using antibody to 5'-bromo-2-deoxyuridine（BrdU）. Submandibular and sublingual gland weights increased during experimental period, and there were no significant differences between control and experimental groups at each time point. Histological structures of submandibular and sublingual glands in control rats were normal at 0 week with small acinar cells, which grew thereafter. Both glands in experimental animals were histologically similar to controls. BrdU-labeling indices of acinar cells in control submandibular glands was not significantly different from those in experimental ones at all time points. In sublingual glands, there were no significant differences between two groups until 4 weeks, however BrdU-labeling index of acinar cells in experimental group was significantly lower than in control at 8 weeks. The above observations showed that liquid diet had no or a little effects on growth of rat submandibular and sublingual glands.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-36　難消化性糖類の経時的摂取がラット唾液中 IgA 濃度に与える影響

○山本　裕子[1]，東　　雅啓[2]，清水　智子[2]，猿田　樹理[2]，槻木　恵一[2]

[1]神奈川歯科短大　院歯
[2]神奈川歯科大　口腔病理診断

【目的】唾液中には多量の IgA が含まれており，この IgA が上気道感染症の感染防止に大きく関与していることが報告されている．我々はラットに 3 週間難消化性糖類を摂取させることで，盲腸内容物中だけでなく顎下腺組織中 IgA 濃度，唾液中 IgA 濃度および分泌速度が増加することを明らかにしてきた．そこで本研究では，ラットに難消化性糖類を摂取させる期間を変えた場合，盲腸内容物中 IgA 濃度と唾液中 IgA 濃度が増加するかどうかを検討した．【方法】AIN76 のコーンスターチ 15.0%とセルロース 5.0%をグラニュー糖に置き換えた無繊維固形飼料を対照飼料として，5.0%フラクトオリゴ糖添加飼料，2.5%ポリデキストロース．2.5%ラクチトール添加飼料を調整した．Wistar 系ラット（オス 5 週令）を 3 群に分け，各飼料を自由摂取させ，1 週間，4 週間，8 週間後に盲腸内容物と唾液を採取した．盲腸内容物中と唾液中 IgA 濃度を ELISA 法にて測定した．盲腸内容物の pH は pH メーターにて測定した．【結果考察】唾液中 IgA 濃度と分泌速度は，1 週間，4 週間，8 週間後のいずれにおいても，難消化性糖類添加群でコントロール群に比較して有意に高い値が認められた．盲腸内容物中 IgA 濃度は，4 週間，8 週間後においては，難消化性糖類添加群でコントロール群に比較して有意に高い値が認められた．しかし 1 週間後においては，難消化性糖類添加群でコントロール群に比較して有意に低い値が認められた．盲腸内容物の pH は 1 週間，4 週間，8 週間後のいずれにおいても，難消化性糖類摂取群でコントロール群に比較して有意に低い値が認められた．以上の結果から，難消化性糖類摂取 1 週間から 8 週間では，ラット唾液中 IgA 濃度および分泌速度が増加することが示唆された．盲腸内容物中 IgA 濃度は，難消化性糖類摂取 1 週間ではそれ以前に摂取していたエサの影響が残存することが示唆された．盲腸内容物の pH 低下は発酵を示しており，唾液中 IgA 濃度および分泌速度の増加には盲腸内における発酵が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Intake of indigestible carbohydrates for the different periods influence immunoglobulin A concentrations of the rat saliva

○Yamamoto Y[1]，Tou M[2]，Shimizu T[2]，Saruta J[2]，Tsukinoki K[2]

[1]Dept Junior Coll, Kanagawa Dent Univ, Sch Dent Hygiene
[2]Dept Oral Sci, Div Environmental Pathol, Kanagawa Dent Univ, Grad Sch Dent

**Purpose:** Secretory IgA in the saliva is essential for protection from mucosally transmitted pathogens and maintaining homeostasis at mucosal surfaces of the oral cavity. We previously showed that, when rats were treated with indigestible carbohydrates for 21 days, the IgA levels are significantly increased in the caecal digesta, the submandibular gland tissue and saliva. In this study, we investigated the influence of indigestible carbohydrates on IgA production and pH level in the caecal digesta and saliva. **Material&Methods:** Five-week-old rats were fed a fibre-free diet, that with 5% fructooligosaccharide (FOS), or a combination of 2.5% polydextrose (PDX) and 2.5% lactitol for 7, 28 or 56 days. The concentrations of IgA in the caecal digesta and saliva of rats were quantified by ELISA. The pH level of the caecal digesta was measured by the pH meter. **Results:** For all the periods, pH levels and IgA concentrations of rats treated with the indigestible carbohydrates were significantly higher than the control group in the caecal digesta and saliva, except that IgA concentration of the caecal digesta was significantly lower for 7 days treatment.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-37　エキソソームによる Ro/SS-A および La/SS-B の細胞外分泌

○相田　美和，織田　公光

新潟大　院医歯　口腔生化

シェーグレン症候群は全身性の自己免疫疾患であるが，主として唾液腺と涙腺の機能が障害されるため，ドライマウスやドライアイの症状を呈することとなる．最近，抗 Ro/SS-A あるいは抗 La/SS-B 自己抗体がシェーグレン症候群患者の血清中に発症前から存在することが報告された．自己抗体が産生されるメカニズムの詳細はまだ明らかになっていないが，抗原となる自己タンパクの供給源として，エキソソームとアポトーシス小胞がその候補として考えられている．エキソソームは多種の細胞が分泌する直径 20～100 nm の膜小胞で，分泌する細胞種に依ってさまざまなタンパク質や核酸を含んでいる．正常に機能する腺組織をもつ発症前の患者がすでに自己抗体を保有していたことから，今回，我々は抗原タンパク質の細胞外への放出について，エキソソームに焦点をあてて解析した．ヒト顎下腺由来細胞株 A-253 が分泌するエキソソームを培養上清から分離して，それに含まれるタンパク質をウエスタンブロットで解析したところ，自己抗体の抗原タンパク Ro/SS-A および La/SS-B が検出された．唾液腺細胞は抗原タンパクをエキソソーム含有タンパクとして細胞外へ分泌していることを示している．さらに，TNF$\alpha$ 添加条件下で培養した A-253 細胞では，細胞ライセートの La/SS-B および Ro/SS-A タンパクに変化はなかったが，エキソソームでは両タンパク共に増加していた．炎症状態ではエキソソーム含有タンパクとして，Ro/SS-A および La/SS-B タンパクの細胞外への分泌が亢進していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Release of Ro/SS-A and La/SS-B into the extracellular space as an exosomal protein

○Sohda M，Oda K

Div Oral Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

Sjogren's syndrome is a systemic autoimmune disease that mainly affects the functions of the salivary and lacrimal glands, resulting in dry mouth and dry eyes. Recently, it was reported that anti-Ro/SS-A and/or anti-La/SS-B autoantibodies were detected in the sera of patients before the onset of the disease. Exosomes are membrane vesicles 20 – 100 nm in diameter, secreted from many cell types and containing a variety of proteins and nucleotides according to the cell origin. Although the mechanism of the production of autoantibodies remains unclear, exosomes and apoptotic vesicles have been considered as a candidate for the source of autoantigens. As the reported autoantibodies for Sjogren's syndrome were produced in presymptomatic patients with normal salivary glands, we examined the release of Ro/SS-A and La/SS-B proteins into the extracellular space, by focusing on exosomal proteins. Results from immunoblotting showed that Ro/SS-A and La/SS-B proteins were detected in exosomes secreted from human submandibular gland cell line A-253, and increased by TNFalpha. These results suggest that the release of the antigen proteins into the extracellular space is enhanced under the inflammatory conditions.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-38 耳下腺におけるムスカリン受容体作用薬による水チャネル・AQP5の細胞核への移動とその役割

○Bragiel Aneta, Pieczonka Tomasz, 石川　康子

徳島大　院医歯薬　分子薬理

## Muscarinic agonist-induced trafficking of AQP5 to nuclei and its role in rat parotid glands

○Bragiel A, Pieczonka T, Ishikawa Y

Dept Pharm, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

The activation of muscarinic acetylcholine receptor（mAChR）induces the trafficking of aquaporin-5（AQP5）to nuclei in parotid acinar cells. We investigated the mechanisms and the function underlying trafficking of AQP5 to nuclear membrane（NM）. Methods: Immunoconfocal and immunoectron microscopy and Western blotting were used. To clarify the characteristics of membrane, detergent solubility and sucrose-density flotation experiments were performed. Results: Under control conditions, AQP5 was diffusely distributed on the apical plasma membrane（APM）, apical plasmalemmal region and throughout the cytoplasm. Upon mAChR activation, AQP5 was predominantly located in NM and APM. AQP5 levels were enhanced in isolated nuclei and both inner and outer NM prepared from parotid tissues incubated with mAChR agonist. mAChR agonist induced AQP5 levels in both soluble and insoluble NM solubilized with detergents. Small amounts of AQP5 in nuclei were detected using low-density sucrose gradient. When AQP5 was present in NM, nuclear size decreased. Discussion: The activation of mAChRs induces the trafficking of AQP5 to nuclei together with sphingolipid-rich and cholesterol-poor vesicles. AQP5 in NM may trigger the movement of water, inducing shrinkage of the nucleus. This small shrinkage opens the nuclear pore complex, allowing the free diffusion of water and molecules to start gene transcription or translation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-39 新規無血清培養液 MSC-T4 を用いたヒト歯根膜幹細胞の増殖能および多分化能解析

○村林　大，中原　貴

日本歯大　生命歯　発生　再生

【目的】我々は，ヒト抜去歯由来歯根膜幹細胞（PDLSC）が腸骨由来骨髄幹細胞よりも高い増殖能を持ち，同等の多分化能を有することを明らかにした．しかし，臨床応用を考慮すると，培養に用いたウシ胎仔血清（FBS）は感染のリスクがあるため，無血清での培養が望まれる．本研究は，PDLSC の培養に，新たに開発された無血清培養液 MSC-T4 と FBS 含有培養液での幹細胞特性の比較解析を行った．【方法】27 歳女性の抜去智歯から酵素法にて PDLSC を分離し，15% FBS 含有 DMEM/F12 にて初代培養を行った．継代時に FBS 含有培養液（FBS 群）と MSC-T4 で培養を行い，継代数 3 で実験に供した．実験は，増殖曲線，細胞周期解析，Population doubling time，表面抗原解析，RT-PCR，骨，脂肪，軟骨，神経の各分化誘導による多分化能評価を行った．【結果】細胞増殖は，MSC-T4 群で 10 日目から有意に増殖した（P＜0.01）．細胞周期解析では，MSC-T4 群で G2/M 期の割合が 6 日目から有意に高く，G0/G1 期では有意に低かった（P＜0.01）．Population doubling time は，MSC-T4 群で 22.5 時間，FBS 群で 30.6 時間であった．表面抗原解析は，両群で CD44，CD90，CD105 陽性および CD14，CD34 陰性であった．RT-PCR は，骨，神経，多能性幹細胞の各マーカー遺伝子の発現を認めた．骨，脂肪，軟骨，神経細胞の多分化能評価は，MSC-T4 群は FBS 群と同程度の分化能を示した．【考察】MSC-T4 群の細胞増殖は，FBS 群よりも顕著に高く，表面抗原および遺伝子発現パターンに変化を認めず，同等の多分化能を有することが明らかとなった．以上より，MSC-T4 培養液は，PDLSC の幹細胞特性を維持し，短期間での細胞獲得が期待できる無血清培養液であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Proliferative and multidifferentiation potential of human periodontal ligament stem cells under serum-free culture condition

○Murabayashi D，Nakahara T

Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

［Introduction］Previously, we isolated and characterized periodontal ligament stem cells（PDLSCs）using fetal bovine serum-containing growth medium（FBS+GM）. However, culture with FBS+GM might cause risk for clinical applications due to infection. Thus, we developed FBS-free medium, MSC-T4, examining whether it can maintain stem cell potentials.［Materials and methods］PDL tissues derived from wisdom tooth of a healthy volunteer were digested by enzyme. Isolated cells were cultured in either DMEM/F12 containing 15% FBS（FBS+GM）or MSC-T4 up to passage 3. PDLSCs were subjected to a proliferative assay, cell cycle analysis, population doubling time, RT-PCR, flow cytometry, and multidifferentiation induction into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and neurogenic lineages.［Results］MSC-T4 cells exhibited significantly greater growth than FBS+GM cells（P＜0.01）. Cell cycle analysis also revealed that MSC-T4 cells contained a significantly higher percentage in the G2/M phase but lower percentage of cells in the G0/G1 phase than the FBS+GM cells（P＜0.01）. Both groups positively showed CD44, CD90, and CD105 markers, and expressed osteogenic, neurogenic, and stem cell marker genes. However, they demonstrated similar results of multidifferentiation.［Conclusions］These results suggest that MSC-T4 culture medium established efficient for the maintenance of the stem cell phenotype and functions, which further promotes stem cell proliferation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-40 硬組織形成期歯胚における Glucose related protein-78 タンパクの発現局在について

○永田　健吾，和田　裕子，藤原　弘明，三上友理恵，神野　彰子，安部みさき，
清島　　保

九大　院歯　病理

【目的】Glucose related protein-78（GRP78）は，分子シャペロンとして，小胞体ストレス時に小胞体の恒常性維持に作用し，抗アポトーシス機能を発揮していることはよく知られている．最近，GRP78 の機能について，間葉組織の石灰化に関与していることが報告された．しかし，上皮組織の石灰化に関する GRP78 の機能については不明な点が多い．今回の研究は，エナメル質形成期の歯胚を対象に，GRP78 の歯胚組織での発現局在を検索し，上皮組織の石灰化における GRP78 の役割を明らかにすることを目的としている．
【方法】胎齢 17 日，生後 5 日齢のマウス下顎第一臼歯および 15 日齢の下顎切歯をサンプルとした．サンプルは浸漬固定し，通法によりパラフィン標本を作製した．切片作製後，抗 GRP78 抗体を用いて酵素抗体法にて免疫染色を行い，ジアミノベンチジンにより可視化した．
【結果】胎齢 17 日，硬組織形成前鐘状期の臼歯歯胚では，GRP78 は上皮性歯胚組織に，ほとんど発現していなかった．生後 5 日齢，硬組織形成期の臼歯歯胚では，エナメル芽細胞に GRP78 の強発現を認めたが，ヘルトビッヒ上皮鞘に弱い発現を示した．また，エナメル芽細胞に相対する象牙芽細胞における GRP78 の発現は，エナメル芽細胞に比べて弱かった．生後 15 日齢の切歯では，切縁側から一連のエナメル芽細胞に GRP78 の強発現を認めたが，エナメル器に近づくと減弱していた．歯槽骨の骨芽細胞に GRP78 の発現は弱かったが，破骨細胞に強発現を認めた．
【結論】臼歯および切歯における分泌期のエナメル芽細胞に GRP78 が強発現していることから，GRP78 は上皮組織の石灰化に重要な役割を担っていることが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunoexpression of glucose related protein-78 in the mouse molar and incisor teeth during tooth development

○Nagata K，Wada H，Fujiwara H，Mikami Y，Jinno A，Abe M，Kiyoshima T

Dept Oral Pathol, Fac Dent, Kyushu Univ

Glucose related protein-78（GRP78）, one of molecular chaperones, is known to maintain endoplasmic reticulum（ER）environment and promote cell survival against the ER stress. Recently, an involvement of GRP78 during the mineralization of mesenchymal tissues, such as bone and dentin, is reported. However, it is not well understood the role of GRP78 during enamel formation. To clarify the role of GRP78 on the mineralization of odontogenic epithelium, we examined the immunoexpression of GRP78 in the mouse tooth germs and incisor teeth. Enamel organ was weakly positive for GRP78 on embryonic day 17. Ameloblasts and odontoblasts of molar tooth germ on postnatal day 5 were intensely and weakly positive for GRP78, respectively. Hertwig's epithelial root sheath was also weakly positive for GRP78. Ameloblasts of the incisor tooth on postnatal day 15 were also intensely positive for GRP78. In conclusion, it is suggested an involvement of GRP78 in enamel formation, because the intense expression of GRP78 is observed in the secretory ameloblasts during the development of molar and incisor teeth.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-41　ラット歯原上皮におけるケラチン・ビメンチンの発現様式

○伊東　博司，櫻井　裕子，遊佐　淳子

奥羽大　歯　口腔病理

【背景】歯原上皮における種々のサイトケラチンの発現状況は，歯原上皮の部位あるいは発育時期により異なるといわれ，ときには歯原上皮細胞が間葉系細胞のマーカーであるビメンチンを発現することもあるとされているが，詳細については不明な点が多い．【目的】ラット歯原上皮におけるサイトケラチンとビメンチンの発現様式を免疫組織化学的に解明する．【方法】1 日齢ラットから下顎を採取して，ホルマリン固定，EDTA 脱灰ののちにパラフィン切片を作製した．切片は，4 種の抗サイトケラチン抗体（AE1/AE3，MNF116，CAM5.2，ポリクローナル抗サイトケラチン抗体［poly-CK］）と抗ビメンチン抗体を用いた免疫染色，およびサイトケラチンとビメンチンの二重蛍光免疫染色を行ってから，光学顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡で観察した．【結果】内エナメル上皮細胞またはエナメル芽細胞では一部の細胞が AE1/AE3，MNF116，poly-CK による染色で陽性を示した．エナメル髄では，ほとんどの細胞が AE1/AE3 で陽性で，一部の細胞が MNF116 染色と poly-CK 染色で陽性となった．歯堤の大部分の細胞は AE1/AE3 染色，MNF116 染色で陽性となり，一部の歯堤細胞は poly-CK 染色で陽性を示した．ヘルトヴィッヒ上皮鞘では一部の細胞に AE1/AE3，MNF116，poly-CK の陽性反応が観察された．今回の免疫染色では歯原上皮に CAM5.2 の陽性所見は見られなかった．ビメンチンの局在は内エナメル上皮細胞またはエナメル芽細胞，エナメル髄細胞およびヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞のいずれも一部に観察され，それら細胞ではサイトケラチンとビメンチンの同時発現も見いだされた．【考察】歯原上皮の部位により，サイトケラチンの発現様式が異なることが明らかとなり，また，一部の歯原上皮細胞ではサイトケラチンとビメンチンの共発現が確認された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression pattern of keratin and vimentin in rat odontogenic epithelium

○Ito H，Sakurai Y，Yusa J

Div Oral Pathol, Ohu Univ Sch Dent

In order to investigate the expression pattern of cytokeratin and vimentin in odontogenic epithelium of a rat, the rat mandible was dissected and processed for immunohistochemical examination of the expression of cytokeratins and vimentin. Four anti-cytokeratin antibodies; AE1/AE3, MNF116, CAM5.2, and polyclonal anti-cytokeratin (poly-CK) antibodies were used for immunohistochemistry. Double immunofluorescence was performed with anti-cytokereatin antibody and anti-vimentin antibody. Some of the internal enamel epithelial cells or ameloblasts exhibited positivity for AE1/AE3, MNF116, and poly-CK. Most of stellate reticulum cells in enamel organ were positive for AE1/AE3. Some of the stellate reticulum cells showed expression of MNF116 and poly-CK. Dental lamina cells were mostly positive for AE1/AE3, MNF116. In Hertwig's epithelial sheath, some cells were stained with AE1/AE3, MNF116, and poly-CK antibodies. No positive reaction to CAM5.2 antibody was observed in the odontogenic epithelium. Vimentin was detected in some of internal enamel epithelial cells or ameloblasts, stellate reticulum cells, and Hertwig's epithelial sheath cells. In the vimentin positive cells, coexpression of cytokeratin and vimentin were revealed thorough double immunofluorescence. It was demonstrated that there was a spatial difference in cytokeratin expression pattern among anti-cytokeratin antibodies, and it was also demonstrated that some odontogenic epithelial cells coexpress both cytokeratin and vimentin.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-42　口蓋裂を伴う A/J マウス胎仔における骨形成因子の発現

○前川眞見子[1]，森　　明弘[1,2]，駒田　致和[1]，池田やよい[1]

[1]愛院大　歯　解剖
[2]愛院大　歯　口腔先天異常

口唇口蓋裂は，口蓋発生の異常による，ヒトで最も多い先天異常の一つである．口蓋の発生は，マウスでは胎齢 13.5 日頃から始まる．胎齢 14.5 日において，左右の口蓋棚は舌背の上方に垂直位から水平位に挙上し，口蓋棚の内側部の上皮が接着，癒合して，胎齢 17.5 日までには口蓋の形成が完了する．A/J 系統マウスは，自然発生的に口唇口蓋裂を 8-12.1％の頻度で生じ，ヒトの口唇口蓋裂の動物モデルとして用いられてきた．今回我々は，A/J マウスの口唇口蓋裂の発生の分子機構を明らかにする目的で，正常な口蓋を有する個体と口蓋裂を有する個体について，口蓋発生期における二つの骨形成因子，Runt-related transcription factor 2（Runx2）と Osterix（Osx）の発現を免疫組織化学法を用いて調べた．その結果，胎齢 16.5 日，18.5 日において，正常マウスでは，口蓋正中の口蓋突起癒合部において，Runx2 と Osx の発現が認められた．一方，口蓋裂マウスでは口蓋棚は左右とも挙上しておらず，下垂したままの口蓋棚の内側に，Runx2 と Osx の発現が認められた．すなわち，口蓋裂の有無により口蓋棚の形態に明らかな違いはあるものの，口蓋裂がある場合でもこれら骨形成因子は口蓋棚に発現していた．したがって，Runx2 と Osx は口蓋発生過程における口蓋棚の挙上には直接関係しないことが示唆される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of osteogenic factors in the cleft palate of the A/J mouse embryo

○Maekawa M[1]，Mori A[1,2]，Komada M[1]，Ikeda Y[1]

[1]Dept Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent
[2]Div Res Treat Oral Maxillac Congen Anom, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Cleft lip and/or palate, which are caused by aberrant palatal development, are known as one of the most numerous congenital anomalies in human. Palate development begins around embryonic day 13.5（E13.5）in the mouse. At E14.5, the shelves elevate to a horizontal position above the dorsum of the tongue and the medial edge epithelia of the right and left horizontal palatal shelves contact, adhere and fuse along their midline. By E17.5, the continuous palate is formed. The A/J mouse strain, in which the incidence of spontaneous cleft lip and palate is 8％-12.1％, has been used as an animal model for human cleft lip and palate. In the present study, we examined expression of osteogenic factors, Runx2 and Osterix, during palate development of the A/J mouse with or without cleft palate, using immunohistochemistry. Both factors were expressed in the shelves both with and without cleft palate of the A/J mouse at E16.5 and E18.5. These results suggest that Runx2 and Osterix are not directly involved in the elevation of palatine shelves.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-43 in vivo electroporationを用いたBMP遺伝子導入による筋内異所性骨誘導における未分化間葉系細胞の動態について

○河井まりこ[1]，片岡　陽平[1]，池亀　美華[1]，大浦　　清[2]，山本　敏男[1]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態
[2]大阪歯大

われわれはこれまでに骨形成因子（Bone Morphogenetic Protein: BMP）遺伝子発現非ウイルス性ベクターとin vivo electroporationを併用した骨誘導系を確立した．現在，臨床応用に向けて骨誘導過程での細胞動態を明らかにし，安全性の確立を目指している．特に筋内異所性骨誘導においては筋肉由来の未分化間葉系細胞と骨髄由来細胞が骨関連細胞への分化に関与することが考えられている．今回，筋内異所性骨誘導過程における細胞動態を明らかにするために筋肉由来未分化間葉系マーカーを用いた免疫組織学的解析により経時的な細胞動態の変化を解析した．また，骨髄由来細胞の動態についてはCD34などのマーカーを用いた免疫組織学的解析に加え，GFP transgenic ratからの骨髄移植を施行したラットにおいて筋内異所性骨誘導過程における骨髄由来細胞の動態を解析した．ラット下腿筋内にBMP遺伝子をin vivo electropopraitionの併用により導入するとCD68陽性の炎症性細胞の浸潤とともに筋組織の炎症像が認められた．筋肉由来の未分化細胞とされる筋肉衛星細胞のマーカーであるPAX7陽性細胞は正常筋線維においては少ないが，炎症性細胞浸潤が多くみられる筋線維では非常に多くの陽性細胞が観察された．BMP遺伝子導入7日後には筋線維間に紡錘形の細胞の集積が認められた部位が認められ，空ベクター群ではこのような紡錘形の細胞の集積は認められなかった．この細胞集団においてはBMP-2陽性で，また，PAX7やMyoDといった筋由来の細胞マーカーも一部の細胞で陽性であった．CD34についてはDABによる染色法では検出できなかった．これらの結果からラット筋内へのin vivo electroporationを用いたBMP遺伝子導入では筋肉由来の未分化間葉系細胞が骨誘導に大きく関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Stem cell population in the bone induction of muscles BMP gene transfer red using in vivo electroporation

○Kawai M[1]，Kataoka Y[1]，Ikegame M[1]，Ohura K[2]，Yamamoto T[1]

[1]Dept Oral Morpho, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm Sci
[2]Osaka Dent Univ

We previously developed a novel method for gene transfer, which is transcutaneous in vivo electroporation. We applied this method to transfer Bone Morphogenetic Protein（BMP）gene and induced ectopic bone formation in the skeletal muscle. But, it is still unclear that which kinds of cells populate and differentiate into osteogenic cells. In skeletal muscles, there are two kinds of stem cells, which can differentiate osteogenic cells. One is muscle-derived stem cells, and the other is bone marrow-derived stem cells from blood flow. In the present study, we injected BMP gene expression vector, pCAGGS-BMP, in the skeletal muscles of rats and immediately electroporated under conditions 100 V, 50 msec., and 8 pulses. We observed time course sections after BMP gene transfer into the skeletal muscles of rats. Then, we performed immunohistochemical analyses using several muscle- or bone marrow-derived stem cell markers. We found ectopic bone formation in the skeletal muscles 10 days after BMP gene transfer. We hypothesized that cell population seven days after BMP gene transfer is important for stem cells to differentiate osteogenic cells. The cell population has both potential for regeneration of muscles without BMP and differentiation for osteogenic cells with BMP.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-44　VEGF-C は骨髄由来間葉系幹細胞の増殖や遊走を促進する

○五十嵐靖之[1]，帖佐　直幸[2]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，近藤　尚知[1]，石崎　　明[2]

[1]岩医大　歯　補綴　インプラント
[2]岩医大　歯　生化

【目的】 近年，間葉系幹細胞（MSC）の組織再生療法への応用が注目されている．我々は，GFP マウスの骨髄より脂肪細胞や骨芽細胞への分化能力の異なる 3 系統の MSC 株（SG2，SG3，SG5）を樹立し，その特性について解析した．SG2 は，TGF-$\beta$1 に高い感受性を示し，マウス MSC マーカーである Sca-1 を最も強く発現し，骨芽細胞ならびに脂肪細胞への高い分化能を有していた．本研究では，SG2 が特異的に発現する遺伝子を同定するとともに，その遺伝子産物が MSC に与える影響について解析した．【方法】 上記 3 つの MSC 株の間で発現量が異なる遺伝子を DNA マイクロアレイで網羅的に検索した結果，血管内皮細胞増殖因子受容体 3（VEGFR3）が同定された．加えて，その遺伝子の発現の程度について，フローサイトメトリーを用いて確認した．また，その遺伝子産物が MSC の幹細胞性の発現にどのように影響するかについて調査した．なお，本研究は岩手医科大学動物実験委員会の承認（23-075）を得て行われた．【結果】 フローサイトメトリーの結果から，SG2 の細胞表面に VEGFR3 の発現が確認されたが，SG3 ならびに SG5 では検出されなかった．また，各 MSC 株を VEGF-C で処理したところ，細胞増殖能ならびに細胞遊走能ともに SG2 のみで有意に促進された．さらに，SG2 における VEGF-C 処理は ERK1/2 のリン酸化を増強した．【考察および結論】 我々が樹立した MSC 株の中で，SG2 のみで VEGFR3 を発現することが確かめられた．また，SG2 を VEGF-C で処理すると ERK1/2 のリン酸化が増強されることから，VEGF-C/VEGFR3 は細胞内シグナル伝達経路である MAP キナーゼカスケードの活性化を経て，細胞増殖能ならびに細胞遊走能の促進が予測された．したがって，VEGFR3 を発現する MSC 株を VEGF-C で処理すると ERK1/2 依存的に MSC における幹細胞性の発現に重要である細胞増殖能ならびに細胞遊走能を促進することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## VEGF-C enhances proliferation and migration ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

○Igarashi Y[1]，Chousa N[2]，Kyakumoto S[2]，Kamo M[2]，Kondo H[1]，Isisaki A[2]

[1]Dept Prosthodont Oral Implantol, Sch Dent, Iwate Med Univ
[2]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ

［Purpose］In recent years, application to the tissue regeneration therapy of mesenchymal stem cells（MSC）has been attracting attention. We have established MSC lines of three strains（SG2, SG3, SG5）with different abilities to differentiate into osteoblasts and adipocytes from the bone marrow of GFP mice. In this study, we tried to identify genes differentially expressed among MSC lines, analyzed the effects of the gene products on the stemness expression of MSCs.［Methods］The gene expressions differentially expressed among these cell lines were analyzed by DNA microarray. Then, we evaluated how the gene products affect proliferative and migratory abilities of MSCs.［Results］Results of the comparison of gene expression patterns among these cell lines revealed vascular endothelial growth factor receptor 3（VEGFR3）was expressed in SG2. The expression of VEGFR3 on the cell surface of SG2 was detected by flow cytometry, but not on the cell surface of SG3 and SG5. VEGF-C induced proliferative and migratory activities of SG2. We found VEGF-C upregulated the phosphorylation status of ERK1/2.［Discussion and Conclusion］It was suggested VEGF-C/VEGFR3 promotes proliferative and migratory activities of some MSCs through ERK1/2-dependent pathway. Thus, VEGF-C/VEGFR3 axis seems to play important roles on the stemness expression of MSCs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-45　骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導

○中塚美智子[1]，松田　哲史[1]，細矢　明宏[2]，隈部　俊二[1]

[1]大阪歯大　口腔解剖
[2]松本歯大　口腔解剖Ⅱ

【目的】下顎頭は表層に線維層および線維軟骨層を有し，再生手法も確立されていないため再生が極めて困難である．本研究では下顎頭欠損部の再生を目指して，ラット脛骨骨髄から採取した細胞を用い，下顎頭の軟骨層を形成する細胞への効率的な分化誘導法を検討した．【方法】Wistar系雄性ラット5匹（5週齢）の脛骨骨髄を無菌的に摘出し，細胞を単離した．100 ng/ml BMP-2，100 ng/ml IGF-I，100 ng/ml TGF$\beta$-3，50 $\mu$g/ml ascorbic acid，$10^{-7}$M dexamethasone（DEX）を培地に添加し，コラーゲンゲルを用いて三次元培養を行った．分化誘導開始7，14，17，21日後にゲルを回収し，凍結切片を作製した後，通法によりアルシアンブルー，ALPase，アリザリンレッドS染色を行った．さらに，軟骨細胞への分化を確認するため，Type-I collagenおよびType-II collagen，Sox9の発現を免疫組織化学的染色によって検索した．【結果】BMP-2，IGF-I，TGF$\beta$-3，ascorbic acid，DEXを培地に添加し培養すると，培養14日後よりアルシアンブルーによる著明な染色像が得られた．一方，ALPaseおよびアリザリンレッドSによる著明な染色像は得られなかった．また，培養開始14日後以降にType-II collagenの著明な染色像が観察された．【結論】培地に添加する成長因子の組み合わせにより，骨髄由来細胞が軟骨細胞に分化することが示唆される．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A study of cartilage formation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*

○Nakatsuka M[1]，Matsuda Y[1]，Hosoya A[2]，Kumabe S[1]

[1]Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ
[2]Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ

To establish a model *in vitro* that demonstrates the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells, to regenerate mandibular condyle for the jaw deformity. We isolated mesenchymal cells from the rat bone marrow. The cells were maintained in the medium（50 $\mu$g/ml ascorbic acid and $10^{-7}$M dexamethasone（DEX）-containing）by adding growth factors for 7, 14, 17 or 21 days. Growth factors of 100 ng/ml BMP-2, 100 ng/ml IGF-I and 100 ng/ml TGF$\beta$-3 were used. Cell differentiation was evaluated by alcian blue staining. We examined the existence of anti-Type-I collagen, anti-Type-II collagen and anti-Sox9 immunoreactive cells in the cultures though the process of immunohistochemistry. In this instance, we used the media that contained the BMP-2, DEX, IGF-1 and TGF$\beta$-3, the cells were induced to differentiate into chondrocyte-like cells after 17 days of culture. The result suggests that a cocktail of BMP-2, DEX, IGF-1 and TGF$\beta$-3 significantly induced the bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into chondrocyte-like cells.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-46 摂食中枢と連動する生殖調節神経のネットワーク形成機構に対する実験発生学的解析: 哺乳類における GnRH ニューロンの移動経路の形成に対する前方中軸中内胚葉の役割

○今井　元，馬場　麻人

奥羽大　歯　生物

GnRH ニューロンは，頭顔面原基である鼻上皮から視床下部の視索前核に移動して，摂食中枢とネットワークを形成する．また，我々は，哺乳類の頭顔面や視床下部の初期発生には，前方中軸中内胚葉（AME）の誘導作用（Shh シグナリング）が必須であることを明らかにしてきた．したがって，『GNRH ニューロンの決定や移動においても，AME の誘導作用が必須である（仮説）』可能性が高い. しかしながら, その発生制御機構は解明されていない. そこで, 本研究では,『GnRH ニューロンの発生と移動の場の形成に対する AME 及び Shh の発生制御機構を解明すること』を目的とした．まず，胎齢 9.5 日のラット胚を用いて，1．AME の除去実験 2．Shh の中和抗体（5E1）による生体抗体染色 及び 3．阻害実験を行い，全胚培養系を用いて 6～72 時間の培養を行った．その結果，1. AME は，NE における Fgf-8 や Bmp-2 などの下流の遺伝子発現に重要であること，さらに，2. Shh の中和抗体（5E1）は，全胚培養下で AME に接着し，また，3．鼻上皮におけるなど神経発生に関わるの転写因子（Nkx2.1 や NeuroD1 など）の転写因子の産生を減少させることが明らかになった．これらの結果と対照的に，Shh の下流の転写因子である Gli1，Gli2 のダブル K.O.マウスでは，GnRH ニューロンは視索前核で観察される．4．また，Gli3 の K.O.マウスの解析においても，GnRH ニューロンは間脳の視索前野への移動が阻害されていたが，鼻上皮由来の鋤鼻器中で分化していた．したがって，AME は，Shh → Gli3 のカスケードを介して，GnRH-ニューロンの移動の場の形成に関与していることを示唆している．今後，確立した胎齢 9.5 日からの NP の 6 日間の長期全胚培養法を用いて，GnRH-ニューロンの初期発生に関わる AME の分子機構の解明の研究を推進する予定である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A inductive role of anterior axial mesendoderm in the determination of migratory pathway of GnRH-neuron in rat embryos

○Imai H，Baba O

Dept Biosci, Ohu Univ Sch Dent

GnRH neuron migrates to preoptic nucleus from nasal epithelium and forms a network of feeding center. In addition, we clarified that the Shh were essential for the induction of craniofacial structures and hypothalamus as well as anterior axial mesendoderm（AME）. Therefore, we hypothesized that the inductive potencies are required for the determination of migratory pathway for GnRH neuron. The aim of this study is to elucidate the developmental mechanism. To this end, we performed the loss of function with both surgical ablation of AME and a neutralizing antibody of Shh（5E1）in E9.5 rat embryos. The embryos were cultured for 72hours in the whole embryo culture system（WEC）. The surgical ablation resulted in the lack of transcripts of down-stream genes, such as Fgf-8 and Bmp-2, in nasal epithelium. Moreover, the application of 5E1 reduced the detection levels of transcription factors relating with neurogenesis, e.g. Nkx2.1 and neuroD1. In contrast with these results, it has been already shown that GnRH-neuron appears in the double K.O. mice of Gli1 and Gli2. Furthermore, we observed, in Gli3 K.O. mic, the immunoreactive cells against anti-GnRH antibody only in NP-derived vomeronasal organ. These results suggest that Shh contributes to the migration of GnRH-neuron through Gli3.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-47　3 種類の多孔性材料を足場として三次元培養したヒト毛細血管の長期観察

○岡村　友玄[1,2]，西川　哲成[1]，和唐　雅博[1]，富永　和也[1]，今井　弘一[1]

[1]大阪歯大　口腔病理
[2]大阪歯大　歯科理工

【目的】血管新生は，既存の血管から新たな血管枝が形成される現象であり，組織工学における重要な要素である．とくに損傷による臓器，組織の欠損が大である場合，創傷治癒を促進するために，生体外で形成される組織工学血管移植片（TEVG）を用いることが注目を集めている．培養で形成された血管を移植可能な大きさにまで形成させるためには三次元組織培養が必要であり，その足場の開発が求められている．今回，我々は粗な表面構造を有する 3 種類の多孔性材料を足場として線維芽細胞と毛細血管を三次元培養し，毛細血管の形成状態によって，足場材料の適性を検討した．【方法】足場材料として，滅菌した粒子状のサンゴ，人工焼成骨および人工軽石を用いた．正常ヒト皮膚線維芽細胞（HUVEC）と正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（NHDF）の両者について VEGF-A を含む血管新生用培地で共培養した．各粒子を添加後，14，21 および 28 日に細胞増殖を MTT 法で測定した．また 28 日後，毛細血管の形成を観察するために抗ヒト CD31 抗体で免疫組織学的に，そして核は DAPI にてそれぞれ染色した．これらを蛍光顕微鏡で観察し，画像処理ソフトによって三次元的に観察した．【結果】HUVEC と NHDF は各粒子添加後，粒子の周囲に増殖した．培養 21 および 28 日後では，サンゴ添加群と人工焼成骨添加群の細胞は人工軽石添加群に対して有意に高い増殖を示すことが認められた．毛細血管の三次元的形成は各粒子の周囲に認めた．人工軽石群ではサンゴ添加群および人工焼成骨添加群に比べ毛細血管の形成は少なく，粒子周囲以外の領域で二次元的な毛細血管の形成が多く認められた．【結論】3 種の多孔性材料のうち，サンゴと人工焼成骨を足場として用いることが毛細血管の三次元培養に適していると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Long-term observation of capillary formation in three-dimensional tissue culture using three kinds of porous materials as scaffold in vitro

○Okamura T[1,2]，Nishikawa T[1]，Wato M[1]，Tominaga K[1]，Imai K[1]

[1]Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ
[2]Dept Biomaterials, Osaka Dent Univ

Angiogenesis, which is an important factor in tissue engineering, is a phenomenon in which new blood vessels are formed from pre-existing ones. Transplanting tissue-engineered vascular graft（TEVG）into the host for promoting wound healing organ or tissue large defect due to injury is attracting attention. To grow into transplantable size, three-dimensional cultured capillaries are needed. A scaffold is needed to carry out three-dimensional culture for capillaries. In this study, we used three kinds of porous materials having a rough surface structure in order to explore the effect of the scaffold. Comparing the formation of capillaries in vitro, we conducted a usability examination of the scaffold. Human umbilical vein endothelial cells（HUVEC）and normal human dermal fibroblasts（NHDF）were co-cultivated. These were cultured for 14, 21, and 28 days. All three materials were added to the cultured tissue. Absorbance of formazan production was observed to determine the living cells. Capillary formation was observed with immunohistochemistry and fluorescence microscopy. The images of capillaries were processed three-dimensionally. Many living cells were observed around all three materials. Cell proliferation and capillary formation in both the coral and ceramic bone addition group were greater than those in the pumice addition group.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-48 ゲフィチニブ投与によるTGFβ3 ノックアウトマウスのp-Erk1/2 発現量および口蓋裂表現型の変化に関する研究

○杉山　明子[1]，引頭　　毅[2]，滝川　俊也[1]

[1]朝日大　歯　解剖
[2]朝日大　歯　口腔微生物

【目的】TGFβ3 ノックアウト（KO）マウスの口蓋裂表現型にはマウス系統差が存在するが，その原因は未解明のままである．我々はTGFβ3 KO マウス胎児の口蓋組織における上皮成長因子受容体（EGFR）の主要なシグナル伝達系であるp-Erk1/2 の発現量とTGFβ3 KO マウス2 系統（C57BL/6, ICR）の口蓋裂表現型との相関を調べた．さらに *in vitro* と *in vivo* でEGFR の特異的阻害剤であるゲフィチニブを投与してp-Erk1/2 の発現量と口蓋裂表現型に与える影響を調査した．
【方法】ゲフィチニブがICR およびC57BL/6J の2 系統の野生型マウス胎児のMEE 細胞に与える影響を単一口蓋突起回転培養法で解析した．また，両系統のTGFβ3 KO マウスの妊娠母獣にゲフィチニブを腹腔内投与して，ホモ胎児の口蓋裂表現型に与える影響を調査するとともに，口蓋からタンパク質を抽出してウェスタンブロッティングを行いErk1/2 のリン酸化の状態を調べた．
【結果と考察】C57BL/6J 系統の野生型胎児ではICR に比べてMEE 細胞の上皮－間葉分化転換（EMT）能力が著しく劣っており，ゲフィチニブはC57BL/6J 系統マウスのMEE 細胞のEMT 能力をICR 系統のそれと同等レベルに回復させることが判明した．また，完全口蓋裂のみを呈するC57BL/6J 系統TGFβ3 KO マウス母獣にゲフィチニブを投与し，胎児口蓋のp-ErK1/2 を調べたところ，p-Erk1/2 は不完全口蓋裂を呈するICR 系統マウスと同程度にまで減少した．さらに口蓋裂表現型を調べると不完全口蓋裂を呈するホモ胎児が認められた．これらの結果からゲフィチニブにより口蓋裂が軽症化することが明らかになった．このことからゲフィチニブなどの薬物投与による口蓋裂重症化抑制を標的とした予防的胎児薬物療法の実現の可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Study on the change in the expression level of phospho-Erk1/2 and the palatal cleft phenotype of TGFβ3 knockout mice by Gefitinib administration

○Sugiyama A[1]，Into T[2]，Takigawa T[1]

[1]Dept Oral Anat, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent

［AIMS］Cause of the strain-dependent phenotypic difference of the palatal cleft in TGFβ3 knockout（KO）mice remains unclear. We aimed at clarifying the cause using two different TGFβ3 KO mouse strains, C57BL/6J（BL/6）and ICR, because homozygote of TGFβ3 KO BL/6 mice showed complete palatal cleft only, while those of TGFβ3 KO ICR mice always showed incomplete palatal cleft.
［METHODS］We examined the expression level of phospho-Erk1/2 in the fetal palates of two TGFβ3 KO strains by Western blot analysis. In addition, we administrated Gefitinb, a specific inhibitor of EGFR, to TGFβ3 KO BL/6 fetal mouse palates growing *in vitro* and *in utero*, and examined the effects on the expression level of phospho-Erk1/2 and palatal cleft phenotype.
［RESULTS&DISCUSSION］*In vitro* analysis demonstrated that Gefitinib improved the disappearing ability of palatal medial edge epithelial cells of BL/6 fetuses. Suppression of EGFR function by Gefitinib resulted in the reduced expression level of phospho-Erk1/2 of TGFβ3 KO BL/6 fetal palates. Interestingly, it was found that some TGFβ3 KO BL/6 fetal palates showed incomplete cleft. These results suggest that Gefitinib administration can improve the severity of the palatal cleft via the reduced expression of phospho-Erk1/2.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-49　口蓋裂に関与する疾患遺伝子群のオントロジー解析

○船戸　紀子

医科歯科大　院医歯　医歯共同センター　疾患遺伝子

【目的】唇顎口蓋裂はヒトで最も多く認められる先天異常の一つであり，遺伝的および環境的要因によって引き起こされる．口蓋の発生には様々な分子のネットワークが関与している．唇顎口蓋裂および口蓋裂に関与する疾患遺伝子群を包括的に把握し，オントロジー解析を加えることで，唇顎口蓋裂の発症に関与する分子群の機能ついて検討することを目的とする．【方法】まず，口蓋裂を認める遺伝子改変マウス，および唇顎口蓋裂を認めるヒトの症候群について包括的なリストの作成を行った．次に，ヒトの遺伝子群が関わる唇顎口蓋裂所見の中から口蓋裂を抽出し，完全口蓋裂，不完全口蓋裂，軟口蓋裂，口蓋垂裂，粘膜下口蓋裂に分類した．さらに，非症候群性唇顎口蓋裂に関与する疾患遺伝子群も検索した．得られた遺伝子群についてそれぞれオントロジー解析を行った．【結果】これまで報告されている遺伝子改変マウスの所見から，口蓋裂に関わる遺伝子は約 180 であった．唇顎口蓋裂を伴う症候群を検索したところ，370 疾患が得られた．また，唇顎口蓋裂に関与する遺伝子は，154 種類であった．オントロジー解析を加えたところ，これらの疾患遺伝子群が最も濃縮された生物学的プロセスは，発生学的プロセスであった．また，遺伝子群のうち最も多かった分子学的機能は転写因子であった．それぞれの不完全口蓋裂，軟口蓋裂，口蓋垂裂，粘膜下口蓋裂等の口蓋裂所見によって，異なる遺伝子プロファイルが得られた．【結論】唇顎口蓋裂の発症に関与する遺伝子群は，口蓋裂のタイプによって特徴的な機能をもち，遺伝学的に同等ではないことが分かった．（非会員共同研究者：Hiromi Yanagisawa，中村正孝）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Gene ontology analysis of genes associated with cleft palate

○Funato N

Tokyo Med Dent Univ, Hum Gene Sci Center

Cleft lip and/or palate（CL/P）, one of the most frequent congenital birth defects in humans, is induced by multifactorial conditions including both genetic and environmental factors. A number of networks of molecules are known to regulate the palatal development. A comprehensive list of disease genes of CL/P and their functional annotation should lead to an enhanced integration of medicine and biology. Here we performed the ontology enrichment analysis on disease genes and found correlations between the functions of gene products and CL/P phenotypes. We screened the knockout mice with cleft palate（CP）phenotypes, and nearly 180 reported mice were listed. The investigation revealed 370 human genetic diseases/syndromes have CL/P with genetic loci and 154 genes had one or more syndromic or nonsyndromic CL/P in humans. When we analyzed disease genes involved in CL/P, the most significantly enriched biological process was the developmental process. The most significantly enriched molecular function was the transcription factors. Distinct genetic profiles were obtained among different CP phenotypes, such as incomplete CP, bifid uvula, and submucous CP. The comprehensive list and analysis of disease genes according to their function will provide insights into the genetic etiology of CP.（Non-Member Collaborators: Hiromi Yanagisawa, Masataka Nakamura）

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-50　NF-κB 阻害剤 MPAIDs による骨芽細胞への影響

○平田-土屋　志津[1]，岡本　一起[2]，自見英治郎[3]，諸冨　孝彦[1]，北村　知昭[1]

[1]九歯大　保存
[2]聖マリアンナ医大 分子病態治療
[3]九歯大　生化

重篤な根尖性歯周炎や辺縁性歯周炎において骨の再生を確実にするためには，感染制御と再生療法技術に加え，慢性炎症制御が重要である．我々はこれまでに，炎症の主たるシグナル伝達経路である NF-κB シグナルと BMP/Smad シグナルのクロストークを明らかにしてきた．今回，NF-κB シグナルを直接的に阻害するステロイド受容体コアクチベーター Macromolecular Translocation Inhibitor II（MTI-II）に着目し，骨芽細胞に対する影響について検討した．まず，MTI-II の酸性アミノ酸領域を利用したペプチド（MPAIDs）を化学合成した．マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に NF-κB ルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し，MPAIDs で前処理した後，TNFα（10 ng/ml）で刺激して NF-κB の転写活性を分析した．TNFα 刺激によって NF-κB の転写活性が著しく上昇したが，MPAIDs によってその活性の上昇が解除・抑制された．次に，Matrix metallopeptidase-9（MMP-9）と Interleukin-6（IL-6）の発現を分析した．その結果，MPAIDs によって MMP-9 や IL-6 の発現が抑制されることがわかった．さらに，MPAIDs と TNFα，BMP4（10 ng/ml）で刺激し，アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定を行った．BMP4 刺激によって ALP 活性上昇が誘導されたが，TNFα で刺激するとその活性は抑制された．しかし，MPAIDs で刺激した細胞ではその抑制が解除された．以上より，MPAIDs は TNFα 刺激による NF-κB シグナルを抑制することで，BMP 誘導性の骨芽細胞分化を促進することから，MPAIDs は BMP による骨形成の有効な補助薬となる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of MPAIDs, NF-κB inhibitor on osteoblasts

○Hirata-Tsuchiya S[1]，Okamoto K[2]，Jimi E[3]，Morotomi T[1]，Kitamura C[1]

[1]Div Endodontics Restorative Dent, Kyushu Dent Univ
[2]Clinical Proteomics Molecular Medicine, St Marianna Univ Grad Sch Med
[3]Div Molecular Signaling Biochem, Dept Biosci, Kyushu Dent Univ

We have previously reported that the inflammatory cytokine, tumor necrosis factor α（TNFα） inhibited BMP-induced osteoblast differentiation via NF-kB signaling. In the present study, we examined effects of steroid-coactivator, Macromolecular Translocation Inhibitor II（MTI-II), on inflammatory responses in MC3T3-E1 cells. When the cells were treated with MTI-II, TNFα-induced NF-κB-luciferase activity failed to increase in a dose-dependent manner, as well as TNFα-induced expression of matrix metallopeptidase-9（MMP-9）and Interleukin-6（IL-6）mRNA, a target gene of NF-κB. We next examined effects of MTI-II on the inhibition of BMP-induced osteoblastogenesis of MC3T3-E1 cells by TNFα. When the cells were treated with TNFα, BMP-induced ALP activity was inhibited, while MTI-II restored TNFα-mediated inhibition of the activity in a dose-dependent manner. These results suggest that MTI-II involves in the inhibition of BMP-induced osteoblastogenesis by TNFα, and that MTI-II may have an potential as an anti-inflammatory drug.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-51 アセトアミノフェンのマウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 の挙動に及ぼす影響

○中津　由博[1]，東　　泉[2]，大住　伴子[2]，渡邉　誠之[1]，竹内　　弘[2]

[1]九歯大　歯科侵襲制御
[2]九歯大　口腔応用薬理

【目的】解熱鎮痛薬の一つアセトアミノフェンは，主として中枢に作用するとされるが，その作用機序の詳細は未解明である．一方ある種の癌細胞に対する抑制効果など解熱鎮痛以外の作用の報告もある．今回，我々は培養細胞を用いたアセトアミノフェンの作用機序を探る過程で，アセトアミノフェンにマウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 の遊走能を亢進し，骨芽細胞分化を抑制する作用があることを見出したので報告する．【方法】MC3T3-E1 は 10％牛胎児血清含有の $\alpha$-MEM にて維持培養し，骨芽細胞分化はコンフルエントになった細胞を $\beta$-グリセロリン酸及びアスコルビン酸を添加した培地で 7 日間培養後に細胞のアルカリホスファターゼ（ALP）活性を測定し評価した．細胞遊走能は wound-healing assay にて検討した．Wound-healing assay では細胞がサブコンフルエントになった実験前日にアセトアミノフェン含・不含の新鮮培地に交換し，18 時間の前処理を行った．翌日コンフルエントになった細胞にピペットチップ先端でスクラッチを施し，前処理と同じ培地に交換した．スクラッチ直後及び 12 時間後に顕微鏡にて明視野像を撮影し，計測したスクラッチ幅の変化を細胞遊走距離とした．細胞増殖試験はアセトアミノフェン存在・非存在下で 48 時間培養した生細胞数を WST-8 キットにて測定した．【結果】Wound-healing Assay では，実験開始 12 時間後のスクラッチ幅がアセトアミノフェン添加群において無添加群に比して約 10％ 縮小していた．一方，アセトアミノフェン添加は増殖能に影響しなかった．また分化誘導培地へのアセトアミノフェン添加によって ALP 活性の上昇を抑制した．【考察】アセトアミノフェンは MC3T3-E1 細胞の増殖ではなく遊走能を亢進させ，分化を抑制することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of acetaminophen on the behavior of mouse calvaria-derived cell line MC3T3-E1

○Nakatsu Y[1]，Higashi S[2]，Osumi T[2]，Watanabe S[1]，Takeuchi H[2]

[1]Div Dent Anesthesiol, Kyushu Dent Univ
[2]Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ

Acetaminophen is the widely used analgesic and antipyretic, of which mechanism of action is not completely understood. In this study, we examine the effect of acetaminophen on the osteoblast-like cell line MC3T3-E1 to investigate new function of the drug in the peripheral tissues. To test the effect of acetaminophen on the migration of MC3T3-E1 cells, we performed the wound-healing assay. When the cells reached confluent, the scratches were created with a pipet-tip and the width of the scratches were measured 12h later. The cells were pre-treated with or without acetaminophen for 18h before the scratches were created. While the acetaminophen did not affect the growth of the cells, it promoted the migration of MC3T3-E1. We also examined the effect of the drug on the osteoblastic-differentiation, which was induced by culturing the cells in the presence of $\beta$-glycerophosphate and ascorbic acid. The differentiation was assessed by measuring the alkaline-phosphatase activity after 7 days of the induction. Addition of acetaminophen to the medium during the differentiation suppressed the increase of alkaline-phosphatase activity of the cells. The results suggested that acetaminophen has some role other than pain-relieving and fever-reduction in the peripheral tissues.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-52 ペプチド固相合成法（F-moc 法）により作製された LRAP の軟骨および骨形成に与える影響

○松田　裕子[1]，畠山　雄次[2]，中島　一記[1]，鴨頭奈央子[1]，畠山　純子[3]，沢　　禎彦[2]，石川　博之[1]

[1]福歯大　矯正
[2]福歯大　機能構造
[3]福歯大　保存

【目的】アメロジェニンはエナメル芽細胞のみならず軟骨細胞および骨芽細胞に発現が認められるが，アメロジェニンのスプライシングアイソフォームの一つである Leucine rich amelogenin peptide（LRAP）が軟骨細胞分化を促進することが報告されている．しかしその詳細な作用機序については不明であり，これまでの報告は大腸菌を利用して作成した LRAP を用いている．今回，我々はペプチド固相合成法（F-moc 法）により作製されたマウス LRAP の *in vitro* における軟骨形成および骨形成に与える影響を検討した．【方法】Lau らの報告によるアミノ酸配列に基づき合成されたマウス LRAP をマウス軟骨細胞 ATDC5 およびマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 のそれぞれの細胞培地に，最終濃度 1 から 10 μg/ml 添加，または LRAP および LRAP 結合タンパクである Lysosome associated membrane protein 1（LAMP1）抗体を添加し，4 週間培養した．培養後，アルシアンブルー染色およびアリザリンレッド染色を施し，溶解液にて染色強度を定量した．【結果】10 μg/ml の LRAP 添加群は LRAP 無添加群と比較して，軟骨細胞および骨芽細胞のアルシアンブルーおよびアリザリンレッド染色強度が有意に上昇した．一方，LAMP1 抗体添加群は LRAP 添加群と比較して骨芽細胞のアリザリンレッド染色の強度が有意に低下した．【考察】F-moc 法により合成されたマウス LRAP は，長期培養により軟骨細胞の軟骨基質形成および骨芽細胞の骨基質形成を促進し，その作用機序に LAMP1 が関与する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of mouse LRAP synthesized by solid phase chemistry（F-moc）on osteo-/chondrogenesis

○Matsuda Y[1]，Hatakeyama Y[2]，Nakasima K[1]，Kamogashira N[1]，Hatakeyama J[3]，Sawa Y[2]，Ishikawa H[1]

[1]Orthodontics, Fukuoka Dent Coll
[2]Functional Structure, Fukuoka Dent Coll
[3]Operative Dent, Fukuoka Dent Coll

Leucine rich amelogenin peptide（LRAP）is splicing isoforms of amelogenin and recombinant LRAP produced in *E. coli.* promotes chondrogenetic cell differentiation. The purpose of this study is to analysis the effect of chemical synthesized LRAP on osteo-/chondrogenesis. The sequence of mouse LRAP amino acid referred to the previous report and LRAP was synthesized using F-moc solid phase chemistry. Mouse chondrocytes ATDC5 or mouse osteoblasts MC3T3-E1 were cultured in the presence of LRAP at from one to 10 μg/ml, or presence of antibody to lysosome associated membrane protein 1（LAMP1）for 4 weeks. After cell cultured, cell culture were stained with alcian blue or alizarin red and quantitative analysis of these staining were performed with measuring of dissolved solution by optical density. The staining intensity both of alcian blue and alizarin red was increased significantly in the presence of 10 μg/ml LRAP compared with absence of LRAP. On the other hand, in the presence both of antibody to LAMP1 and LRAP, the staining intensity of alcian blue and alizarin red were decreased compared with in the presence of LRAP only. These results suggest that mouse LRAP synthesized by solid phase chemistry could promote osteogenetic or chondrogenetic matrices production in long-term culture.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-53　感覚神経-骨芽細胞共培養系における相互シグナル伝達機構の解明

○兒玉　大介，戸苅　彰史

愛院大　歯　薬理

近年，神経系を介した骨代謝制御機構の存在が明らかになってきた．交感神経や感覚神経の除去により骨代謝機能が影響を受けることや，卵巣摘出や尾部懸垂による骨減少に神経活動の変化が関わることなどが報告されている．また骨芽細胞および破骨細胞にアドレナリン受容体やグルタミン酸受容体，CGRP やサブスタンス P などニューロペプチドの受容体が発現していることが報告されている．一方で，神経細胞と骨代謝関連細胞の間に直接的なシグナル伝達が存在するかどうかは議論の余地がある．これまでに我々はマウス新生仔から摘出した交感神経初代培養細胞（上頸神経節ニューロン:SCG）および感覚神経初代培養細胞（脊髄後根神経節ニューロン:DRG）とマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 との共培養系において双方向性の直接的なシグナル伝達経路が形成されることを報告している．今回の報告では DRG-MC3T3-E1 との共培養系における細胞間のシグナル伝達について，さらに詳細な検討を行った．DRG の電気刺激により，DRG での細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇が起こり，時間差の後，隣接する MC3T3-E1 においても細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇が見られた．MC3T3-E1 の反応は開口分泌阻害薬に加え，AMPA 型グルタミン酸受容体遮断薬，サブスタンス P 受容体遮断薬によって阻害された．また低濃度の BK による MC3T3-E1 の細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇と，それに続く DRG での細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇において，開口分泌阻害薬および $P2X_7$受容体遮断薬は MC3T3-E1 の反応に影響を与えず，DRG の反応のみを抑制した．一方，グルタミン酸受容体遮断薬によっては MC3T3-E1，DRG のいずれの反応も影響を受けなかった．以上の結果から，感覚神経細胞はグルタミン酸およびサブスタンス P，骨芽細胞は ATP を放出し，相互にシグナル伝達を行っている可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Bidirectional communication between sensory neuronal cells and osteoblasts in an in vitro co-culture system

○Kodama D，Togari A

Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

Recent studies have revealed that sympathetic and sensory nervous systems are involved in bone metabolism. However, whether a direct cell communication between neurons and osteoblasts exists is still unknown. We previously demonstrated a direct signal transduction between primary mouse sympathetic or sensory neuronal cells and mouse osteoblastic cells, MC3T3-E1 by using an in vitro co-culture system. The aim of this study is to reveal more detailed mechanisms of the bidirectional signal transduction pathway between sensory neuronal cells derived from dorsal root ganglion（DRG）and MC3T3-E1 cells. In the co-culture system, electric stimulation of DRG neuronal cells elicited increase of intracellular $Ca^{2+}$ concentration（$[Ca^{2+}]_i$）and it is followed by $[Ca^{2+}]_i$ elevation in MC3T3-E1 cells. The $[Ca^{2+}]_i$ elevation in MC3T3-E1 cells is suppressed by exocytosis inhibitors, an AMPA receptor antagonist and an $NK_1$ receptor antagonist. On the other hand, low level of bradykinin, which directly activate osteoblasts but not neuronal cells, induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation in MC3T3-E1 followed by that in DRG neuronal cells. The $[Ca^{2+}]_i$ elevation in DRG neuronal cells is suppressed by vesicular release inhibitors and a $P2X_7$ receptor antagonist. These results suggested that sensory neuronal cells and osteoblasts communicate each other by release of glutamate, substance P and ATP.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-54　RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する IL-17A と IL-27 の協調効果

○井上　　博，内橋　賢二，西川　泰央

大阪歯大　生理

【目的】歯槽骨は他の骨と同様，骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により絶えずリモデリングされている．歯周病では，骨吸収が骨形成を上回るため歯槽骨量が減少する．しかし，歯槽骨の骨吸収メカニズムは部分的にしか解明されていない．我々は以前，IL-17A の RAW264.7 細胞に対する直接的な作用により，RANKL 刺激による破骨細胞分化が抑制されることを発表した．IL-27 は破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞形成を阻害することにより骨吸収を抑制することが知られている．今回，破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する IL-17A と IL-27 の協調効果について検討した．【方法・結果】RAW264.7 細胞における IL-17A および IL-27 レセプターの発現をフローサイトメーターにて確認した．IL-17A と IL-27 の細胞増殖に対する影響を検討したところ，IL-17A と IL-27 は細胞増殖に影響を与えなかった．IL-17A と IL-27 の破骨細胞分化に対する影響を分化実験にて検討した．その結果，RANKL 刺激により破骨細胞分化が引き起こされたが，RANKL により引き起こされた破骨細胞分化は IL-17A と IL-27 の協調効果により抑制された．ウエスタンブロット法にてリン酸化 JNK の検出を行ったところ，RANKL 刺激により JNK のリン酸化は増強した．RANKL 刺激による JNK のリン酸化増強は IL-17A と IL-27 の協調効果により減弱した．【考察】以上の結果から，RAW264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞分化は，IL-17A と IL-27 の協調効果によって抑制されることを確認した．IL-17A と IL-27 の協調効果による破骨細胞分化抑制は細胞増殖抑制によるものではなく破骨細胞分化シグナルの抑制によるものである可能性が示唆された．また，IL-17A と IL-27 の協調効果による破骨細胞分化シグナルの抑制には，JNK のリン酸化抑制が関与している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Coordinated effect of IL-17A and IL-27 on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

○Inoue H，Uchihashi K，Nishikawa N

Dept Physiol, Osaka Dent Univ

Periodontitis is a chronic inflammatory disease characterized by alveolar bone resorption. Inflammation-mediated bone loss is a major cause of various bone diseases, such as chronic periodontitis, and is due to an imbalance in bone remodeling that favors resorption. IL-17A is a proinflammatory cytokine that is mainly secreted by activated T cells. IL-27 is known to have multifaceted actions during immune responses, with both activating and regulatory roles. Previous studies reported the direct effect of RANKL-induced osteoclast differentiation from osteoclast precursors in IL-17A or IL-27 alone. However, the mechanism of the coordinated effect of IL-17A and IL-27 on osteoclastogenesis has not been reported. In this study, we confirmed the coordinated effect of IL-17A and IL-27 on RANKL-induced osteoclastogenesis. High expression of IL-17RC and IL27-R alpha was detected on RAW264.7 cells. A coordinated effect of IL-17A and IL-27 suppressed osteoclast differentiation from RAW264.7 cells treated with RANKL without reduction of cell proliferation. Furthermore, the phosphorylation of JNK stimulated with RANKL was inhibited by the coordinated effect of IL-17A and IL-27. These data suggest the possibility that the coordinated effect of IL-17A and IL-27 inhibited the phosphorylation of JNK which is involved in the suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-55 OCZF（Zbtb7a）タンパク質の破骨細胞分化における発現誘導とその機能の解析

○久木田明子[1]，徐　　祥赫[1,2]，久木田敏夫[2]

[1]佐賀大　医　微生物
[2]九大　院歯　口腔分子細胞生物

【目的】OCZF（Zbtb7a）は，Zn フィンガーと POZ ドメインを有する転写制御因子であり，破骨細胞の分化の時期により機能が異なることや，多核細胞の形成や骨吸収，生存に関与することを報告してきた．しかしながら，その詳細については，まだ不明な点が多く残されている．今回は，OCZF の発現誘導とその機能に関して詳細な解析を行なった．【方法】カテプシン K プロモーター制御下で RANKL により Venus を発現誘導する破骨細胞を形成するマウスマクロファージ細胞 RAW-ctsk-Venus1 やマウス骨髄細胞を使用し破骨細胞を形成し，TRAP 染色及び FACS による Venus や細胞表面抗原の解析を行なった．OCZF 及び Fos, NFATc1 の発現を抑制するレンチウイルスを作成し，RAW-ctsk-Venus1 細胞に感染させ RANKL で破骨細胞分化を誘導した．【結果及び考察】カテプシン K プロモーター制御下で RANKL により Venus を発現誘導する破骨細胞を形成する RAW-ctsk-Venus1 細胞に OCZF shRNA レンチウイルスを感染させ発現を抑制すると，RANKL による多核の破骨細胞の形成が顕著に阻害された．一方，RANKL 添加後初期に形成される Venus 陽性の単核細胞の形成は抑制されず，OCZF が RAW 細胞からの多核細胞の形成に重要であるという以前の結果が確かめられた．さらに，RAW-ctsk-Venus1 細胞に Fos shRNA 感染により Fos の発現を抑制した場合に OCZF の発現が低下し，発現に Fos タンパク質の関与が考えられた．一方，骨髄細胞に RANKL を添加して形成する破骨細胞の核に OCZF タンパク質の局在が認められるが，TPA を添加して形成される多核の細胞に高い発現が認められなかった．また，象牙質切片上で形成した多核の破骨細胞においては，核のみでなく細胞全体に発現が認められ，破骨細胞における OCZF の発現には RANKL と骨の環境が関わる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis of expression and function of Zbtb7a（OCZF）protein in osteoclastogenesis

○Kukita A[1]，Xu X[1,2]，Kukita T[2]

[1]Dept Microbiol, Fac Med, Saga Univ
[2]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ

OCZF（Zbtb7a）protein is a transcriptional regulator with zinc fingers and POZ domain. We have reported OCZF is involved in osteoclastogenesis, bone resorption and survivalof osteoclasts. In this study, we analyzed the expression and function of OCZF using RAW-Venus cell which induces Venus expression under the control of cathepsin K promoter by RANKL and OCZF shRNA lentivirus which specifically inhibit OCZF expression. Infection of OCZF shRNA lentivirus of RAW-Venus cells inhibited the formation of multinucleated osteoclasts in RAW-Venus cells. However OCZF shRNA did not inhibit Venus-positive mononuclear osteoclast precursor cells, suggesting OCZF is involved in multinucleation. Fos shRNA which inhibit osteoclast formation from RAW-Venus cells inhibited OCZF expression, suggesting Fos may be involved in the induction of OCZF. In mouse bone marrow culture system, OCZF is induced by RANKL and found in the nuclei of multinucleated osteoclasts. TPA induced multinucleation of bone marrow macrophages, however did not increase the expression of OCZF. OCZF was also detected in cytoplasm of multinucleated osteoclasts formed on dentine. In addition to RANKL, bone environment may be involved in OCZF expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-56　骨芽細胞における時計遺伝子 NFIL3/E4BP4 の役割

○平居　貴生，田中健二郎，戸苅　彰史

愛院大　歯　薬理

【目的】骨代謝には概日リズムが認められるが，その分子機構については不明な点が多い．我々は交感神経系シグナルによって，骨芽細胞における時計遺伝子 Period1, Period2, Period3，および Bmal1 が同調化されることを既に報告した．また，骨芽細胞に発現する Bmp4 遺伝子は，交感神経系シグナルによって発現上昇する時計遺伝子 nuclear factor interleukin 3（Nfil3）/e4 promoter binding protein 4（E4BP4）によって負に制御されることを既に明らかにしているが，時計遺伝子よる骨代謝制御については不明な点が多く残されているのが現状である．したがって，本研究では骨芽細胞に発現する時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 が骨代謝制御に関与する可能性について検討した．【方法，結果】Nfil3/E4BP4 の標的分子を探索する目的で，Nfil3/E4BP4 を安定過剰発現する MC3T3-El 細胞株を解析した．その結果，Nfil3/E4BP4 安定過剰発現細胞では対照細胞群に比して，サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1A 遺伝子 *CDKN1A* の有意な発現低下が確認された．一方，Nfil3 ノックダウンによって *CDKN1A* 発現は有意に増加することが判明した．また，Nfil3 をノックダウンした骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞では，BrdU の取り込み能の有意な低下がみられた．さらに，MC3T3-El 細胞では転写因子 Nfil3/E4BP4 は *CDKN1A* プロモーター上の D-box へ結合することが Chip アッセイによって確認された．【考察】以上の結果より，骨芽細胞における転写因子 Nfil3/E4BP4 は *CDKN1A* 発現を抑制することによって細胞増殖を制御している可能性が示唆される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Transcriptional factor NFIL3/E4BP4 in osteoblasts

○Hirai Ta，Tanaka K，Togari A

Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

We have demonstrated that adrenergic receptor（AR）signaling plays an important role in the regulation of clock works in osteoblasts. On the other hand, we recently reported that AR signaling regulated clock genes and the expression of Bmp4 by up-regulating the basic leucine zipper transcriptional factor nuclear factor IL-3（Nfil3）/e4 promoter binding protein 4（E4BP4）in osteoblasts. The transcription factor Nfil3/E4BP4 is involved in the mammalian circadian clock and plays an important role in regulating the basic functions of a wide range of cell types. In the present study, we determined whether Nfil3/E4BP4 contributed to regulating the cellular proliferation of osteoblasts. The incorporation of BrdU was significantly less and the expression of *CDKN1A*, which encodes the CDK inhibitor p21CIP1, was higher in MC3T3-E1 cells, in which Nfil3 had been silenced, than in cells transfected with non-targeting control siRNA. We also found that *CDKN1A* transcripts and promoter activity were down-regulated in Nfil3/E4BP4-overexpressing MC3T3-E1 cells, which indicated that Nfil3/E4BP4 negatively regulated the expression of *CDKN1A* in MC3T3-E1 cells. Taken together, these results suggest that *CDKN1A* is a direct target of Nfil3/E4BP4, its suppression by Nfil3/E4BP4 plays a key role in the cellular proliferation of osteoblasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-57　Keap1/Nrf2 の破骨細胞分化における役割

○坂井　詠子，福間　　裕，西下　一久，岡元　邦彰，筑波　隆幸

長崎大　院医歯薬　歯科薬理

【背景と目的】Nrf2 は酸化ストレスに対して細胞を防御する重要な転写因子である．Nrf2 は平常時には Keap1 と結合し細胞質内にとどめられプロテアソーム依存的に分解されるが，酸化ストレス下には Keap1 から解離し核へ移行し標的遺伝子上の antioxidant responsive element に結合し第 2 相抗酸化酵素遺伝子の発現を促進する．破骨細胞は骨吸収を行う多核の巨細胞であり，その分化は RANKL や炎症性サイトカインおよび酸化ストレスによって制御されている．近年，Nrf2 遺伝子欠損が破骨細胞分化を促進することが報告された．本研究は Keap1/Nrf2 が破骨細胞分化においてどのような役割を持つかを明らかにする目的で行った．

【方法】野生型，Keap1 遺伝子欠損マウス，および Nrf2 遺伝子欠損マウスを用いて破骨細胞分化を比較した．

【結果と考察】野生型マウス，Keap1 遺伝子欠損マウス，Nrf2 遺伝子欠損マウスの骨髄細胞および脾臓細胞から M-CSF と RANKL を用いて破骨細胞を形成させ TRAP 染色を行い，破骨細胞分化を比較した．Nrf2 遺伝子欠損マウスでは破骨細胞形成の顕著な亢進が認められ RANKL 刺激後の ERK，P38 MAPK，JNK シグナルのリン酸化の促進と NFATc1 および c-Fos の核移行の促進が認められた．一方，Keap1 遺伝子欠損マウスでは M-CSF と RANKL を用いて脾臓細胞を培養したところ顕著な破骨細胞の形成阻害が認められた．Keap1 遺伝子欠損マウスでは RANKL 刺激後の ERK, P38 MAPK, JNK シグナルのリン酸化の阻害と NFATc1，RANK，および TRAF6 のタンパク発現の減少が認められた．以上の結果は，破骨細胞分化において Keap1/Nrf2 が重要な役割を持つことを示唆している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast

○Sakai E，Fukuma Y，Nishishita K，Okamoto K，Tsukuba T

Div Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Background and purpose: Nrf2 is a master transcription factor of cytoprotective genes against oxidative stress. Under normal conditions, Nrf2 is sequestered in the cytoplasm by Keap1, leading to Nrf2's constitutive proteasomal degradation. However, oxidative stresses disturb this function of Keap1, resulting in nuclear translocation of Nrf2. Nrf2 recognizes the antioxidant-responsive element of target genes, thereby inducing the expression of phase II antioxidant enzymes. Recent studies have demonstrated that deletion of Nrf2 significantly promotes osteoclast differentiation. This study investigated the role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast.

Methods: In vitro osteoclast differentiation was evaluated using wild-type, Keap1-deficient, and Nrf2-deficient mice.

Results and discussions: Nrf2 deletion increased osteoclastic differentiation through the activation of ERK, P38 MAPK, and JNK signaling. In addition, nuclear translocation of NFATc1 and c-Fos was increased in Nrf2 deficient osteoclast. Keap1 deletion significantly suppressed osteoclastic differentiation through the inhibition of phosphorylation of ERK, P38 MAPK, and JNK. Furthermore, the protein expression of NFATc1, RANK, and TRAF6 was downregulated. These results suggested that Keap1/Nrf2 axis has crucial roles in the differentiation of osteoclasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-58 2種類のビスフォスフォネートの骨芽細胞におけるアルカリフォスフォアターゼ活性および基質形成に対する異なる効果

○馬場　友巳[1]，宮崎　敏博[2]，根本　優子[1]，根本　孝幸[1]

[1]長崎大　院医歯薬　口腔生化
[2]長崎大　院医歯薬　細胞生物

【目的】ビスフォスフォネート（BPs）は破骨細胞を標的とした骨量低下抑制薬で，作用がより強力な窒素含有 BPs（NBPs）と窒素非含有 BPs（non-NBPs）の 2 つのサブタイプがある．皮下組織を対象とした研究では NBPs 誘導性のネクローシスを non-NBPs が抑制することが示されており，標的細胞に対する両者の作用機序の解明は重要である．今回我々は，NBP であるゾレドロネート（Zol）と non-NBP であるエチドロネート（Eti）の骨芽細胞に対する作用を検討した．【方法】MC3T3-E1 はアスコルビン酸を含む $\alpha$-MEM で培養した．Zol 及び Eti を単独，あるいは同時に添加し，約 10 日間培養後，細胞および基質を 0.1% Triton X-100 を含む 10 mM Tris-HCl 溶液で可溶化した．遠心分離で得られた上清中のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定し，沈渣は洗浄乾燥後，重量を測定し基質量とした．【結果】Zol（20 $\mu$M）存在下での培養により，MC3T3-E1 の ALP 活性は有意に低下し，同時に基質量の低下も観察された．一方，Eti 添加では，ALP 活性はほぼ変化がなく，基質量の変化も認めなかった．Zol による ALP 活性の抑制効果は 50 $\mu$M Eti を同時添加することにより回復したが，基質産生の減少は回復しなかった．【考察】non-NBP である Eti と NBP である Zol は，骨芽細胞において異なる作用効果があることが明らかになった．一方，ALP 活性と基質産生に対する効果が異なることから，2 種類の BPs の作用機構が異なることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Different effects of two types of bisphosphonates on alkaline phosphatase activity and matrix contents in osteoblastic cells

○Baba T[1]，Miyazaki T[2]，Ohara-Nemoto Y[1]，Nemoto T[1]

[1]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Objectives: Bisphosphonates（BPs）are drug that prevent bone loss by targeting osteoclasts. They are classified into two subtypes: nitrogen-containing（NBPs）and non nitrogen-containing BPs（non-NBPs）. Recently it has been reported that non-NBPs prevent the inflammatory and necrotic side effects induced by NBPs. Hence, we examined the effect of co-administration of non-NBP and NBP in osteoblastic cells. Methods: MC3T3-E1 was cultured in $\alpha$-MEM supplemented with ascorbic acid. Etidronate（Eti）and zoledronate（Zol）were added separately or in combination. After 10 days, cells and matrix were harvested in 10 mM Tris-HCl with 0.1% Triton X-100 and centrifuged. Alkaline phosphatase（ALP）activity in supernatant was measured using a p-nitrophenol phosphate as a substrate, and the weight of dried precipitate was measured following by washing with distilled water. Results: Zol significantly reduced the ALP activity in MC3T3-E1, while Eti showed no significant reduction. The inhibitory effect of Zol on ALP activity was canceled by co-administration of Eti, but it could not cancel the reduction of matrix content. Conclusion: The result leads the suggestion that the mechanism concerned with matrix production by BPs may be different from that of ALP activity.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-59 オスウズラに形成された骨髄骨の吸収に対するプロゲステロンの影響

○山本　敏男[1]，塩津　範子[1,2]，片岡　陽平[1,3]，河井まりこ[1,4]，池亀　美華[1]，内部　健太[1]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔形態
[2]岡大病院　総合歯科
[3]岡山大　院医歯薬　口腔再建外科
[4]大阪歯大　薬理

「目的」産卵期の鳥類は卵殻石灰化のためのCaの貯蔵所として骨髄腔に骨髄骨とよばれる代謝性の骨組織を形成する．この骨髄骨から卵殻形成のCaの約40%が供給されると言われている．Ca供給は産卵周期と同調しており，卵が卵殻腺に入ると骨髄骨吸収が活発になり卵殻石灰化が行われる．膨大部または狭部にあるときは，骨吸収は休止する．しかしながら，卵の位置と骨髄骨の同調機構については判っていない．演者らは，先に産卵ウズラを用いて，卵が卵殻腺に入り骨髄骨破骨細胞が活発な時期にプロゲステロン（Pro）を投与すると破骨細胞の活性が抑制されることを報告した．本研究では，前回の報告を基にProの破骨細胞抑制作用について，オスウズラにエストロゲン(E)を単回投与して一過性に骨髄骨形成を誘導し，その吸収過程にProを投与することにより骨髄骨吸収に対するProの影響を検証した．
「材料と方法」性成熟したニホンウズラのオスを用い，大腿骨を採取した．ウズラにEを1回筋注し，実験群を3つに分けた．すなわち，1）投与後7日で採取する群（E 7），2）投与後14日で採取する群（E 14）および3）投与後7日目）からPro（1 mg/ 0.1 mL）を一日おきに投与しE投与から14日目に採取する群（E 14+P）である．
「結果」E 7群を観察すると，骨髄骨は骨髄腔の中心に向かって1/2～1/3程度に伸長していた．E 14群では，一過性に形成された骨髄骨は皮質骨から僅かに突出する程度にまで吸収されていた．7日目からProを投与したE 14+P群ではE 7群と同程度の骨髄骨が存在していた．
「考察」一過性に形成された骨髄骨はE投与後14日で激減した．E投与7日目からPro投与を行ったものでは骨髄骨の減少はほとんど認められなかった．したがって，本研究において，Proによる骨吸収抑制作用が示されたたと共に，Proは骨髄骨破骨細胞に直接作用する可能性が推察された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The effect of progesterone for estrogen-induced medullary bone resorption in male quail

○Yamamoto T[1]，Shiotsu N[1,2]，Kataoka Y[1,3]，Kawai M[1,4]，Ikegame M[1]，Uchibe K[1]

[1]Dept Oral Morphol, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm Sci
[2]Comprehensive Dent Clinic, Okayama Univ Hosp
[3]Dept Oral Maxillofa Reconst Sur, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm Sci
[4]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ

Medullary bone（MB）is formed in the marrow cavity of egg-laying birds and functions as a calcium reservoir for eggshell calcification. The bone formation and resorption in medullary bone occurs synchronized with an egg position in the oviduct. Previously, we found out that the active osteoclasts in MB were suppressed by progesterone（Pro）. In the present study we examined the prolonged effect of progesterone for MB resorption using estrogen-induced MB in male Japanese quail. Estrogen（E）was injected to quail to induce MB. After 7 days of the injection, femora were collected to confirm MB formation. The rest quails were divided into two groups. The first group was killed at 14 days after the E administration. The second group was received Pro（1 mg/0.1 mL, every two days）at 7th day after the E injection until 14 days（E14+Pro）. In 7 days group, medullary bone had been formed and the trabeculae extended toward the marrow cavity. By 14 days, MB was largely resorbed and only short trabeculae existed. In E14+Pro group, MB trabeculae remained mostly at the amount of 7 days after E administration. These results indicate that Pro inhibits MB resorption.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-60 骨量減少・骨髄の脂肪化と糖・脂質代謝メディエーター FGF21/βKlotho の関連について

○南崎　朋子，吉岡　広陽，竹井悠一郎，吉子　裕二

広島大　院医歯薬保　硬組織代謝生物

【目的】線維芽細胞増殖因子（FGF）21 はグルコース代謝を制御する抗肥満因子と考えられている．FGF21 は肝臓，脂肪，筋，膵臓などから分泌され，インスリン感受性と脂肪細胞のグルコース取り込みを促進する一方，FGF21 の血中濃度はグルカゴンにより抑制される．FGF21 は FGF 受容体/βKlotho 複合体に結合し，PPARγ の SUMO 化を阻害することで，PPARγ の活性化を促す．PPARγ は概日性転写因子として，骨芽細胞と脂肪細胞分化のバランスを調節することから，今回，食餌性肥満（DIO）マウスにおける骨量減少・骨髄の脂肪化と FGF21/βKlotho の関連について検討した．【方法】正常または DIO マウスに糖尿病治療薬（PPARγ 合成リガンド，TZD）を投与し，血清，肝臓，脂肪および骨について各種解析を行った．また，骨分化条件でマウス骨髄細胞を培養し，TZD 存在下における FGF21 の影響を確認した．【結果】DIO マウスでは，血中グルコース，FGF21 濃度，肝の *Fgf21* mRNA レベルが増加し，TZD はこれらを改善した．一方，TZD は白色脂肪における *Fgf21* の発現を促進した．TZD は，DIO マウス骨の *Klb* の発現上昇と並行して，骨髄の脂肪化と海綿骨骨密度の低下を助長した．正常マウスより採取した骨髄細胞において，*Fgf21* mRNA レベルは骨分化，脂肪分化に関わらず低値であったが，TZD は骨髄細胞の *Klb* mRNA レベルを脂肪細胞形成に先行して上昇させた．【考察】DIO マウスにおける FGF21/βKlotho の骨量減少・骨髄脂肪化への影響が示唆された．肥満に伴う骨・骨外臓器における FGF21/βKlotho の変動は，骨・脂肪分化のバランスに影響するものと考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The relevance of FGF21/βKlotho, glucose and lipid metabolic mediators, in the balance between osteogenesis and adipogenesis

○Minamizaki T，Yoshioka H，Takei Y，Yoshiko Y

Dept Calcif Tissue Biol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Fibroblast growth factor 21（FGF21）is expressed primarily in liver and pancreas. FGF21 and βKlotho cooperatively enhance insulin sensitivity and glucose uptake in adipocytes, while glucagon increases plasma FGF21. FGF21 inhibits sumoylation of PPARγ with a resultant increase in PPARγ activity. Because PPARγ is a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis, we investigated the involvement of FGF21 in bone loss and yellow marrow in dietary-induced obesity（DIO）mice administered a thiazolidinedione（TZD）PPARγ agonist. We also examined the effect of FGF21 on mouse bone marrow cells with TZD. DIO mice exhibited higher levels of serum glucose and FGF21 and *Fgf21* mRNA in liver, which was improved by administration of TZD. Meanwhile, TZD increased *Fgf21* expression in white fat of normal and DIO mice. Bone marrow adipogenesis with trabecular bone loss in DIO mice was promoted by TZD, in parallel with the expression of *Klb* in bone. FGF21 increased adipocytes in bone marrow cell cultures, when TZD increased Klb expression. Thus, skeletal and extraskeletal consequences via FGF21/βKlotho may be involved in bone marrow adipogenesis and osteogenesis in DIO mice received TZD.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-61　Geranylgeraniol は骨芽細胞分化を促進する

○浦田真梨子[1,2]，古株彰一郎[1]，中富　千尋[1]，松原　琢磨[1]，平田-土屋　志津[2]，諸冨　孝彦[2]，北村　知昭[2]，自見英治郎[1]

[1]九歯大　分子情報生化
[2]九歯大　口腔保存

近年，骨関連疾患に対して，ビスフォスフォネート製剤を代表とする，破骨細胞を標的とした骨吸収抑制薬が多く用いられている．しかし，これらの薬剤は非定型骨折や顎骨壊死などの副作用の恐れもあり，骨芽細胞を標的とした新たな骨形成促進薬の開発が求められている．そこで，今回我々は新たな骨形成促進薬を開発する目的で，試薬レベルではなく創薬上より有利な天然生理活性物質 80 種をスクリーニングし，その骨芽細胞分化に対する作用を検討した．
まず，マウス前骨芽細胞株，MC3T3-E1 細胞を 80 種類の天然生理活性物質で処理し，ALP 活性を測定した．すると，Geranylgeraniol（GGOH）が ALP 活性を強力に誘導することが明らかとなった．また，GGOH は OSX や ALP などの骨芽細胞分化マーカーの発現を誘導し，さらに，マウス初代培養骨髄間質細胞でも GGOH は ALP 活性やこれら骨芽細胞分化マーカーの発現を促進させた．
GGOH はメバロン酸経路の中間体として生体内に存在し，生理的にタンパク質にゲラニルゲラニル基を付加し（ゲラニルゲラニル化），タンパク質の細胞間への結合を促進すると考えられている．そこで，ゲラニルゲラニル化阻害剤である GGTI-298 の GGOH が誘導する骨芽細胞分化に対する作用を検討した．すると，GGTI-298 が濃度依存的に GGOH によって誘導される ALP 活性を抑制した．
以上より，GGOH はゲラニルゲラニル化を介して骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Geranylgeraniol induces osteoblast differentiation

○Urata M[1,2]，Kokabu S[1]，Nakatomi C[1]，Matsubara T[1]，Hirata-Tsuchiya S[2]，Morotomi T[2]，Kitamura C[2]，Jimi E[1]

[1]Dept Molecular Signaling Biochem, Dept Health promotion Kyushu Dent Univ
[2]Div Endodont and Restorative Dent, Kyushu Dent Univ

Recently the development of new therapies for bone related diseases such as osteoporosis and periodontitis, that target enhancing bone formation by stimulating osteoblast offer is required. Therefore, we screened and examined the effect of eighty kinds of physiological active substances on osteoblast differentiation to look for the candidates of therapeutic agent for bone rerated diseases. When the mouse osteoblast cell line, MC3T3-E1 cells were treated with each substance, geranylgeraniol（GGOH）significantly increased alkaline phosphatase（ALP）activity. Quantitative PCR analysis revealed that GGOH enhances mRNA levels of osteoblast maker genes such as Osterix and ALP. GGOH also induced ALP activity and mRNA levels of osteoblast maker genes in bone marrow stromal cells. GGOH physiologically exists as intermediate of mevalonate pathway and contributes to geranylgeranilation. Geranylgeranilation is one from of the prenylation, which is thought to play role as a membrane anchor for proteins. Thus, we examined the effects of GGTI-298, specific inhibitor of geranylgeranilation, on ALP activity induced by GGOH. We revealed that GGTI-298 cancels the stimulatory effect of GGOH on ALP activity in MC3T3-E1. Taken together, these results suggested that GGOH enhances osteoblast differentiation through geranylgeranilation and may be useful for treatment of bone related diseases and bone regenerative medicine.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-62　炎症性骨破壊における破骨細胞の動態―バイオイメージングによる解析―

○鈴木　恵子[1,2]，長岡　正博[1]，鈴木　礼子[1]，篠田　　壽[3]

[1]奥羽大　歯　歯科薬理
[2]昭和大　歯　歯科薬理
[3]東北大　院歯

【目的】骨破壊を起こす唯一の細胞である破骨細胞が造血幹細胞に由来することはよく知られているが，生体内での破骨細胞の分化や移動に関する報告は少ない．そこで本研究では，In vivo imaging 手法を用いて生きている動物を経時的に観察することにより，破骨細胞前駆細胞の体内動態について検討した．【方法】1）SCID マウスの頭蓋骨膜下に LPS（TLR4 agonist）あるいは $Pam_3CSK_4$（TLR2 agonist）を投与して炎症性骨破壊モデル動物を作製した．2）破骨細胞前駆細胞の動態について非侵襲的に観察するため，Luciferase transgenic（Luc Tg）または EGFP transgenic（GFP Tg）ラットから採取した細胞を炎症性骨破壊モデルマウスに静脈内投与したのち，イソフルラン麻酔下，経時的に顕微鏡で観察した．【結果・考察】炎症性骨破壊を起こしたマウスに LucTg ラット由来の破骨細胞前駆細胞を尾静注したところ，3 日後に炎症部位に発光が観察された．また，GFP Tg ラット由来の前駆細胞を用いて同様の実験を行った結果，生きているマウスの頭蓋骨において，複数の核をもつ GFP 陽性細胞，すなわち移入した前駆細胞から分化した破骨細胞を観察することができた．さらに，GFP Tg ラット由来の前駆細胞を移入したマウスから得られた頭蓋骨の非脱灰凍結切片を免疫染色後，共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果，骨吸収窩と一致する部位に TRAP 陽性かつ GFP 陽性の多核破骨細胞が局在することが確認された．【結論】病的骨破壊においては，循環血中に存在する破骨細胞前駆細胞が炎症部位にリクルートされ，局所で活性化を受けて成熟破骨細胞となり骨吸収を起こす可能性が示された．

【会員外共同研究者】国立がん研究セ・分子細胞治療　落谷 孝広，同・機能解析　竹下文隆
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## In vivo imaging of osteoclast precursor recruitment to the inflammatory site where extensive bone destruction occurs

○Suzuki K[1,2]，Nagaoka M[1]，Suzuki R[1]，Shinoda H[3]

[1]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent
[2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Showa Univ
[3]Cent Environ Dent, Grad Sch Dent, Tohoku Univ

Osteoclasts（OC）, which derived from monocyte/macrophage lineage of haematopoietic stem cells, are responsible for both physiological and pathological bone resorption. To clarify whether circulating blood cells can migrate into the inflammation site, we used an in vivo imaging technique. Pre-OC and lymphocytes from luciferase transgenic（LucTg）rat were transferred into SCID mice, after inducing an inflammatory osteolysis by lipopolysaccharide injection. Luc-expressing cells were monitored by noninvasive bioluminescence imaging up to 4 weeks, and bone morphometric changes were assessed by using a micro-computed tomography at the end of the experiment. The results showed that; 1）both pre-OC and lymphocytes were observed in the inflammation site, secondary lymph nodes and spleen within a week, 2）at day 14 and thereafter, only pre-OC localized in the inflammation site, whereas lymphocytes spread systemically to various tissues in the host mice, and 3）resorption lacunae were observed in the inflammation site. Together, these findings indicate that OCPs circulating in the blood stream may migrate into the inflammation site and take part in the rapid and extensive bone destruction.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-63 アディポネクチンによる破骨細胞形成系に及ぼす影響

○天野　　均，大浦　　清

大阪歯大　薬理

【緒言】アディポネクチンは脂肪組織から分泌され，インシュリン感受性の亢進，動脈硬化抑制，抗炎症作用などの多様な作用を持つ．骨代謝に関しても骨芽細胞における BMP-2mRNA 発現の亢進等が報告されている．今回我々は，アディポネクチンによる破骨細胞分化への関与を検討する目的で，RAW264.7 細胞を用いた破骨細胞形成系に及ぼす影響を検索した．【方法】96 穴プレートを用いて $4\times10^4$/well になるように RAW264.7 細胞を撒いた．PH7.0αMEM に 100 ng/mLsRANKL を添加して 6 日間培養した．培養終了後，4% パラホルムアルデヒドにて固定後，TRAP 染色やローダミン・ファロイジン染色を行い，破骨細胞数を計測した．アディポネクチン濃度依存性の検討およびアディポネクチン添加を前半 3 日間添加群と後半 3 日間添加群とに分けることで作用時期についても合わせて検索した．【結果・考察】アディポネクチン濃度依存的に sRANKL による破骨細胞形成数及びアクチンリングを持つ破骨細胞数は抑制された．さらにアディポネクチン前半添加群よりも後半添加群の方が分化抑制を認めた．このことより，破骨細胞分化はアディポネクチンによる破骨細胞分化抑制は分化段階の初期段階により強く影響を及ぼす可能性が示唆された．【結論】これらの結果より，アディポネクチンは破骨細胞の分化を抑制することで骨代謝に強く関わっていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effect of adiponectin on osteoclast formation

○Amano H，Oura K

Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ

It is well known that adiponectin is produced by adipose tissue, it is protective and appears to reduce inflammation. We investigated that effect of adiponectin on osteoclasts formation using sRANKL induced RAW264.7 cells. RAW264.7 cells to become 4 X $10^4$/well using a 96-well plate. We added 100 ng/mLsRANKL in PH7.0 alfa MEM and cultured cells for 6 days. Adiponectin strongly suppressed the cell-cell fusion and proliferation of osteoclast precursor cells. A small number of multinucleated osteoclasts and many small osteoclasts were observed when cultured with adiponectin. These results provide evidence for the important finding that adiponectin effects osteoclast differentiation and possesses anti-inflammatory properties.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-64 破骨細胞は，骨基質を吸収するだけではなく，核数が多くなると骨細胞も吸収する～破骨細胞は核数依存的に異なった機能を発現するのか？～

○鈴木　礼子[1]，今井　　元[2]，長岡　正博[1]，鈴木　恵子[1]

[1]奥羽大　歯　歯科薬理
[2]奥羽大　歯　生物

【目的】破骨細胞は，単球－マクロファージ系前駆細胞に由来する巨細胞で，細胞融合により多核化し，骨基質を吸収するために最終分化する．一方，演者らは，破骨細胞による骨細胞吸収像が観察されることを発見している（Suzuki R et al., Tissue Cell 2003）．しかしながら，破骨細胞の多核化と骨細胞吸収能発現との関連性は不明なままである．そこで，本研究は，破骨細胞による骨細胞吸収の頻度と，破骨細胞の核数と骨細胞吸収能の発現との関連性について解明することを目的として行った．【材料と方法】生後 4 日齢雌性日本白色種ウサギ（kbl:JW）2 羽を灌流固定し，大腿骨骨幹部を摘出して浸漬固定した後，通法に従って脱灰・後固定・脱水し，骨内膜部分を含む骨小片のエポン樹脂包埋標本を作製した．次に，標本ブロックから無作為に 2 個抽出して以降の試料とした．2 個の試料からは，連続準超薄切片（0.5 μm 厚）をそれぞれ約 1500 枚ずつ作製し，連続的に光学顕微鏡写真を撮影した．そして，写真上で骨細胞吸収像を伴う破骨細胞と伴わない破骨細胞の核数を計測した．なお，本研究は，動物実験実施時に在籍していた朝日大学の動物実験に関する倫理審査において承認されたものである．【結果】骨細胞吸収像を伴う破骨細胞は，観察した破骨細胞総数 385 個中 126 個（32.7%）であった．また，骨吸収像を伴う破骨細胞の方が，伴わない破骨細胞よりも核数が統計学的に有意に多かった（Welch's t test，$p<0.01$）．さらに，単核で，かつ骨細胞吸収像を伴う破骨細胞は観察されなかった．【結論】破骨細胞が骨細胞を吸収する頻度が稀ではなく，破骨細胞の核数と骨細胞の吸収との間に関連性が認められたことから，破骨細胞の多核化と骨細胞吸収能の発現の間に何らかの関連がある可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Osteoclasts with large nuclear number can not only resorb bone matrix but also engulf osteocytes

○Suzuki R[1]，Imai H[2]，Nagaoka M[1]，Suzuki K[1]

[1]Dept Dent Pharmacol, Sch Dent, Ohu Univ
[2]Dept Biol, Sch Dent, Ohu Univ

Osteoclasts are multinucleated cells formed from hematopoietic precursors of the monocyte-macrophage series by mean of cell fusion and terminally-differentiated cells in order to resorb bone matrix. In 2003, we presented the microscopic photographs of osteoclasts engulfing osteocytes（Suzuki R et al., Tissue Cell）. However it is still unknown whether multinucleation contributes to the functional expression regarding to engulfment of osteocytes concerning osteoclasts, or not. Therefore this study aimed to clarify the relationship between the nuclear number and the engulfment of osteocytes concerning osteoclasts as well as the abundance ratio of osteoclasts engulfing osteocytes. Femoral mid-shafts of young female rabbits（kbl: JW）were sectioned into serial 0.5 micrometer-thick semithin sections. The sections were photographed under the light microscopy and then the distribution of nuclear number of 'osteoclasts engulfing osteocytes' and 'osteoclasts not engulfing osteocytes' were examined. As a result, the abundance ratio of 'osteoclasts engulfing osteocytes' was 32.7% and there was no mononuclear osteoclast engulfing osteocytes. It was also demonstrated that the nuclear number of 'osteoclasts engulfing osteocytes' was statistically larger than that of 'osteoclasts not engulfing osteocytes'. Conclusively, this study showed that there is some relationship between multinucleation and the functional expression regarding to engulfment of osteocytes concerning osteoclasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-65 メッケル軟骨吸収における軟骨基質内への血管系の侵入様相

○井上貴一朗[1]，牛島　夏未[2]，八木原　澄[1]，森田　　航[1]，高橋　　茂[1]，土門　卓文[1]

[1]北大　院歯　口腔機能解剖
[2]北大　院歯　学術支援

【目的】メッケル軟骨前方部の吸収は，軟骨膜の消失に続く基質内への血管侵入によって動員された破骨細胞等による石灰化基質の侵食とされている．石灰基質吸収関連の解明に比べ，基質内への血管侵入の様相やその役割についてほとんど明らかになっていない．そこで基質内に侵入する血管系の役割を知る目的で，血管内皮細胞および周囲細胞のメッケル軟骨基質内への侵入様相について免疫組織化学的に検討を行った．【方法】メッケル軟骨の吸収が前方部で始まっているE16.5のマウスを用い，吸収部における血管内皮細胞（トマトレクチン，CD31，ephrin-B2，Eph-B4，IV型コラーゲン），周皮細胞（$\alpha$-SAM，PDGFR$\beta$），破骨細胞（TRAP，MMP-9，Cathepsin K）等の侵入様相を知るために免疫組織化学的に光顕および電顕的検索を行った．【結果と考察】メッケル軟骨の吸収前線では，石灰化軟骨基質に対しTRAP・Cathepsin K陽性破骨細胞が破線状に並び，この層全体にMMP-9の発現が認められた．その破骨細胞層に隣接しメッケル軟骨を包むように複数の毛細血管が認められ，その外側に切歯歯胚が接している．吸収前線の基質側では，開放状態の軟骨小腔の層から未侵食の層に移行する間の領域でトマトレクチン，CD31，IV型コラーゲン陽性の血管内皮細胞および突起が確認でき，血管内皮細胞が基質内に深く侵入し本層の小腔内面全体に展開していた．$\alpha$-SAM，PDGFR$\beta$の発現も同層で確認でき，周皮細胞も血管内皮細胞とともに基質内に侵入していると考えられる．その様な小腔のいくつかでは内部に軟骨細胞も観察され，そこではephrin-B2とEph-B4の発現が同様な位置に認められた．これらはリガンドと受容体であることから，小腔内に侵入した血管系細胞とメッケル軟骨細胞との間においてEph/ephrinの相反的発現パターンが存在し，ephrin-B2/Eph-B4の双方向性シグナル伝達が行われている可能性が考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Vascular invasion of cartilaginous matrix within Meckel's cartilage resorption

○Inoue K[1]，Ushijima N[2]，Yagihara S[1]，Morita W[1]，Takahashi S[1]，Domon T[1]

[1]Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Lab EM, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

In order to know the role of vascular invasion of the cartilaginous matrix within Meckel's cartilage resorption, this research focused on the behaviors of endothelial cells and perivascular cells in that process. Using E16.5 mice, which has already begun resorption on the anterior portion of the Meckel's cartilage, endothelial cells（tomato-lectin; CD31; Eph-B4; ephrin-B2 and type IV collagen）, pericytes（alpha-SAM and PDGFR-beta）and osteoclasts（TRAP; MMP-9; Cathepsin-K）at the resorption part was observed light microscopically and electron microscopically. On the matrix side of the invasion front, tomato-lectin, CD31, and type IV collagen immunopositive endothelial cells were observed in a region between a layer containing cartilage lacunas which was opened and a univaded layer. Alpha-SAM and PDGFR-beta was also observed at the same layer, which showed pericytes was invaded into the matrix. From this fact, it is assumed that vascular invasion occurs in the deeper part on Meckel's cartilage and that vascularization spread over the inside of each lacuna. In these lacunas, chondrocytes were observed. Besides, the expression of ephrin-B2 and Eph-B4 was observed at the same location. These two are ligand and receptor, which implies the possibility of Eph/ephrin signaling between vascular cells which invaded to lacunas and chondrocytes.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-66 骨細胞が反応する応力の種類・強度に関する有限要素法を用いた組織化学的解析

○渡邉　竜太，矢野　　航，佐藤　和彦，小萱　康徳，江尻　貞一

朝日大　歯　口腔解剖

【目的】メカニカルストレスが骨に加わるとそれを感知した骨細胞が sclerostin の産生調節を介して骨芽細胞による骨形成を調節する事が知られている．しかし骨細胞が生体骨組織内でどのような種類・強度のメカニカルストレスに対して応答するかは明らかにされていない．本研究では咬合力により生理的に歯牙の遠心移動が生じるラット上顎歯槽骨を用い，骨組織内の種々の応力の分布と強度について有限要素法を用いて解析するとともに，メカニカルストレスに呼応して産生が抑制される sclerostin の局在分布を組織化学的に解析することで，骨細胞が sclerostin 産生調節において反応する応力の種類と強度について解析を行った．【材料と方法】μCT 画像をもとに，歯・歯槽骨・歯根膜に物性値を設定した有限要素解析モデルを作成し，ラット上顎歯槽骨における仮想咬合力を過去の報告によって決定した後，歯槽骨における歪み，圧縮応力，引張応力，von Mises 応力の分布を有限要素法により解析した．また同一試料にて sclerostin の局在を免疫組織学的に検索し，各種応力の分布と比較した．【結果と考察】von Mises 応力が集中する領域の歯槽骨では sclerostin 免疫反応が弱く，特に約 0.5 MPa 以上の von Mises 応力が加わる領域では sclerostin 免疫反応がほとんど認められなかった．また圧縮応力・引張応力の分布と sclerostin の免疫局在分布は一致しなかった．これらの事から，骨細胞の sclerostin 産生の抑制反応は，全ての主応力を加味した von Mises 応力の強度に依存しており，圧縮応力・引張応力と個々には呼応していないことが示された．即ち，骨細胞の細胞質突起は様々な方向へ配列しているため，圧縮・引張に関わらず細胞に加わった全ての応力の総和に対して骨細胞が応答している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histochemical studies with finite element analysis about the type and intensity of the mechanical stress for osteocyte reaction

○Watanabe R，Yano W，Satoh K，Kogaya Y，Ejiri S

Dept Oral Anat, Div Oral Structure, Function and Development, Asahi Univ Sch Dent

Osteocyte detects mechanical stress and regulates osteoblast activation by adjustment of sclerostin secretion when mechanical stress loaded to a bone tissue. However, the types and intensity of mechanical stress leading to osteocytes reaction in vivo have not been clearly shown. In order to clarify the types and intensity of mechanical stress, we analyzed various stress distribution in alveolar bone tissue of rat maxilla receiving physiological occlusal force using finite element method (FEM), and simultaneously detected immunolocalization of sclerostin. In the region where high von Mises stress was observed, sclerostin immunoreaction was weak. In particular the immunoreaction was not recognized in the region where the intensity of von Mises stress was more than 0.5 MPa. Moreover, it was not related between the distribution of compression and tensile stresses and the localization of sclerostin. Consequently the osteocyte response correlated with the von Mises stress, and does not depend on compressive and tensile stresses.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-67　ラットモデルにおけるインプラント周囲骨組織の治癒経過

○辻村麻衣子[1]，中原　　賢[2]，前田　健康[3]，吉江　紀夫[1]

[1]日歯新潟　解剖 2
[2]日歯新潟　先端研
[3]新潟大　院医歯　口腔解剖

インプラント治療では，光学顕微鏡下でインプラント体が直接骨と接触することを正常な治癒とする．歯科インプラントの成功は周囲の骨組織が負っているため，インプラント周囲骨の治癒経過を解明することはインプラント治療に有用な情報を与える．本研究の目的は，インプラント埋入後の周囲骨の治癒変化を多角的に検証することである．4 週齢雄性ウィスター系ラットの上顎両側第一臼歯を抜歯し，4 週間後，純チタンインプラントを埋入した．一部のモデルラットに対しては，治癒期間に骨のラベリング剤を投与した．インプラント埋入後，一定の治癒期間をおいて安楽死させ，試料を採取した．マイクロ CT 撮影後，樹脂包埋して研磨切片を作製した．共焦点レーザー顕微鏡による骨ラベリング像の撮影後，トルイジンブルー・塩基性フクシン染色を施し，タイリング画像取得システムを用いて広範囲にインプラント周囲骨を観察した．また，同モデルラットを灌流固定し，作製したパラフィン切片に protein gene product 9.5（PGP9.5）の免疫染色を施し，光学顕微鏡により観察した．また，インプラントを埋入していない対照ラットにおいても，同様に，マイクロ CT 撮影と組織学的観察を行った．その結果，マイクロ CT と組織学的観察により，抜歯後 1ヵ月での抜歯窩の治癒が確認された．インプラントを埋入したモデルラット試料のマイクロ CT 像により，インプラントと周囲骨の結合状態の経時的変化が明らかになり，組織学的観察により，骨リモデリングによる骨組織の治癒変化が裏付けられた．また，治癒過程において，インプラント周囲骨に PGP9.5 の免疫陽性反応が認められた．これにより，インプラント周囲骨の治癒過程に神経が関わる可能性が示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Healing of bone tissue surrounding titanium implants in a rat model

○Tsujimura M[1]，Nakahara K[2]，Maeda T[3]，Yoshie S[1]

[1]Dept Histol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[2]Adv Res Center, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[3]Div Oral Anat, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

The favorable prognosis of dental implantation depends on the condition of the surrounding bone. Therefore, we examined the chronological alteration in healing process of the bone surrounding titanium implants using a rat model. We investigated the surrounding bone by using micro-CT, bone labeling, and immunohistochemistry for protein gene product 9.5（PGP9.5）as a general neuronal marker. In addition, we observed the bone after tooth extraction by the same means and confirmed the bone tissue filled in the exacted socket at one month after extraction. The bone healing around the implants was supported by the results of micro-CT, histological observation, and the three-dimensional images of the labeled bone by confocal laser scanning microscopy. The immunopositive reaction for PGP9.5 appeared in the surrounding bone around the implants in the healing process. These nerves in the surrounding tissue around the implant might participate in the healing of the surrounding bone.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-68 エストロゲンによる鳥類骨髄骨の破骨細胞の機能およびアポトーシス制御について

○樋山　伸二，渡邉　峰朗，内田　　隆

広島大　院医歯薬保　口腔細胞生物

【背景・目的】哺乳動物の破骨細胞はエストロゲンによりアポトーシスが誘導される．これは，骨粗鬆症の要因の 1 つである閉経後のエストロゲン欠乏と密接な関係がある．鳥類の骨髄骨は卵殻カルシウムの供給源として，産卵周期の血中エストロゲン値の増減に伴い，骨髄腔内でリモデリングを繰り返している．この破骨細胞は，高い血中エストロゲン値を示す骨形成期においても，アポトーシスを起こさず，骨髄骨表面で休止状態となる．このように，哺乳動物と鳥類の破骨細胞では，エストロゲンの応答に差異が認められるが，その詳細は明らかではない．そこで，本研究では，エストロゲン（E2）投与による雄ウズラの骨髄骨形成モデルを用いて，破骨細胞の機能およびアポトーシスへのエストロゲンの作用について検討した．【方法・結果】E2 投与 5 日後の骨髄骨吸収期である雄ウズラに E2 を再投与した．骨髄骨は骨髄中心に形成が進み，その表面に存在する破骨細胞は扁平を呈し，V-ATPase の発現の減少が見られた．しかしながら，これらの破骨細胞はアポトーシスを示さず，骨髄細胞の FACS 解析においても，破骨細胞の前駆細胞数およびアポトーシス細胞数に変動はなかった．次に，E2 投与 3 日後の骨髄細胞を RANKL/M-CSF により破骨細胞に誘導するとともに，17$\beta$ エストラジオール（17-E）を添加し培養した．破骨細胞形成に影響は認められなかったが，17-E により骨吸収は抑制された．さらに，17-E により，アクチンリングの形成不全が認められ，V-ATPase の発現が減少していた．【考察】エストロゲンは，鳥類骨髄骨の破骨細胞において，分化およびアポトーシスに影響を与えないが，形態を変化させ，さらに機能を制御していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Estrogen does not induce apoptosis, but regulates function of avian medullary bone osteoclasts

○Hiyama S，Watanabe M，Uchida T

Dept Oral Biol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Estrogen induces apoptosis of mammalian osteoclasts, which may be closely related to postmenopausal osteoporosis. Medullary bone（MB）, a calcium reservoir for egg-shell formation in the bone marrow cavity of female birds, is remodeled under the powerful control of estrogen. During this process, estrogen does not induce apoptosis in MB osteoclasts. Clarifying the difference in responses to estrogen between avian and mammalian osteoclasts may be helpful to identify additional roles of estrogen in bone. Therefore, we examined the effects of estrogen to osteoclasts using estrogen（E2）-treated male Japanese quails. Five days after first injection of E2 into quails, second injection of E2 was given to same quails. Thereafter, osteoclasts on the MB surface became smaller and flat-shaped and its V-ATPase immunoreactivity was down-regulated progressively. Next, three days after single E2 injection, bone marrow cells were cultured with/without 17beta-estradiol（17-E）in the presence of RANKL/M-CSF for a week. 17-E did not affect osteoclastogenesis, while it decreased bone resorption activity and V-ATPase activity. Further, these cells were failed to form of actin ring by 17-E. These results suggest that estrogen may have no effect on differentiation and apoptosis, but suppress function by morphological changes of medullary bone osteoclasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-69 低出力超音波パルスを照射したヒト歯槽骨骨膜由来細胞スフェロイドに関する超微構造学的研究

○宮城　直美[1]，東　　一善[1]，前田　信吾[2]，河田　　亮[1]，高橋　　理[1]

[1]神奈川歯科大　院歯　神経組織発生
[2]神奈川歯科大　総合教育

緒言：ヒト歯槽骨骨膜由来細胞（HABPCs）の細胞凝集塊（スフェロイド）に低出力超音波パルス（LIPUS）を照射した場合，照射部位に対応して骨タンパク質が発現する．本研究では，オステオポンチン（OP），オステオカルシン（OC）の免疫組織化学的検索と照射側および反対側（非照射側）の細胞の超微構造学的な解析を行った．材料及び方法：免疫組織化学的方法は，HABPCs のスフェロイドを作成し固定用リングに静置，1，3，7，14 日間，LIPUS を照射した後に凍結切片を作製した．それらに OP と OC の免疫組織化学的検索を行った．また，電子顕微鏡用試料は通法に従って作製した．その後，電子顕微鏡下で細胞の超微細構造を観察した．結果：免疫組織化学法による光学顕微鏡の観察では，1 日目の照射側において深層に OP，OC 免疫陽性細胞が観察された．表層では細胞の長軸を深部に向けた細胞の列（索状構造）が少数観察された．7，14 日目では表層のみにおいて OP，OC 免疫陽性細胞がわずかに認められた．OP，OC 免疫陽性細胞は中層，深層では観察されなかった．一方，非照射側では OP，OC の発現が 7 日目以降に全層において認められた．電子顕微鏡を用いた観察では，1 日目の照射側の HABPCs は紡錘形～星形の形態を呈し，それら細胞の形状により表層，中層，深層に区分でき，その一部が索状構造を呈した．非照射側ではこれら細胞の形態学的変化が明らかではなかった．実験 3 日目では照射側の表層と中層の細胞は多くの顆粒を有し，深層の細胞には少数の顆粒が観察された．7，14 日目の実験では索状構造が不明瞭となり，細胞数も減少した．非照射側では細胞の形態学的な変化は実験 3 日目より観察された．考察：以上の結果より LIPUS の照射により HABPCs の骨タンパク質の合成と細胞の形態学的変化が促進されるものと考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Ultrastructural study of periosteal cell spheroids to the human alveolar bone with exposure to low-intensity pulsed ultrasound

○Miyagi N[1]，Higasi K[1]，Maeda S[2]，Kawata A[1]，Takahasi O[1]

[1]Dept Neuroanatomy, Histol and Embryol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch
[2]Div Curriculum Development, Kanagawa Dent Univ

In this study spheroid made from human alveolar bone periosteal cells（HABPCs）with exposure of low-intensity pulsed ultrasound（LIPUS）were invetigated with immunohistochemical and ultrastructural study. As a results spheroid cells showed some type of morphological change and immunoreactivity to osteopontin（OP）and osteocalcin（OC）according to direction of exposure to LIPUS. Moreover they showed some morphological change according to superficial, intermediale, and deep layer of the spheloids. From these results, it was shown that LIPUS exposure to HABPCs have exerted some effect on cells which showed immunoreactivity to OP and OC.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-70　軟骨発生および軟骨細胞分化における転写調節因子 Irx3 の役割

○玉村　禎宏[1]，目良　　恒[1]，糸数　万紀[1,2]，脇谷　滋之[1,3]

[1]武庫川女大　健康スポーツ科学
[2]大阪市大　院医　整形外科
[3]広島大　院医歯薬保　人工関節　生体材料

本研究では，軟骨における発現および機能が未知である転写調節因子 Irx3（Iroquois-related homeobox gene 3）の軟骨発生および軟骨細胞分化に対する役割を調べることを目的とする．免疫染色の結果，マウス軟骨発生において Irx3 は前肥大層から肥大層にかけて発現していた．次に，軟骨発生における Irx3 の役割を調べるためにマウス胎児肢芽細胞にレトロウイルスを用いて Irx3 を過剰発現させ micromass culture を行ったところ，アルシアンブルー染色がやや亢進した．一方，軟骨細胞分化における役割を調べるためにウサギ初代軟骨細胞に Irx3 を過剰発現させると，アルシアンブルー染色が強力に抑制された．免疫染色の結果から軟骨細胞の肥大化に関わる遺伝子に着目して real-time PCR により検討したところ，Irx3 は Lef1 や Tcf7 などの Wnt/beta-catenin（Wnt/bcat）シグナル構成遺伝子の発現を上昇させることが判明した．さらに C3H10T1/2 細胞において同シグナルレポーター遺伝子 TOPFlash を用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ，Irx3 はコントロールと比較して約 20 倍ルシフェラーゼ活性を上昇させ，この活性上昇は dominant-negative Lef1（DNLEF1）の共発現によって抑制された．また，安定型 beta-catenin（deltaN-bcat）による TOPFlash 活性上昇は，dominant-negative Irx3（DNIrx3）の共発現によって抑制された．以上の結果から，Irx3 は軟骨発生を促進し，軟骨細胞分化を抑制することが明らかとなった．また，過去の研究から Wnt/bcat シグナルの軟骨細胞分化抑制作用が報告されており，Irx3 による軟骨細胞分化抑制は Lef1 や Tcf7 発現上昇による同シグナルの活性化を介する可能性が示唆された．現在軟骨細胞分化における Irx3 の作用と Wnt/bcat シグナルの関係を Irx3 と DNLEF1 もしくは DNIrx3 と deltaN-bcat の共発現により検討中である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of Irx3 in chondrogenesis and chondrocyte differentiation

○Tamamura Y[1]，Mera H[1]，Itokazu M[1,2]，Wakitani S[1,3]

[1]Dept Health and Sports Sci, Mukogawa Women's Univ
[2]Dept Orthopedic Surgery, Osaka City Univ Grad Sch Med
[3]Dept Artificial Joint Biomaterials, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci

Irx3 is a transcription factor which belongs to Iroquois-related homeobox（Irx）gene family. Role of Irx3 in chondrogenesis and chondrocyte differentiation are largely unknown. Irx3 proteins were detected in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes of mouse growth plate by immunohistochemistry. Retrovirally overexpression of Irx3 in mouse embryonic limb bud cells resulted in enhanced alcian blue staining. On the other hand, overexpression of Irx3 in rabbit primary chondrocytes resulted in decreased alcian blue staining. Expression of Lef1 and Tcf7, which are downstream components of Wnt/beta-catenin（Wnt/bcat）signaling pathway, were upregulated in Irx3-expressing chondrocytes. Moreover, activity of Wnt/bcat signaling reporter gene（TOPFlash）was increased nearly 20-fold in Irx3-transfected C3H10T1/2 cells compared to empty vector transfected cells. This increase in reporter activity was suppressed by coexpression of dominant-negative form of Lef1. Also, increase in TOPFlash activity in cells transfected with stable form of beta-catenin was suppressed by coexpression of dominant-negative form of Irx3. These results demonstrate that Irx3 promotes chondrogenesis but inhibits chondrocyte differentiation. Previous study reported that Wnt/bcat signaling inhibits chondrocyte differentiation. Therefore, inhibition of chondrocyte differentiation by Irx3 might be mediated by activation of Wnt/bcat signaling caused by upregulation of Lef1 and Tcf7 expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-71　破骨細胞前駆細胞の維持におけるファイブロネクチンN末端領域の役割

○天野　　滋，大森　喜弘

明海大　歯　口腔生物再生医工

歯周疾患や関節リウマチにおける骨破壊は，破骨細胞による骨吸収亢進を伴う骨代謝のバランスの不調和によると考えられている．破骨細胞分化・機能発現に関する破骨細胞調節因子の役割は広く研究されているが，破骨細胞に分化できる単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞の増殖維持に必要な因子については，ほとんど知られていない．私達は，頭蓋冠由来間葉系細胞の培養上清が破骨細胞前駆細胞株4B12細胞の維持に必要不可欠であることを報告している．この結果は，破骨細胞前駆細胞維持因子の存在を示唆している．本研究は，この因子を同定すること，同定したその因子の発現調節機構そして破骨細胞前駆細胞機能維持の調節機構を明らかにすること，そして骨破壊におけるこの因子の役割を解明することを目的としている．私達はすでにmouse Insulin-2，FibronectinN末端部分，Nidogen-2，そしてIGFBP-2が，破骨細胞前駆細胞維持因子として同定されたことを報告している．今回私達は，IGFBP-2とFibronectinN末端部分のアミノ酸配列で相同性の高い領域が，RANKLに対する破骨細胞前駆細胞の応答性の維持・促進に関与していることを報告する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Roles of N-terminal region of Fibronectin in maintaining of osteoclast precursors

○Amano S，Ohmori Y

Dept Oral Biol Meikai Univ Sch Dent

It is assumed that bone destruction in periodontal disease and rheumatoid arthritis is due to an imbalance in bone remodeling that favors bone resorption by osteoclasts. The role of osteoclast regulatory factors for osteoclast differentiation and function has been extensively studied, however little is known about factors required for maintenance and proliferation of osteoclast precursor with monocyte/macrophage phenotypes being able to differentiate into osteoclasts. We have reported that calvaria-derived stromal cell conditioned media（CSCM）is essential for maintaining for osteoclast precursor cell line, 4B12. This result suggests the existence of maintenance factors of osteoclast precursors. The aim of the present study is to identify the factors in CSCM, clarify the regulation of the gene expression and the regulatory mechanism for maintenance of osteoclast precursor function, and elucidate the role of the factors in bone destruction. We have reported that mouse Insulin-2, N-terminal region of Fibronectin, Nidogen-2, and IGFBP-2 were identified as maintenance factors of osteoclast precursors. This time, we will report that the highly conserved amino acid sequence portion between N-terminal region of Fibronectin and IGFBP-2 involves in maintaining and enhancing the responsiveness of osteoclast precursors to RANKL.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-72 カエル味覚受容器におけるカルシウム結合タンパク質カルビンディンとカルレチニンの発現

○安藤　宏[1]，今村　泰弘[2]，田所　治[3]，十川　紀夫[2]，金銅　英二[3]，北川　純一[1]

[1]松本歯大　口腔生理
[2]松本歯大　歯科薬理
[3]松本歯大　口腔解剖Ⅰ

【目的】カルシウムは味細胞の細胞内情報伝達で重要な役割をするが，カルシウム結合タンパク質の味細胞のタイプによる発現の違いやその働きは明らかになっていない．カエル味蕾（味覚円盤）には形態的に異なる6種のタイプの細胞がある．これらの細胞におけるカルシウム結合タンパクカルビンディン(CB)とカルレチニン(CR)の発現をウエスタンブロット法と免疫組織学化学的方法により調べた．【方法1】ウエスタンブロット法：ウシガエルの味覚円盤は茸状乳頭上端に1個含まれる．舌背側に約500個存在する茸状乳頭を摘出し，ホモジナイザーにて破砕後，SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し，1次抗体として，ウサギポリ抗CB抗体およびマウスモノ抗CR抗体でそれぞれ検出させた．【方法2】免疫組織化学的方法：ホルマリン還流固定したウシガエルから舌を摘出し，クリオスタットで凍結切片を作成した．一次抗体はウエスタンブロット法と同じものを用い蛍光二重染色法によりカルシウム結合タンパク質の免疫局在を観察した．【結果と考察】ウエスタンブロット法により，CBとCRの発現が，茸状乳頭に確認された．免疫組織化学的方法により，味覚円盤内の細胞にCBおよびCR免疫陽性反応が観察された．CB免疫陽性細胞は，味覚円盤の中間層に位置する細胞体より，表層側へ単独棒状の突起を伸ばしていた．基底層へ向かう突起は，1本のものが観察されたが，明瞭な突起が観察されないものもあった．CR免疫陽性反応を示した細胞は，味覚円盤の中間層の細胞体があり，表層に向かう突起の大半は，CB陽性細胞の突起より細い単独棒状であった．基底層に向かう突起は単独型と樹状型のものがみられた．以上の結果から，CB免疫陽性細胞は味覚円盤で報告されているII型細胞，CR免疫陽性細胞はIII型細胞にそれぞれ似ており，カルシウム結合タンパク質の発現が味覚円盤の細胞型により異なることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of calcium binding proteins calbindin and calretinin in the taste organ of frog

○Ando H[1]，Imamura Y[2]，Tadokoro O[3]，Sogawa N[2]，Kondo E[3]，Kitagawa J[1]

[1]Dept Oral Physiol, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Pharmacol, Matsumoto Dent Univ
[3]Dept Oral Anat, Matsumoto Dent Univ

Calcium plays a critical role in the intracellular signal transduction of taste stimuli. However, little is known about expression patterns of calcium-binding proteins in specific types of taste cells. To clarify the distribution and abundance of the calcium binding proteins, calretinin（CR）and calbindin（CB）, western blot and immunohistochemical studies were performed with the taste disc（TD）, which contains six types of cells, in the fungiform papillae of the frog（Lithobates catesbeianus）. Western blotting showed the expressions of CB and CR in the TD. The CB- immunoreactive（IR）cells were located in the middle layer of the TD. These cells extended one thick rod-shaped apical process and one basal process. The CR- IR cells were also located in the middle layer of the TD. They possessed one thin rod-shaped apical process and one or several branched basal processes. The present observations suggest that CB-IR cells and CR-IR cells are similar to type II and type III cells of the frog TD respectively.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-73　マウス苦味受容味細胞の応答特性

○吉田　竜介，二ノ宮裕三

九大　院歯　口腔機能解析

ヒトやマウスは，25-35 種の苦味受容体（T2Rs）の遺伝子を持ち，各苦味受容体は様々な苦味物質に対しそれぞれ異なる応答特性を持つ．これまでの研究で，各味細胞が多種の苦味受容体を発現することが示されており，これは苦味細胞が広範囲の苦味物質に対する応答能を持つことを示唆する．また別の研究では，苦味受容体の発現パターンは各味細胞によって異なることが示されており，これは各味細胞が限られた範囲の苦味物質にだけ応答することを示唆する．本研究では，10 種類の苦味物質（キニーネ，デナトニウム，シクロヘキシミド，カフェイン，シュクロースオクタアセテート，テトラエチルアンモニウム，フェニルチオウレア，L-フェニルアラニン，硫酸マグネシウム，高濃度サッカリン）に対するマウス茸状乳頭の苦味受容細胞の応答を調べ，各苦味細胞の応答特性を明らかにした．その結果，多くの苦味受容細胞は多種の苦味物質に対し応答を示し，特にキニーネ，デナトニウム，シクロヘキシミドに良く応答した．これら苦味受容細胞を応答プロファイルに基づきクラスター解析により分類すると，大きく 4 タイプ（キニーネに主に応答する Q タイプ，シクロヘキシミドに良く応答する C タイプ，デナトニウムに良く応答する D タイプ，様々な苦味物質に応答する CQD タイプ）に分類された．以上の結果から，マウスの苦味受容細胞は様々な苦味物質に対しそれぞれ異なる応答特性を持つ可能性が示唆される．また現在，マウス有郭乳頭の苦味受容細胞の応答特性についても解析を進めており，茸状乳頭の応答特性とは若干異なる結果が得られていることから，苦味受容細胞の応答特性に舌部位差が存在する可能性が考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Taste responses of bitter sensitive taste cells in mice

○Yoshida R，Ninomiya Y

Sec Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ

In humans and mice, 25-35 types of T2Rs are reported to function as bitter taste receptor, each of which has different tuning property for bitter compounds. Previous studies demonstrated that all or majority of T2Rs are expressed in single taste receptor cells, suggesting that bitter taste cells have broad receptive range for bitter compounds. In contrast, others demonstrated heterogeneous expression patterns of T2Rs in taste bud cells, indicating that bitter taste cells are tuned to detect a limited subset of bitter compounds. In this study, we recorded responses of individual bitter sensitive taste cells to multiple bitter compounds（quinine, denatonium, cyclohexamide, caffeine, sucrose octaacetate, tetraethylammonium, phenylthiourea, L-phenylalanine, $MgSO_4$, and high concentration of saccharine）to elucidate responsiveness of each of bitter sensitive taste cells. Majority of bitter sensitive cells in mouse fungiform papillae showed responses to multiple bitter compounds. These cells well responded to cyclohexamide, quinine and denatonium. These bitter sensitive cells were divided into several groups according to their response profiles for bitter compounds. These results suggest that individual bitter sensitive taste cells have different response properties for multiple bitter compounds.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-74　マウス鼓索神経における脂肪酸に対する単一神経応答の解析

○安松　啓子[1,2]，二ノ宮裕三[1,2]

[1]九大　味覚嗅覚センサ研究開発
[2]九大　院歯　口腔機能解析

【目的】脂肪は基本味に比べ明確な味を惹起しないにもかかわらず，食品に含まれているか否かで食欲への刺激効果はまったく異なっている．近年，脂肪酸受容体 GPR40，GPR120 やトランスポーター CD36 がげっ歯類の味蕾細胞に存在し，脂肪酸を受容している可能性が報告され，食物中の脂肪を検出するために味覚器が重要な役割を果たしている可能性が示唆されている．しかし脂肪の味を伝える神経が脂肪酸を特異的に伝えるものか他の味を伝える神経か，詳細は明らかになっていない．そこで本研究では，脂肪酸による刺激を舌に与え，マウス鼓索神経単一線維における応答を記録した．【方法】動物は C57BL/6J マウスを用い，鼓索神経の単一神経線維における 10 秒間のインパルス頻度を記録した．試験溶液は，NaCl，HCl，sucrose，キニーネ塩酸塩，CaCl2，monopotassium glutamate（MPG）およびその 0.5 mM inosine monophosphate（IMP）混合液，oleic acid，linoleic acid，docosahexanoeic acid を用いた．【結果と考察】記録した鼓索神経の単一神経のうち，約 14％が脂肪酸に最もよく応答を示した．また，甘味応答神経，CaCl2 に最も高いインパルス頻度を示す神経，そしてグルタミン酸（MPG）に最も高いインパルス頻度を示す神経の半数近くにおいて脂肪酸に対する有意な応答が検出された．これらの結果から，脂肪酸が他の味とは独立して伝えられ，脂肪酸の識別に関与する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis of single fiber responses to fatty acids in mouse chorda tympani nerve

○Yasumatsu K[1,2]，Ninomiya Y[1,2]

[1]Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ
[2]Sect Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

The oral perception of fatty acids has been considered to rely mainly on texture and olfaction, but recent findings suggest that taste may also play a role in detection of fatty acids via GPR40, GPR120 and CD36 which express in rodent taste bud cells and mice lacking one of these molecules showed selective reduction neural and behavioral taste responses to fatty acids. To further investigate whether or not taste quality coding pathway for fatty acids to the brain would be present, we examined single fiber responses of the chorda tympani nerve to various taste stimuli including fatty acids（oleic and linoleic acids）, sucrose, NaCl, HCl, CaCl2, quinine and MPG in C57BL/6J mice. Among all single fibers tested, 14% of fibers specifically responded to oleic acid and/or linoleic acid. Significant responses to fatty acids were also detected in a subset of fibers best responded to sucrose, CaCl2 or MPG. Among these 3 types of fiber groups, about half of fibers showed responses to fatty acids. These results suggest a possibility that there may exist a specific neural coding pathway for fatty acids which may play a major role in detection of distinctive taste quality of fatty acids.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-75　Cre-loxP によるマウス味蕾 3 型細胞における Mash1 の機能解析

○瀬田　祐司，豊野　　孝，片岡　真司，中富　満城，木部　琴乃

九歯大　解剖

哺乳動物の味蕾は形態学的に数種類の細胞型に分類される．その中で，3 型細胞は味蕾内で神経線維とシナプスを形成する唯一の細胞であり，酸味の受容に関与していることが推測されている．我々はこれまでに，bHLH 型転写制御因子の中の Mash1 が胎生期の有郭乳頭上皮に発現し，3 型細胞のマーカーである AADC の局在と一致することを報告した．また，成体の味蕾の中でも，Mash1 は基底細胞と一部の 3 型細胞に発現しており，味蕾内では 3 型細胞の分化に関与していることが推測された．さらに，Mash1 ノックアウトマウスを用いて，味蕾の 3 型細胞の分化における Mash1 の機能を検索したところと，ノックアウトマウスでは AADC と GAD67 の発現が消失していることがわかった．しかしながら，Mash1 ノックアウトマウスは生後 24 時間以内に死亡してしまうため，成体における味蕾細胞における Mash1 の機能については，まだ解明されていない．また，味蕾細胞の細胞系譜についても解明されていない．そこで，本実験では Cre リコンビナーゼを使用して，Mash1 発現細胞に GFP を発現させるトランスジェニックマウスを作製し，味蕾における Mash1 発現細胞の細胞系譜を検索した．さらに，Mash1 発現細胞にジフテリア毒素を発現させ，選択的に Mash1 発現細胞を破壊するトランスジェニックマウスを作製し，味蕾細胞分化における Mash1 の機能を検索した．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system

○Seta Y，Toyono T，Kataoka S，Nakatomi M，Kibe K

Div Anat, Kyushu Dent Univ

In the present study, to begin to understand the mechanisms that regulate taste bud cell differentiation, we have investigated the role of Mash1 in regulating taste bud cell differentiation in Mash1 conditional knockout mice（CKO）using Cre-loxP system. We found that amino acid decarboxylase-immunoreactive（AADC-IR）cells and carbonic anhydrase 4-immunoreactive（CA4-IR）cells were significantly reduced in the circumvallate papilla epithelia of Mash1 CKO mice. In Mash1 CKO/GAD67-GFP mice, GFP-positive（GAD67 expression type III cell）cells were also reduced in the taste papilla epithelia. However gustducin, a marker of type II taste bud cells, was expressed in taste buds in the soft palates of Mash1 CKO mice. These results suggest that Mash1 could play an important role of differentiation of the type III cells in the taste bud.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-76　味蕾内レニン-アンジオテンシン系の機能解析

○重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]

[1]九大　院歯　口腔機能解析
[2]九大 味覚嗅覚セ

レニン-アンジオテンシン系（RAS）は，体内電解質バランスの維持に重要なホルモン系である．近年，RAS の主要因子であるアンジオテンシン II（AngII）が腎臓や中枢のみならず，味覚器にも直接作用し，塩味/甘味感受性を修飾することで $Na^+$/糖の摂取量の調節に関与している可能性が示唆された．しかし，この AngII がどのように分泌調節されているかについては不明である．そこで本研究では，マウス味蕾における RAS 構成因子であるレニン（Ren），アンジオテンシノゲン（Agt）およびアンジオテンシン変換酵素（Ace）の発現を解析し，その機能について検討した．この結果，Ren, Agt および Ace1 は味蕾内の一部の味細胞に発現しており，また $\alpha$ENaC（アミロライド感受性塩味受容体）もしくは T1r3（甘味受容体構成分子）と一部共発現していることが明らかとなった．さらに絶水により，味細胞内 Ren の発現が亢進していることが分かった．以上の結果から，味覚器には RAS 系が存在しており，AngII が味蕾内において短時間で局所的に分泌調節されている可能性が示唆された．また，体内 $Na^+$量の低下をともなう循環系 RAS を介したネガティブフィードバック的な味覚調節系とともに，この味蕾内 RAS を介したフィードフォワード的な味覚調節により，体内 $Na^+$/糖の欠乏および過剰摂取が未然に防がれている可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Expression of renin-angiotensin system（RAS）components in taste organ

○Shigemura N[1]，Ninomiya Y[1,2]

[1]Sec Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Res Dev Center Taste Odor Sensing, Kyushu Univ

Renin-angiotensin system（RAS）plays a major role in the regulation of body fluid and sodium homeostasis. Angiotensin II（AngII）is the most powerful biologically active product of the RAS. We recently revealed that AngII suppresses amiloride-sensitive salt taste responses and enhances sweet taste responses via the angiotensin II type 1 receptor（AT1）expressed in taste cells. However, the underlying molecular mechanisms on such taste modulations remain unknown. Here we examined the expression of RAS components producing AngII, renin（Ren）, angiotensinogen（Agt）and angiotensin converting enzyme（Ace）, in mouse taste tissues. We found that all of RAS components were present in taste buds, and co-expressed with ENaC（a salt taste receptor）or T1r3（a sweet taste receptor component）. The expression level of Ren in taste cells increased significantly after water deprivation. These results suggest that taste organ exhibits their own RAS activity, and the specific modulation of taste sensitivity via AngII signaling is regulated by the taste specific RAS（temporal feed-forward regulation）in addition to the classical circulating RAS（continuous negative feedback regulation）. Such reciprocal regulation of peripheral taste sensitivity by the two RASs may play important roles in sodium/calorie homeostasis.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-77 マウス末梢神経切断後の一酸化窒素合成酵素（NOS）の免疫組織化学的局在

○菊地　隆太[1]，安部　仁晴[2]，中川　敏浩[2]，渡邊　弘樹[2]

[1]奥羽大　院歯　口外
[2]奥羽大　歯　口腔組織

【目的】神経細胞死や神経変性疾患の発症には一酸化窒素（NO）が関わっていることが示唆されている．現在，種々の組織・器官においてNOを生成する酵素（一酸化窒素合成酵素：NOS）の局在が確認され，その機能が検討されている．NOSには神経系細胞に存在するnNOS，血管内皮細胞に存在するeNOS，サイトカインの刺激によりNOを合成するiNOSの3種のアイソフォームが存在している．しかし末梢神経切断時のNOの発現とその動態について詳細な検討をした報告は少ない．そこで今回我々は，神経切断後の神経変性と神経再生過程におけるNOSの働きを明らかにするために，切断後神経線維断端を免疫組織化学的に検索した．
【方法】材料にはマウス坐骨神経を用い，方法は，右側坐骨神経を切断後，1，7，14日目に切断部の坐骨神経を周囲筋組織とともに摘出し，凍結切片を作製した．その後，通法に従い免疫組織化学的染色を行い光顕観察を行った．
【結果】nNOSの反応は，切断1日目から14日目にかけて切断端中枢側の神経線維に強陽性を示した．iNOSは，切断1日目では切断端中枢側および切断端末梢側周囲に炎症性細胞の浸潤に陽性反応を示したが，切断7日目以降は減少した．eNOS陽性反応は，切断1日目から切断端中枢側および切断端末梢側の血管に陽性を示し，その後血管の数は増加した．
【考察】神経切断後に主に中枢側でnNOS陽性の神経線維が認められ，末梢側に向かい伸長したことから，NOが神経再生過程に関連性をもつ可能性が考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase（NOS）isoforms after peripheral nerve transection in mice

○Kikuchi R[1]，Ambe K[2]，Nakagawa T[2]，Watanabe H[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Ohu Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral Histol, Ohu Univ Sch Dent

Nitric oxide（NO）is generated by the nitric oxide synthase（NOS）which is identified three isoforms as a neuronal form（nNOS）, an endothelial form（eNOS）, and an inducible form（iNOS）. There are 3 isoforms of NOS: nNOS（neuronal form）, eNOS（endothelial form）, and iNOS（inducible form）. In this study, to clarify the action of NOS in neurodegeneration and nerve regeneration after transection of the sciatic nerve in mice, we immunohistochemically investigated NOS expression. The right sciatic nerve was cut and excised on days 1, 7, and 14 after transection, and frozen sections were prepared. nNOS positivity was detected in the nerve fiber stump on the central side on days 1 to 14 after transection. Inflammatory cells infiltrating around the stumps on the central and peripheral sides were positive for iNOS on day 1, but the positivity level decreased after day 7. eNOS was positive in blood vessels on the central and peripheral sides of the stump from day 1. nNOS-positive nerve fibers were noted mainly on the central side of the stump, and then extended toward the peripheral side, suggesting that NO is involved in the nerve regeneration process.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-78 顎関節機械刺激に対するウサギ視床ニューロンの応答特性

○鈴木　崇弘[1]，若森　　実[2]，坪井　明人[1,3]

[1]東北大　院歯　加齢歯科
[2]東北大　院歯　歯科薬理
[3]東北大　院歯

【目的】顎関節内に位置する機械受容器からの感覚情報は，下顎の姿勢保持や運動制御に重要な働きをしていると考えられているにもかかわらず，その詳細は未だ不明である．我々はこれまで，三叉神経節および三叉神経主感覚核において，ウサギの顎関節機械刺激に応答するニューロン活動の特徴を明らかにしてきた．本研究の目的は，三叉神経主感覚核からの中枢性出力が投射される視床後内側腹側核 Ventral Postero-Medial nucleus（VPM）から顎関節機械受容応答が記録されるか否か，さらには，記録された場合にはその応答特性を明らかにすることである．【方法】イソフルラン導入麻酔後，気道確保されたウサギ（日本白色種，メス）19 羽を用いた（維持麻酔：α-クロラロース・ウレタン）．左側顎角部皮膚と咬筋を除去して露出させた下顎骨を下顎頚部で離断し，顎関節部のみを動かせるようにした後，頭部を脳定位固定装置に固定した．右側頭頂骨の一部と硬膜を除去して露出した大脳皮質表面から金属微小電極を視床に刺入し，顎関節および口腔内，顔面への機械刺激に応答する神経活動を記録した．記録後，過剰麻酔にて屠殺した動物から脳を摘出し，組織学的に記録部位を同定した．【結果と考察】遊離した顎関節への機械刺激に応答を示す 19 個の顎関節機械受容ニューロン（TN）が視床 VPM から記録された．TN の多くは，VPM の吻側および腹側部から記録され，内外側方向に広く位置していた．また，TN と歯根膜機械受容ニューロンは混在していた．今回記録された TN は，すべて顎関節への機械刺激中，発火を持続する応答様式（sustained type）を示し，84％の TN が下顎頭の前方移動時に，58％が下方移動時に応答した．これらの結果から，顎関節機械受容情報は，他の口腔顎顔面部からの感覚入力と同様に反対側 VPM に投射され，持続的な下顎の位置および運動の制御に関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Response properties of thalamic neurons during mechanical stimulation of the temporomandibular joint in the rabbit

○Suzuki T[1]，Wakamori M[2]，Tsuboi A[1,3]

[1]Div Aging Geriat Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[3]Tohoku Med MegaBank Org, Tohoku Univ

The mechanosensitive neurons innervating the temporomandibular joint（TMJ neurons）may play an important role in controlling mandibular movement and position. The purpose of the study was to investigate the response properties of thalamic TMJ neurons（TNs）, which may be relayed from TMJ neurons in the trigeminal ganglion and trigeminal main sensory nucleus, during passive movement of the isolated condyle in 19 rabbits. Nineteen discharges of TNs from the ventral postero-medial nucleus（VPM）of the thalamus were recorded with a microelectrode when the contralateral isolated condyle was moved manually and with a computer-regulated mechano-stimulator. Most of TNs were located in the rostral and ventral part of the VPM. All the recorded TNs maintained to discharge during mechanical stimulation of the condyle. These neurons also responded to only mechanical stimulation of the condyle and had no discharge without any stimulation. The majority（84％）of TNs responded to the movement of the isolated condyle in the anterior direction, and 57 ％ responded in ventral direction. These results suggest that the mechanosensitive information of the temporomandibular joint is relayed to the TNs in the contralateral VPM, and continually plays a critical role in control of position and movement of the mandible.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-79 三叉神経中脳路核ニューロンにおいて観察されるh電流によるAMPA受容体電流の抑制には棘様微絨毛内の$Na^+$マイクロドメインが関与している

○齋藤　充，佐藤　元，豊田　博紀，河野　奨，尹　東旭，姜　英男
大阪大　院歯　顎治

大脳皮質錐体細胞の樹状突起棘において生じるAMPA受容体を介するEPSP（AMPAR-EPSP）は，棘内に共在している過分極活性化型環状ヌクレオチド作動性（HCN）チャネルの活性化によって抑制されることが知られている．HCNチャネル電流（$I_h$）のAMPAR-EPSPに対する抑制効果は，$I_h$による入力抵抗のシャント効果によるものと考えられてきたが，その機序は不明であった．一方，三叉神経中脳路核（MTN）一次感覚ニューロンの細胞体は無数の樹状突起棘様の微絨毛に覆われており，その微絨毛にはAMPA受容体とHCNチャネルが共在している．そこで我々は，2週齢Wistarラットの脳幹スライス標本上にあるMTNニューロンに対してホールセルパッチクランプを形成し，電位固定あるいは電流固定記録下でAMPA受容体チャネル電流（$I_{AMPA}$）が$I_h$によってどの様に修飾されるのかを検討した．膜の過分極あるいは8-Br-cAMPの灌流投与によって$I_h$を活性化すると，保持電位-70 mVにおいてAMPA溶液のパフ投与により惹起される$I_{AMPA}$は顕著に減弱したが，$I_{AMPA}$に引き続いてみられる一過性の外向き電流は増強した．このことから，何らかの外向き電流が内向きの$I_{AMPA}$を打ち消し，その電流はパフオフセット後も暫く持続することが示唆された．また，8-Br-cAMPの効果は$Cs^+$あるいはZD7288で遮断された．よって，見掛け上の外向き電流は，保持電位に依存して$I_{AMPA}$発生中に生じる定常的な内向き$I_h$の減少あるいは定常的な外向き$I_h$の増加によるものであると考えられた．以上の所見から，$I_h$による$I_{AMPA}$の抑制は，MTNニューロンの微絨毛内に形成されている$Na^+$マイクロドメイン内に共在しているAMPA受容体チャネルとHCNチャネルチャネル間の相互作用を介していること，そして，同様の機構が大脳皮質錐体細胞の樹状突起棘にも存在することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of $Na^+$-microdomain in spines in the inhibition of AMPA-receptor current by h-current in mesencephalic trigeminal neurons

○Saito M，Sato H，Toyoda H，Kawano T，Yin D，Kang Y
Dept Oral-Facial Disorders, Osaka Univ Grad Sch Dent

It is known that AMPA-receptor（AMPAR）mediated EPSPs（AMPAR-EPSPs）are depressed by activation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated（HCN）channels. The inhibitory effect of HCN-mediated current（$I_h$）on AMPAR-EPSPs was believed to be due to its shunting effect on the input resistance. However, it remains unclear how $I_h$ attenuates AMPAR-EPSPs. Somata of primary sensory neurons in the mesencephalic trigeminal nucleus（MTN）are covered by numerous spine-like microvilli, where both AMPARs and HCN channels are colocalized. We examined whether and how AMPAR-mediated current（$I_{AMPA}$）is modulated by $I_h$. An enhancement of $I_h$ by membrane hyperpolarization or 8-Br-cAMP application markedly suppressed $I_{AMPA}$ evoked at −70 mV by AMPA puff, but enhanced the transient outward current following $I_{AMPA}$. This suggests that some outward current cancelled inward $I_{AMPA}$ and lasted transiently after the puff offset. The effects of 8-Br-cAMP were antagonized by $Cs^+$ or ZD7288. The apparent outward current was mediated by either a reduction of steady inward $I_h$ or an increase in steady outward $I_h$ that occurred during $I_{AMPA}$ depending on the holding potential. It was suggested that the cancellation of $I_{AMPA}$ by $I_h$ is mediated by an interaction between AMPARs and HCN channels in $Na^+$ microdomain created in the microvilli of MTN neurons.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-80 吻側孤束核ニューロンは心血管系と呼吸系からの求心性神経入力を受ける

○石塚　健一，佐藤　義英

日歯新潟　生理

孤束核吻側部は，味覚の第一次中継核であることがよく知られている．しかしながら，吻側孤束核は中枢性入力と多種類の求心性神経入力を受けていることが知られている．そこで我々は，ウレタンクロラロース麻酔下ラットを用いて孤束核吻側部ニューロンが心血管系と呼吸系の求心性神経入力を受けているかどうか，孤束核吻側部ニューロンの心拍関連活動と気管内圧関連活動を解析することにより検索した．心拍関連活動は心電図相互相関ヒストグラムにおいて心臓係数を計算することにより，また気管内圧関連活動は気管内圧相互相関ヒストグラムにおいて気管内圧係数を計算することにより解析した．75 個の吻側孤束核ニューロンのうち，60 個（80%）が心臓係数 2.0 以上の心拍関連活動を示したが，15 個（20%）はその活動を示さなかった．心電図相互相関ヒストグラムおいて心拍関連活動を示した 60 個のニューロンのうち 33 個は収縮期の血圧上昇期に最大活動を示し，残りの 27 個は収縮期の血圧減少期と弛緩期に最大活動を示した．また，同じ 75 個の吻側孤束核ニューロンのうち 38 個（51%）が，気管内圧係数 2.0 以上の気管内圧関連活動を示したが，37 個（49%）はその活動を示さなかった．気管内圧相互相関ヒストグラムおいて気管内圧関連活動を示した 38 個のニューロンのうち 20 個は肺拡張期に最大活動を示し，残りの 18 個は肺収縮期に最大活動を示した．これらのデーターは吻側孤束核ニューロンが心血管系と呼吸系の求心性神経入力を受けていることを示唆している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Neurons in the rostral nucleus tractus solitarius receive cardiovascular and respiratory afferent inputs

○Ishizuka K，Satoh Y

Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

The rostral part of the nucleus tractus solitarius（NTS）is well known as first order gustatory relay center. However, the rostral NTS neurons also receive afferent inputs from a lot of different structures as well as CNS inputs. Thus, we investigated whether the rostral NTS neurons exhibit a pulse-related activity and/or tracheal pressure（TP）-related activity in urethane-chlorarose anesthetized rat. Out of 75 rostral NTS neurons, 60 neurons（80%）exhibited a pulse-related activity with cardiac coefficient exceeding 2.0, whereas 15 neurons（20%）did not. In the ECG-triggered correlation histogram, out of 60 rostral NTS neurons with a pulse-relative activity, 33 had maximum peak counts during systolic pressure increasing period, while the other 27 neurons had maximum peak counts during systolic pressure decreasing and diastole periods. Out of 75 rostral NTS neurons 38 neurons（51%）exhibited a TP-related activity with TP coefficients exceeding 2.0, whereas 37 neurons（49%）did not. In the TP-triggered correlation histogram, out of 38 neurons with a TP-relative activity, 20 had maximum peak count during lung inflation periods, whereas 18 had maximum peak count during lung deflation periods. These data suggest that a majority of rostral NTS neurons receive cardiovascular and respiratory afferent inputs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-81　シスプラチン投与による遅延性悪心誘発に対する脳幹部ドーパミン作動性ニューロンの関与

○平井　喜幸，久留　和成，前澤　仁志，舩橋　　誠

北大　院歯　口腔生理

【目的】抗がん剤であるシスプラチンには強い催吐作用があり，シスプラチン投与による悪心・嘔吐には投与 1 ～ 3 時間後から発現し始める急性悪心・嘔吐と投与 24 時間後から発現する遅延性悪心・嘔吐の二相性があることが知られている．本研究では，シスプラチンをラット腹腔内に投与し，急性悪心と遅延性悪心の誘発に関与する最後野および孤束核ニューロンのシグナル伝達の特性を明らかにすることを目的とした．【方法】SD 系雄性成体ラット（200 ～ 250 g）の腹腔内にシスプラチン（6 mg/kg 体重）を投与した．コントロール群には生理食塩水（以下，生食，5 ml/kg 体重）を腹腔内投与した．シスプラチン，または生食投与 2，6，12，24，48 時間後に 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行った後，脳幹部の凍結切片（厚さ 25 μm）を作製し，ニューロン活動のマーカーとして c-Fos タンパク質，ノルアドレナリン作動性ニューロンのマーカー（ドーパミン β 水酸化酵素，DBH），ドーパミン作動性ニューロンのマーカー（チロシン水酸化酵素，TH）に対する抗体および蛍光標識 2 次抗体による二重免疫染色を行い，蛍光顕微鏡にて最後野および孤束核を観察し，陽性細胞数を計数した．【結果と考察】最後野および孤束核においてシスプラチン投与 6，12，24，48 時間後の c-Fos 陽性反応を示す細胞数は，生食投与群の同じ時間条件に比べ有意に増加した．DBH および TH 陽性ニューロンが多数検出され，c-Fos タンパク質との共発現を認めるニューロンも検出された．c-Fos 陽性反応と TH 陽性反応を共に示すニューロン数は 12，24，48 時間後に有意に増加したが，c-Fos 陽性反応と DBH 陽性反応を共に示す細胞数はどの時間条件においても有意な変化は認められなかった．以上から，シスプラチンによる遅延性悪心誘発には最後野および孤束核のドーパミン作動性ニューロンが関わっていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Possible involvement of dopaminergic brainstem neurons in cisplatin-induced delayed nausea and/or emesis

○Hirai Y，Hisadome K，Maezawa H，Funahashi M

Dept Oral Physiol, Grad Sch Dent Med, Hokkaido Univ

To characterize neuronal transmitter properties of the area postrema（AP）and the nucleus tractus solitarius（NTS）neurons that should contribute to the induction of cisplatin-induced acute and delayed nausea and/or emesis, we performed immunohistochemical analysis of c-Fos expression and catecholamine synthesis. Male Sprague-Dawley rats（200-250 g）were injected with cisplatin（6.0 mg/kg b.w., i.p.）or saline（5.0 ml/kg b.w., i.p.）. Animals were transcardially perfused with fixatives at 2, 6, 12, 24, 48 hour after injection of cisplatin or saline. Coronal sections（25 μm thick）of the brainstem were made with a freezing microtome. Each section was treated with a c-Fos antibody and DBH（dopamine β-hydroxylase）or c-Fos antibody and TH（tyrosine hydroxylase）, and the number of immunoreactive neurons in the brainstem were measured under a fluorescence microscope. In the AP and the NTS, cisplatin-induced c-Fos expression was observed 6, 12, 24, 48 hour after cisplatin injection. Immunoreactivities for DBH and TH were found in a certain number of c-Fos immunoreactive cells. The number of double-labeled neurons with c-Fos and TH antibody significantly increased at 12, 24 and 48 hour after cisplatin injection. These results suggest that dopaminergic neurons in the AP and the NTS were involved in cisplatin-induced delayed nausea.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-82 マウスを用いた食品由来揮発性成分の Dimethyl sulphide の臭いに対するマスキング作用の評価

○長田　和実

北医療大　歯　生理

【目的】本研究はY字型迷路（Y-maze）を用いたマウスの嗅覚訓練パラダイムを用い，口臭成分の1つであるdimethyl sulfide（DS）に対する各種食品関連の芳香物質の嗅覚マスキング作用の評価を試みたものである．【方法】実験動物はにおいセンサーマウス（♀:n＝6）としてC57BL/6jを用いた．DSマスキング成分（masker）としてシトロネラル（CN），などの3,7-dimethylterpene類に加え，丁子（Eugenol），アニス（Anethole），ワサビ（Allyl isothiocyanate），ユーカリ（Cineole）などについて嗅覚マスキング作用を検討した．23時間絶水したマウスをY字型迷路の長腕部末端に置き，10 ppm DS溶液およびその溶媒のみのにおいをY-mazeの左右両側腕より同時に提示し，正しいにおいを選択した場合，報酬として一滴の水を与える．左右両側腕のにおいを何回も入れ替え，繰り返し実験し，マウスはDSの匂いを識別していることを確かめる．次に1．DS＋masker vs. 溶媒+maskerを提示し，マウスがDSを識別不能となるmaskerの最低濃度を確かめる，あるいは，2．DS+水 vs. DS+maskerを提示し，maskerがDS臭を抑制する最低濃度を確かめる，ことにより各maskerの嗅覚マスキング強度を測定した．【結果と考察】1．の測定結果ではcitronellalが今回測定した芳香成分の中では最も強力なDSマスキング物質であり，次にCineoleが比較的マスキング強度が高かった．Allyl isothiocyanateは強烈な三叉神経刺激作用を持つがDSに対するマスキング作用は限定的であった．2．の測定結果についても興味深い結果が得られつつあり，それらの実験結果も併せて発表する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evaluation of dimethyl sulfide odor masking by food derived volatiles to the biosensor mice

○Osada K

Div Physiol Dept Oral Biol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

It is postulated that the mechanism of odor masking is multifaceted and complex. Hence simple and comprehensive methods to evaluate odor masking is needed in an experimental setting. It is empirically postulated that the scent of condiments contain volatiles which can mitigate the malodor emitted from raw meat and fish. For example, citronellal, which is present in Japanese pepper, is the strong odor masker to male mice odor（Osada K et al. 2011 Chem Senses 36, 137-47）. Using a standard odor training paradigm of mice we developed an unique evaluation system about the quantitative 'odor masking' of balmy scents of volatiles to the smell of dimethyl sulfide（DS）, an oral malodorous chemical（Osada K et al. 2013 Chem Senses 38, 57-65）. In this study, we likewise evaluated the odor masking of several typical odorants from foods to the odor of DS. One of the prominent DS odor masker was citronellal, the odor component of Japanese peppar. Next, cineole, which is known as TRPM8 agonist, was a stronger masker than others. On the other hand, Allyl isothiocyanate did not affect robustly to sniffer mice behavior. However, when the pattern of generalization changed, I can observed an unique effect of an odorant.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-83 連続する舌運動の巧緻的制御時における大脳体性感覚ニューロンの発火パターンの多様性

○戸田　孝史，工藤　忠明

東北大　院歯　口腔生理

【目的】ヒトの器用な舌運動制御の背景にある神経機構を明らかにするため，*Macaca fuscata* の一次体性感覚野の口腔再現領域後方から単一ニューロン活動を記録し，課題遂行中の反応様式やスパイク列の時間構造の解析を行った．【方法】雌 1 頭を用いた．2 枚の小窓を舌尖で連続的に開放し，その前方にある報酬を獲得する課題に習熟させたのち，課題遂行時の単一神経活動を記録した．データ収集には Spike 2（CED, UK）を用い off-line でスパイク弁別を行った．その上で，数値計算ソフト（Scilab, Scilab Consortium / Digiteo）に移し，発火パターン（regular, random, bursty）を解析した．隣接するスパイク間隔同士の相関は，Shinomoto ら（2009）により考案された局所変動係数の改良型（LvR）で評価し，ブートストラップ標本（試行：1000 回）から平均と信頼区間を求めた．【結果と考察】課題遂行中に発火頻度が有意に増加するニューロンが 61 個得られた．これらのうち約半数（n = 30）は受動的な触圧刺激に対する受容野が不明であった．課題中の特定の運動相で発火頻度を増すものが多かったが，発火ピークの前後で抑制がかかるものもみとめられた（n = 4）．後者のニューロンは特定の運動相から次の運動相への移行をモニターする機能があると考えられた．一方，各ニューロンの LvR と反応ピーク時の平均発火頻度（MFR）との関係を検討した結果，複数のクラスターがみとめられた（LvR:0.5，MFR:50 Hz の周辺，LvR:0.75，MFR:25 Hz の周辺，LvR:1.5，MFR:30 Hz の周辺）．一次体性感覚野後方領域のニューロン活動は，その時間構造と活動量でみた場合多様であり，この領域の情報処理機構を理解するための基礎データとして重要であると考えられた．【謝辞】実験動物はナショナルバイオリソースプロジェクトから提供を受けた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Variability of temporal signaling patterns of cortical somatosensory neurons during sequential tongue movements

○Toda T，Kudo T

Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

The postcentral somatosensory cortex and its neighboring association cortex are important brain regions for dexterous motor control of the tongue and lips. We examined the variability of temporal signaling patterns of neurons there. One female macaque monkey（*Macaca fuscata*）was trained to open two small sliding windows successively and get rewards through the windows by the tongue. Neuronal activities were recorded extracellularly and single units were identified off-line using a template matching algorithm and were then subjected to principal component analyses（CED, Cambridge, UK）. For further numerical analyses, the data were exported to Scilab（Scilab Consortium / Digiteo）. To quantify the temporal structure（regular, random, bursty）, we used a metric of local variation（LvR）that evaluates the cross-correlation between consecutive interspike intervals（Shinomoto et al., 2009）. The confidence intervals of the metric were constructed with 1000 bootstrap samples. Among neurons which were activated during the task（n = 61）, LvR and mean firing rate（MFR）were ranged widely, and several clusters were observed（(LvR: 0.5, MFR: 50 Hz; LvR: 0.75, MFR: 25 Hz; LvR: 1.5, MFR: 30 Hz）. The animal used in this research was provided by NBRP, the National BioResource Project of the MEXT Japan.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-84 嗅覚認識に関与する脳部位の結合解析による探索：7 テスラ MRI による fMRI 研究

○深見　秀之，佐原　資謹

岩医大　歯　生理

functional MRI（fMRI）を用いた嗅覚研究で 1）刺激による信号変化が小さい事 2）嗅覚情報伝導路が脳底に位置することにより磁化率アーチファクトの影響を受け易いことが大きな障害になっていた．静磁場強度を上げることで S/N 比の改善と高解像度で撮像が出来ることから，超高磁場である 7 テスラ MRI を使用し，嗅覚認識機構について全脳の脳機能イメージングを試みた．実験は 19 人の被験者で行った．異なる 3 種の匂い（イソ吉草酸：汗の匂い，ペパーミント，コーヒー）および無臭の空気を嗅ぐ際に（sniffing）賦活する脳部位の探索を行った．匂い物質の sniffing により一次嗅覚皮質である梨状皮質ではその前方部および後方部に賦活が見られた．一方，無臭の空気の sniffing では梨状皮質後方部にのみ賦活が見られた．次に，梨状皮質前方部および後方部と結合する脳部位を機能的結合解析である psychophysiological interaction（PPI）を行うことで探索した．その結果，梨状皮質前方部は扁桃体，眼窩前頭皮質内側部，側坐核および島皮質後方部と結合が見られた．一方，梨状皮質後方部は扁桃体，眼窩前頭皮質内側部および外側部，視床および島皮質前方部と結合が見られた．解剖学的な結合を考え合わせると，1）匂い物質の情報は嗅球から梨状皮質前方部に，sniffing による空気の動きの情報は視床を介し梨状皮質後方部に入る．2）梨状皮質前方部と後方部はそれぞれ異なった領域に出することで，異なった役割を果たしていることが示唆される．会員外共同研究者：樋口さとみ，佐々木真理（岩手医科大学超高磁場 MRI 診断・病態研究部門）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Functional connectivity of human primary olfactory cortex: 7 tesla fMRI study

○Fukami H，Sahara Y

Dept Physiol, Iwate Med Univ Sch Dent

Functional magnetic resonance imaging（fMRI）has been used to investigate the olfactory system in human. However, recognition mechanisms of smell remain unclear. Several factors attributed to this are: 1）BOLD-signal changes evoked by olfactory stimuli are small, 2）brain regions involved in olfaction tend to be susceptible to spatial distortion and image loss. In order to investigate odorant induced brain activation, we utilized ultra high field MRI expecting for increasing BOLD-signal strength. Nineteen healthy participants were scanned with 7 Tesla MRI. Participants sniffed three odorants（isovaleric acid, peppermint and coffee）and odorless air. Sniffing odorants induced activation in anterior and posterior region of piriform cortex. Sniffing air induced activation in posterior region of piriform cortex. Functional connectivities of anterior and posterior piriform cortex to other brain area were examined by psychophysiological interaction analysis. Anterior piriform cortex connected with amygdala, medial orbitofrontal cortex, nucleus accumbens and posterior insula. On the other hands, posterior piriform cortex connected with the lateral and medial orbitofrontal cortex, amygdala, thalamus and anterior insula. These results suggest that 1）odor and mechanical sensory information induced by sniffing are processed different neural circuits, and 2）anterior and posterior piriform cortex could make different roles in olfaction.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-85　2 光子励起顕微鏡を用いた歯髄刺激に応答する神経細胞の特定

○藤田　智史，越川　憲明，小林　真之

日本大　歯　薬理

【目的】歯の痛みは耐え難い苦痛を代表するもののひとつである．一方で歯の痛みの処理機構に関しては不明な点が多い．近年我々の研究室は，膜電位感受性色素を用いた光学計測法を用いて，歯髄を刺激した時には島皮質の背側部から応答が始まり周囲に広がることを明らかにした（Nakamura et al., 2014 in Journal of comparative neurology）．しかしながら，この神経活動の拡がりに対して 2/3 層のニューロンの活動性がどのように関わっているのかはわかっていない．そこで，2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージングをニューロン単位で行い，島皮質背側部の 2/3 層のニューロンが歯髄刺激をした時にどのように応答するのかを検討した．【方法】ウレタン麻酔下で，6 週齢のラットの左側上顎歯髄に電極を刺入し固定した．ラットを脳定位固定装置に固定し，直径約 1 mm の大きさの骨窓を島皮質背側部の中大脳動脈から尾側に形成し，カルシウム指示薬である Oregon Green 488 BAPTA-1 を負荷した．オリンパス社製の 2 光子励起顕微鏡を用いて，左側上顎歯髄に電気刺激を行った時の反応性を記録した．記録は 20 回行いその結果を平均加算し反応するニューロンの同定を行った．【結果・考察】島皮質背側部から 64 個のニューロンの応答性を記録した．応答が認められたニューロンはそのうち 27 個（42.2%）であった．20 回行った刺激に対するニューロンの応答を，1 回ずつ観察すると，蛍光強度の変化が認められる頻度は 20 回の刺激に対して 4.8±0.5 回（1-10 回）であった．これらのことから中大脳動脈の尾側に位置する島皮質背側部の 2/3 層に存在するニューロンは歯の痛みの情報処理に関わることが示唆された．【共同研究者】加藤　梨紗子（日本大学歯学部薬理学講座）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Identification of neurons responding to dental pulp stimulation by use of a two-photon microscopy

○Fujita S，Koshikawa N，Kobayashi M

Dept Pharm, Nihon Univ Sch Dent

［Purpose］It is unknown that how nociceptive information of dental pulp is processed in the cerebral cortex. Recently, we reported that electrical stimulation of the maxillary molar pulp of rats evoked neural excitation in the dorsal part of insular cortex by use of in vivo optical imaging technique with a voltage-sensitive dye. However, the contribution of neurons in the layer 2/3 remains unclear. In the present study, we performed in vivo calcium imaging and observed the neural activity by individual neurons on electrical stimulation of the dental pulp.［Materials & Methods］Six-week old male rats received a small craniotomy（diameter = approximately 1 mm）on the dorsal part of insular cortex under urethane anesthesia. After injections of a calcium indicator, Oregon Green 488 BAPTA-1, the responses to electrical stimulation of the maxillary molar pulp were recorded. We performed 20 sessions and assessed.［Results & Conclusion］In the dorsal part of insular cortex, 42.2%（27 of 64）of neurons increased calcium concentration. In these 27 neurons, 24% of recorded 20 sessions responded（4.8, range 1-10）. These results suggest that neurons in layer 2/3 of dorsal part of insular cortex play a role in processing nociceptive information of dental pulp.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-86 カプサイシンの辛味認知とそれに伴う自律神経反応を担う脳機構

○佐藤　元[1]，川上　晋平[2]，豊田　博紀[1]，齊藤　充[1]，河野　奨[1]，尹　東旭[1]，姜　英男[1]

[1]大阪大　院歯　顎治
[2]森永製菓株式会社

カプサイシン（CAP）を含む食物を摂取すると，顔面からの発汗，唾液分泌，呼吸数・心拍数上昇等の様々な生体反応が生じる．これらの現象は，消化器粘膜内の痛覚線維がCAP刺激により活性化され，その結果，交感神経系が活性化される自律神経反射であると考えられている．一方，舌味蕾細胞や口腔内粘膜にも，TRPV1受容体を発現するCAP感受性求心性神経終末が高密度に存在する．CAP含有食物の摂取が，こうした求心性神経を活性化し，「味覚」情報として島皮質味覚野に到達すると，近接する自律機能関連領野が活性化され，同様な自律神経反応が引き起こされる可能性もある．実際，CAP摂取により，島皮質味覚野に相当する腹側前部島皮質（中部島短回）の賦活が，conjunction analysisを用いたヒトfMRI研究で報告されている．このことから，中部島短回は辛味情報を受容している可能性が示唆される．そこで，本研究では，fMRIを用いて，ヒト被験者の舌背にトウガラシエキス（香辛料抽出物 65 μM），食塩水（0.75 M）および人工唾液を滴下し，トウガラシエキスによって引き起こされた島皮質味覚野の活動と自律機能関連領野の活動との間に機能連関が存在するかどうか検討した．ROI analysisを行った結果，トウガラシエキス投与は他の溶液投与に比べて有意に強い賦活を両側前部および中部島短回で引き起こした．さらに，前部島短回の活動は中部島短回の活動に比べて左右側ともに有意に強かった．トウガラシエキス投与後の指尖皮膚体温は投与前に比べ有意に上昇し，右側前部島短回でのみ，トウガラシエキス投与前後での指尖皮膚体温変化量と脳血流変化量との間に有意な正の相関が認められた．こうした所見は，トウガラシエキスの味覚受容により，島皮質味覚野および島皮質自律機能関連領野間で同期化した脳活動が引き起こされ，その結果，自律神経反応が生じた可能性を示唆する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The brain mechanisms underlying the perception of pungent taste of capsaicin and subsequent autonomic responses

○Sato H[1]，Kawakami S[2]，Toyoda H[1]，Saito M[1]，Kawano T[1]，Yin D[1]，Kang Y[1]

[1]Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Morinaga & Co, Ltd

In response to tasting and digesting spicy foods containing capsaicin, various physiological responses such as perspiration from face, salivation and facilitation of cardiovascular activity are induced. Such autonomic responses may be caused through vicero-visceral autonomic reflexes. However, this does not necessarily exclude the possibility of the involvement of higher-order sensory-motor integration between the gustatory insular（Gu-I）and autonomic insular（Au-I）cortices. A human fMRI study using conjunction analysis demonstrated that tasting and swallowing of capsaicin cause excitation in the anterior ventral insular probably corresponding to the middle short gyrus（MSG）, suggesting that MSG perceives the pungent taste of capsaicin. Using fMRI, we here addressed whether brain activity in the Gu-I caused by capsaicin is coordinated with that in the Au-I. ROI analysis performed with the bilateral insula mask revealed that the BOLD signals significantly increased in the bilateral anterior short gyrus（ASG）and MSG following capsaicin application to the subject's tongue. The BOLD signals were significantly higher in ASG than in MSG regardless of their sides. Only the right ASG showed a significant positive correlation between fingertip temperatures and BOLD signals. These results suggest that the neural coordination between Gu-I and Au-I is responsible for autonomic responses.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-87　咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス伝達の生後発達

○中村　史朗[1]，梶原　里紗[2]，望月　文子[1]，中山希世美[1]，清本　聖文[1]，井上　富雄[1]

[1]昭和大　歯　口腔生理
[2]昭和大　歯

【目的】摂食行動は，発育に伴い吸啜運動から咀嚼運動へと大きく転換する．この転換期には，末梢の感覚受容器，咀嚼筋，骨格等の口腔諸器官の発達とともに，顎運動を制御する中枢神経機構も大きく変化すると考えられるがその詳細は明らかではない．そこで本研究では，幼若期ラット咬筋運動ニューロン（MMN）からホールセルパッチクランプ記録を行い，MMN に誘発される興奮性微小シナプス後電流（mEPSC）の生後発育変化を解析した．【方法】実験には生後 2〜5，9〜12，14〜16 日齢の Wistar 系ラットを用いた．麻酔下にて脳幹スライス標本を作成後，逆行性蛍光トレーサーで標識された MMN からホールセルパッチクランプ記録を行った．【結果】生後 2〜5（$n=9$），9〜12（$n=8$），14〜16 日齢（$n=5$）の全ての MMN において，tetrodotoxin（1 $\mu$M），SR95531（10 $\mu$M）および strychnine（10 $\mu$M）存在下で mEPSC が観察された．mEPSC は CNQX を投与するとほぼ完全に抑制された．mEPSC の振幅と発生頻度は，生後発育に伴い増加する傾向にあったが有意差はみられなかった．一方，mEPSC の立ち上がり時間は，生後 14〜16 日齢のほうが生後 2〜5 日齢より有意に低い値を示した（$P < 0.05$）．また，mEPSC の減衰時間は，生後 9〜12 日齢および 14〜16 日齢のほうが 2〜5 日齢よりも有意に低い値を示した（$P < 0.01$）．【考察】生後発育に伴い MMN に誘発される mEPSC の振幅と発生頻度が増加傾向を示し，立ち上がり時間および減衰時間が有意に短縮したことから，ラット咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス入力の性質が生後発育とともに変化することが示された．このような咬筋運動ニューロンへのシナプス入力の発育変化は吸綴から咀嚼の転換に関与する可能性が考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Postnatal changes of excitatory synaptic inputs in the rat masseter motoneurons

○Nakamura S[1]，Kajiwara R[2]，Mochizuki A[1]，Nakayama K[1]，Kiyomoto M[1]，Inoue T[1]

[1]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent
[2]Showa Univ Sch Dent

Feeding behavior of mammals drastically changes from suckling to chewing during early postnatal period. The development of oro-facial structures during this period is assumed to be accompanied by changes of central neural circuits responsible for jaw movement regulation. However, the details of these changes are still unclear. In this study, we examined the developmental changes of miniature excitatory postsynaptic currents（mEPSC）in the rat masseter motoneurons（MMNs）during early postnatal period. The experiments were performed with brainstem slices from P2-5, 9-12 and 14-16 Wistar rats. Whole-cell recordings were made from retrogradely-labeled MMNs. After bath applications of strychnine, SR95531 and tetrodotoxin, mEPSCs were observed in P2-5（$n=9$）, 9-12（$n=8$）and 14-16（$n=5$）MMNs. Subsequent addition of CNQX almost completely abolished the mEPSCs. The amplitude and frequency of the mEPSCs tended to increase during postnatal periods tested. Furthermore, the rise time and decay time of the mEPSCs was significantly reduced during postnatal periods tested（$P < 0.01, 0.05$）. These results demonstrate the characteristics of mEPSCs in MMNs changes during early postnatal periods. It is possible that such postnatal development of the synaptic inputs to the MMNs contributes to the transition from suckling to mastication.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-88 ラット赤核刺激による開口反射の促通における前庭神経核の役割

○佐藤　義英[1]，石塚　健一[1]，高橋　　睦[1,2]，岩崎　信一[1]

[1]日歯新潟　生理
[2]日歯新潟　補綴 1

我々は以前の研究で，赤核，前庭神経外側核，前庭神経上核の刺激が低閾値求心性線維誘発性開口反射を促通し，前庭神経下核の刺激が低閾値求心性線維誘発性開口反射を減弱することを報告した．赤核は，前庭神経外側核，前庭神経上核や前庭神経下核に投射することが形態学的研究から報告されている．これらのことから，赤核刺激による開口反射の促通は，前庭神経外側核，前庭神経上核，前庭神経下核を介して伝達されていることが考えられる．そこで我々は，前庭神経外側核，前庭神経上核，前庭神経下核の破壊が，赤核刺激による開口反射の促通に影響を与えるか検索した．実験はウレタン・クロラロース麻酔下ラットにおいて行われた．開口反射は下歯槽神経電気刺激（試験刺激）により誘発し，顎二腹筋前腹の筋電図応答として記録した．下歯槽神経の刺激強度は閾値の 1.2 倍とした．次に，赤核刺激（条件刺激）を行い開口反射の促通を記録した．そして，前庭神経外側核，前庭神経上核，前庭神経下核の両側電気的破壊を行い，開口反射における赤核刺激の効果を試した．前庭神経外側核または前庭神経上核の両側電気的破壊は，赤核刺激誘発性開口反射の促通を減少させた．これに反して，前庭神経下核の両側電気的破壊は，赤核刺激誘発性開口反射の促通を増加させた．これらの結果から，赤核刺激誘発性開口反射の促通は，前庭神経外側核，前庭神経上核，前庭神経下核を介して伝達されていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of the vestibular nuclear complex in facilitating the jaw-opening reflex following stimulation of the red nucleus in rats

○Satoh Y[1]，Ishizuka K[1]，Takahashi M[1,2]，Iwasaki S[1]

[1]Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata
[2]Dept Removal Prosthodont, Nippon Dent Univ Life Sci at Niigata

Our previous studies reported that stimulation of the red nucleus（RN）facilitated the low-threshold afferent-evoked jaw-opening reflex（JOR）, and stimulation of the lateral（LVN）, superior（SVN）and inferior（IVN）vestibular nuclei modulates the JOR. It has been reported that the RN projects to these vestibular nuclei. These facts suggest that RN-induced facilitation of the JOR is mediated via the LVN, the SVN and the IVN. We investigated whether electrically induced lesions of these vestibular nuclei affect RN-induced facilitation of the JOR. The experiments were performed on anesthetized rats. The JOR was evoked by electrical stimulation of the inferior alveolar nerve, and was recorded as the electromyographic response of the anterior belly of the digastric muscle. The stimulus intensity was 1.2 times the threshold. Electrically induced bilateral lesions of the LVN or the SVN reduced the RN-induced facilitation of the JOR. On the other hand, electrically induced bilateral lesions of the IVN increased the RN-induced facilitation of the JOR. These results suggest that the RN-induced facilitation of the JOR is mediated by a relay in the LVN, the SVN and the IVN.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-89 実験動物における睡眠時反復性咬筋活動の生理学的特性

○加藤　隆史[1]，佐藤　文彦[1]，吉田　　篤[1]，東山　　亮[2]

[1]大阪大　院歯　口腔解剖 2
[2]大阪大　院歯　クラウンブリッジ

睡眠時ブラキシズムの患者では，ノンレム睡眠にリズム性を有し歯ぎしりを伴う反復性の咀嚼筋活動が多発する．一方，反復性咀嚼筋活動は，約 60%の健康成人においても散見される．これまでに，実験動物でもノンレム睡眠で反復性咀嚼筋活動が発生する可能性を示唆するデータを得たため，本研究では，モルモットのノンレム睡眠で発生する反復性咬筋活動の生理学的特性を調べた．全身麻酔下の雄性モルモットに，脳波・眼電図・筋電図（片側咬筋・頚筋）・心電図の電極を装着した．回復後，明期の 3 時間にわたって自由行動下で睡眠覚醒中の咀嚼筋活動を記録した．睡眠覚醒状態を通法に従って判定した後，ノンレム睡眠で発生する反復性咬筋活動を有するエピソード（RMA）を視覚的に同定した．同定した RMA について，咬筋バースト持続時間，バースト発生間隔を求めた．また，RMA のバースト活動量を，咀嚼時のバースト活動量で標準化した．さらに，RMA 発現前後の脳波や心拍数の経時的な変化を解析した．RMA の発生数には個体差があったが，その咬筋バーストの持続時間，活動量，発生間隔は，咀嚼中の咬筋バーストのものと異なっていた．また，RMA の発現に伴って一過性の脳波活動と心拍数の変化が生じていた．以上の結果から，モルモットの RMA は咀嚼運動と同一ではない神経機構により生成され，ノンレム睡眠での発生には一過性の覚醒が関与することが示唆された．実験動物の RMA は，ノンレム睡眠で生じる歯ぎしりやミオクローヌスなどの病態生理や神経機構を調べる上で有用な生理学的指標となる可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Physiological properties of repetitive masseter activity during NREM sleep in guinea pigs

○Kato T[1]，Sato F[1]，Yoshida A[1]，Higashiyama M[2]

[1]Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Prosthodont 1, Osaka Univ Grad Sch Dent

Rhythmic activies of the masticatory muscles during NREM sleep were often observed in patients with sleep related movement disorders. This study was aimed to characterize the electromyographic（EMG）features of repetitive/rhythmic masseter activities（RMAs）during NREM sleep in guinea pigs in association with cortical and cardiac activities. Polygraphic recordings simultaneously with EMG activity from masseter muscle were made for three hours during a light-period in the freely-moving guinea pigs. The RMA episodes were visually scored. The EMG variables were analyzed and compared with those during chewing. Cortical and cardiac activities were quantified before and after the onset of RMAs. RMAs occurred during NREM sleep with a large inter-individual variability in the frequency. The EMG characteristics of the RMAs differed from those of chewing. The occurrence of RMAs was associated with a transient decrease in delta EEG power and RR-intervals. The results suggest that the RMAs during NREM sleep can be generated by the distinct combinations of neural modules in comparison to chewing. The occurrence of RMA episodes was associated with physiological signs of transient arousals. Therefore, RMAs can be a physiological marker in experimental animals for investigating the pathophysiology of rhythmic activations of the masticatory muscles during NREM sleep.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-90　胎児期ビスフェノールA曝露ラットにおける離乳前行動の解析

○藤本　哲也，西川　泰央

大阪歯大　生理

【目的】環境ホルモンの1つであるビスフェノールA(BPA)は歯科材料にも用いられる．我々は以前BPAの胎児期曝露実験において仔ラットの成長後に行動試験を行い，性差の消失，うつ情動の増強，捕食者のニオイに対する回避行動を見出した．今回はあまり明らかになっていない離乳前の仔ラットに焦点をあて行動様式を調べた．【方法】BPA(1.5 mg/kg/day)を母ラットに経口曝露し，8日齢，20日齢の仔ラットについて自発行動ならびにニオイ存在下での行動を8日齢で2分間，20日齢で3分間記録し解析した．【結果】8日齢の対照群，曝露群の雌において，ニオイの存在により頭部運動回数が減少し，不動時間が延長した．匍匐を示した個体数は曝露群においてニオイ依存性に減少した．20日齢の自発行動において，対照群の活動性に性差が認められ，曝露群では消失した．ニオイ存在下において探索行動，活動性の低下，不動時間の延長が両群の雌に見られた．毛繕い行動は性別，BPA曝露による差は無く，ニオイにも影響されなかった．血中コルチコステロンレベルは両群ともニオイ曝露により上昇した．【考察】8日齢，20日齢ラットともに，捕食者のニオイに対する感受性と深く関わる行動変化をおこした．その傾向は雌ラット，BPA曝露ラットにおいて顕著であり，背景としてストレス感受性との関わりが示唆された．また，対照群の活動性の性差がBPA曝露により消失するというのは，成長後のラットで確認されていた知見だが，今回，離乳前においても認められた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis of pre-weaning behaviors in prenatal bisphenol A treated rats

○Fujimoto T，Nishikawa Y

Dept Physiol, Osaka Dent Univ

Bisphenol A（BPA）is known as an environmental endocrine disrupter. Past studies showed that prenatal administration of BPA impaired the gender differences and enhanced the response to predator odor after maturity. In this study, we focused on the behaviors in the pre-weaning period. We administered BPA（1.5 mg/kg/day）to prenatal rats, and offspring were examined under the presence or absence of predator fox odor. At 8 days of age, by the odor, decreases in head movement and increases in immobility were seen in females. The number of animals that displayed the crawling response was decreased by the odor in the BPA rats. At 20 days of age, gender differences were observed in locomotor activity of the controls but not in the BPA rats. Under the odor, the rearing and the locomotor activity were decreased, while immobility was increased in females. Corticosterone levels were higher in the odor-exposure group than in the non-exposure group. Behavioral changes in the susceptibility to predator odor were observed in the pre-weaning age. We found that the BPA rats and female rats were more susceptible to odor. As in the previous study, we found that the gender difference in locomotor activity was impaired by BPA.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-91　ミクログリア BK チャネルを介したモルヒネ痛覚過敏メカニズムの解明

○林　　良憲，中西　　博

九大　院歯　口腔機能分子

【目的】BK チャネルは細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度あるいは膜電位によって駆動される $K^{+}$ チャネルである．神経系に広く分布し，細胞の興奮性や伝達物質分泌に関わる．これらはガン細胞や免疫細胞等の非興奮性細胞にも発現しているが，その役割は不明である．最近，私たちはミクログリアの BK チャネル活性化が神経障害性疼痛の発症に関与することを明らかにした（Hayashi et al., J Neurosci 2011）．オピオイド誘発性疼痛過敏においてもミクログリアの関与が示唆されている事から，本研究では疼痛過敏におけるミクログリア BK チャネル関与の可能性について検討した．【方法・結果】モルヒネの 5 日間の連続投与によりミクログリアで BK チャネル活性化が認められ，BK チャネル阻害剤の髄腔内投与により痛覚過敏を有意に抑制した．モルヒネで刺激したミクログリアを髄腔内投与したところ痛覚過敏の形成が有意に促進された．一方，薬理学的及び遺伝的に BK チャネルの機能を欠損させたミクログリアはモルヒネ刺激後でさえ痛覚過敏の形成促進を惹起しなかった．これらの現象は $\mu$ 受容体を介して産生されるアラキドン酸及びその代謝産物がチャネル活性化に関与していた．BK チャネルの機能解析により P2X4 受容体の細胞膜表面への輸送制御に関与し，ストア作動性カルシウム流入を直接制御していた．このような経路を介して産生される BDNF が一次求心性神経から脊髄後角第 1 層ニューロンへの興奮伝達を亢進させている事が明らかとなった．【結論】以上の結果より，ミクログリア BK チャネルが痛覚過敏の形成に重要な役割を担う事が明らかとなり，オピオイドの長期使用時における副作用軽減の効果的なターゲットとなる事が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Microglial BK channels gate the pathogenesis of morphine hyperalgesia

○Hayashi Y，Nakanishi H

Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

[Purpose] BK channels are the intracellular $Ca^{2+}$ and voltage gated potassium channel. They are widely distributed throughout the nervous system to control neuronal excitability and neurotransmitter release. They are also expressed in electrically non-excitable cells such as cancer cells and immune cells, whereas little is known about their functions. Recently, we have found that large outward currents mediated by BK channels in the spinal microglia contribute to the initiation of neuropathic pain. In the present study, we have examined a possible involvement of microglial BK channels in opioid-induced hyperalgesia. [Results] Repeated morphine administration gradually enhanced pain sensitivity. At the same time, repeated morphine administration activated BK channels in microglia, but not in neuron, by generation of arachidonic acid and its metabolites through mu receptors. Morphine-induced hyperalgesia was significantly suppressed by BK channel inhibitors. The development of hyperalgesia was accelerated by intrathecal administration of morphine-primed wild-type, but not BK channel-deficient, microglia. Furthermore, the activation of BK channels promoted P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. [Conclusion] These results indicate that BK channels in the spinal microglia also play an important role in the development of opioid-induced hyperalgesia. Therefore, the BK channel is a potential molecular target for the treatment of opioid-induced hyperalgesia.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-92　三叉神経刺激で生じる顎・顔面領域の血流動態における副交感神経性血管拡張反応と血圧変動との相互作用

○石井　久淑，佐藤　寿哉

北医療大　歯　生理

【目的】三叉神経入力は顎・顔面・口腔領域の副交感神経性血管拡張反応と体幹血圧の変動を誘発することから，これらの相互作用は同領域の血流動態を左右する因子として重要であると考えられる．副交感神経性血管拡張反応にはコリン及び非コリン作動性の血管拡張線維が重要であるが，これらの血管拡張線維の応答特性と体幹血圧との関係については十分に明らかにされていない．本研究はこれら循環反応の相互作用を明らかにするために，三叉神経の求心性刺激で生じる咀嚼筋（コリン作動性）と下唇（非コリン作動性）の血流変化と体幹血圧との関係を比較・検討した．【方法】麻酔したラットの咬筋及び下唇血流はレーザードップラー血流計を用いて測定した．三叉神経（舌神経）の求心性の電気刺激は，両側の迷走神経及び交感神経を頸部で切断した状態で行った．【結果と考察】舌神経刺激は咬筋及び下唇に有意な血流増加と血圧上昇を誘発した．この血圧上昇は咬筋の血流増加に先立って生じ，咬筋の血管コンダクタンスを減少させたが，これらの反応は下唇では認められなかった．グアネチジン（血圧降下剤）で前処理したラットではこのコンダクタンスの減少は消失したが，舌神経刺激で生じる血流増加には影響を与えなかった．したがって，コリン作動性副交感神経性血管拡張反応には血圧変動が密接に関連しており，この相互作用には局所性調節が重要な役割を果たしていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Interactions between parasympathetic vasodilation and systemic arterial blood pressure in the hemodynamics in the orofacial area

○Ishii H，Sato T

Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Trigeminal afferent inputs induce parasympathetic vasodilation in the orofacial area accompanied by a significant increase in the systemic arterial blood pressure（SABP）. Therefore, the interaction between these responses may be important for the orofacial hemodynamics. Although there are parasympathetic cholinergic and non-cholinergic vasodilator fibers in the orofacial area, relationship between their vasodilator responses and SABP is still unclear. We compared changes in blood flow in the masseter muscle（MBF）(cholinergic）and lower lip（LBF）（non-cholinergic）, and SABP evoked by electrical stimulation of the central cut end of the lingual nerve（LN）in anesthetized and vago-sympathectomized rats. Electrical stimulation of the LN caused significant increases in the MBF and LBF accompanied by a SABP increase. The SABP increase evoked by LN stimulation was followed by a MBF increase and it induced a decrease in vascular conductance in the masseter muscle, but not in the lower lip. Pretreatment with guanethidine significantly reduced the decrease in vascular conductance in the masseter muscle, although it failed to affect LN-induced MBF increases. The present study indicates that there are interactions between cholinergic vasodilation and SABP in the hemodynamics in the orofacial area, and suggest that local tissue factors may contribute to the observed response.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-93　TLE3 による筋分化調節機構

○古株彰一郎[1]，中富　千尋[1]，浦田真梨子[1]，松原　琢磨[1]，片桐　岳信[2]，自見英治郎[1]

[1]九歯大　分子情報生化
[2]埼玉医大　ゲノム医学　病態生理

骨格筋の機能低下は運動能力低下に直結し，日常生活動作や生活の質が低下する．とりわけ骨格筋は老化によって劇的にその量と機能低下を示すため，超高齢社会の日本ではいかに骨格筋の量・質を維持するかが重要である．Groucho/TLE は様々な転写因子に作用し，その転写活性を調節する転写調節共益因子である．TLE1 から TLE4 の 4 種類が存在し，そのいずれもが発生や細胞分化に重要な役割を果たすと考えられている．今回われわれはこれら TLE の中で，筋組織に発現し，さらに筋細胞と同様に間葉系細胞である脂肪細胞や骨芽細胞の分化運命決定を制御することが知られる TLE3 に着目し，筋分化における TLE3 の作用を検討した．まず，免疫組織学的解析により TLE3 は骨格筋の核に存在することが明らかとなった．次に，shRNA を用いて筋芽細胞株 C2C12 細胞の TLE3 をノックダウンしたところ，筋分化マーカーの Myogenin や Myosin heavy chain の発現が上昇し筋分化を亢進したが，筋分化のマスターレギュレーターである MyoD の発現量には影響を与えなかった．そこで，TLE3 は MyoD をターゲットとしてその転写共益因子として働くのではないかと考えた．免疫沈降法により MyoD と TLE3 は会合し，さらに TLE3 は MyoD が誘導する Myogenin のプロモーター活性を抑制することが明らかとなった．また，これらの作用には TLE3 の Q ドメインと SP ドメインが重要であることもわかった．以上より，TLE3 はマスターレギュレーターである MyoD に作用しその転写活性を抑制することで筋分化を制御している可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## TLE3 regulates myogenesis in vitro

○Kokabu S[1]，Nakatomi C[1]，Urata M[1]，Matsubara T[1]，Katagiri T[2]，Jimi E[1]

[1]Div Molecular Signaling and Biochem, Kyushu Dent Univ
[2]Div Pathophysiol, RCGM, Saitama Med Univ

Groucho/TLE family members are transcriptional co-factors that do not bind DNA directly, but are recruited by numerous transcription factors. TLE3, belonging to this family, resides in skeletal muscle and regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts, which are same mesenchymal lineage cells as myoblasts. Thus, we here examined the effects of TLE3 on myogenesis. First, we confirmed the expression and localization of TLE3 in mouse anterior tibial muscle. TLE3 was expressed and localized in nuclei of it. Next, we examined the effect of TLE3 on myogenesis by using C2C12 cells, myoblast cell line. Protein levels of myogenin and myosin heavy chain, myogenic differentiation makers, were increased when endogenous TLE3 was knocked down by sh RNA against TLE3. However, the shRNA against TLE3 did not affect the expression levels of MyoD, a master regulator of myogenesis, suggesting that TLE3 may target MyoD and regulate its transcriptional activity. Immunoparticipation assay revealed that TLE3 interacts with MyoD. Overexpression of TLE3 repressed MG185-luc activity induced by MyoD. Experiments using deletion-mutants of TLE3 revealed that both Q domain and SP domain are essential for interacting with and regulating of MyoD. Taken together, we demonstrated that TLE3 represses transcriptional activity of MyoD thereby suppressing myoblast differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-94　咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1, miR-133a の機能

○成山明具美[1]，島崎　絵美[1]，安藤　　準[2]，大貫　芳樹[3]，奥村　　敏[3]，朝田　芳信[1]

[1]鶴見大　歯　小児歯科
[2]鶴見大　歯　物理
[3]鶴見大　歯　口腔生理

咬筋および腓腹筋の生後発達過程における microRNA（miR）-1 と miR-133a の機能を解明するため，生後 1，2，3，4，8，12 週齢の C57B6 マウスの咬筋および腓腹筋における miR-1，133a の発現量を Real-time PCR 法により定量的に解析した．また，miR-1，133a 下流の増殖または筋分化誘発シグナル因子，histone deacetylases（HDACs），myocyte enhancer factor-2（MEF2），MyoD family，muscle creatine kinase（MCK），serum response factor（SRF），Cyclin D1 の発現量を Western Blotting 法により定量的に解析した．咬筋および腓腹筋において，miR-1 の発現量が生後 1～12 週齢にかけて経時的に増加したのに対し，HDAC4 の発現量は生後 2～12 週齢にかけて減少した．さらに，咬筋では MEF2，MyoD，Myogenin，MCK，腓腹筋では myogenic regulatory factor 4（MRF4），MCK の発現量が生後 2～12 週齢にかけて増加した．しかしながら，それらの発現量の変化率は，腓腹筋より咬筋で有意に大きかった．一方，miR-133a の発現量は，生後 1～12 週齢にかけて，咬筋では変化しなかったのに対し，腓腹筋では有意に増加した．また，SRF，Cyclin D1 の発現量は，生後 2～12 週齢にかけて，咬筋では有意に変化しなかったが，腓腹筋では，それぞれ有意な減少と増加が観察された．以上の結果は，生後発達過程において，咬筋では筋分化誘発シグナル経路（miR-1/HDA4/MEF2/MyoD family 経路）が優位にはたらくのに対し，腓腹筋では筋細胞増殖誘発シグナル経路（miR-133a/SRF/CyclinD1 経路）が優位に活性化されることを示唆する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Function of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles

○Nariyama M[1]，Shimazaki E[1]，Ando H[2]，Ohnuki Y[3]，Okumura S[3]，Asada Y[1]

[1]Dept Pediatric Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med
[2]Dept Biophysics, Tsurumi Univ Sch Dent Med
[3]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

The present study investigated the function of microRNA（miR）-1 and miR-133a during the postnatal development of mouse masseter and gastrocnemius muscles. In both the masseter and gastrocnemius muscles, the amount of miR-1 increased between 1 and 12 weeks, whereas the amount of histone deacetylase 4（HADC4）decreased between 2 and 12 weeks. In the masseter muscle, those of myocyte enhancer factor-2（MEF2）, MyoD, Myogenin, and muscle creatine kinase（MCK）increased between 2 and 12 weeks, whereas, in the gastrocnemius muscle, only those of myogenic regulatory factor 4（MRF4）and MCK increased. The amounts of miR-133a, serum response factor（SRF）, and Cyclin D1 did not change significantly in the masseter muscle between 1 and 12 weeks after birth. By contrast, in the gastrocnemius muscle, the amounts of miR-133a and Cyclin D1 increased, whereas that of SRF decreased. Our findings suggest that the regulatory pathway of miR-1 via HDAC4 and MEF2 plays a more prominent role during postnatal development in the masseter muscle than in the gastrocnemius muscle, whereas that of miR-133a via SRF plays a more prominent role in the gastrocnemius muscle than in the masseter muscle.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-95 デキサメタゾン投与による咬筋の萎縮と遅筋化に対するクレンブテロールの拮抗作用

○梅木　大輔[1]，大貫　芳樹[2]，伊藤　愛子[1]，中村　芳樹[1]，奥村　　敏[2]

[1]鶴見大　歯　歯科矯正
[2]鶴見大　歯　口腔生理

【目的】デキサメタゾン（DEX，糖質コルチコイド）は抗炎症薬や免疫抑制剤として用いられているが，その副作用として，骨格筋の萎縮と遅筋化を誘発することが報告されている．一方，クレンブテロール（CB，$\beta$2 作動薬）は，骨格筋において DEX に対する拮抗作用（肥大と速筋化）を示すことから，DEX 誘発性の筋委縮に対する治療薬としての可能性をもつ．本研究では，ラット咬筋において，DEX 誘発性の筋萎縮と遅筋化に対する CB の作用およびその作用機序を解析した．【方法】12 週齢の Wistar 系雄性ラットを，対照群（n＝8），CB 群（30 mg/L 飲料水，n＝8），DEX 群（6 mg/kg/2 日，腹腔内注射，n＝8），CB+ DEX 群（n＝8）の 4 群に分け，2 週間飼育後，咬筋を摘出し，筋重量，筋線維断面積およびミオシン重鎖アイソフォームの構成を定量的に解析した．また，筋肥大（Akt/mTOR 経路，IGF1 発現）および筋萎縮（Akt/FOXO 経路，myostatin 発現）誘発シグナル因子の活性化レベルをリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロット法により定量的に解析した．【結果および考察】CB は，ラット咬筋において，DEX 誘発性の筋萎縮と遅筋化に対して拮抗作用を示した．また，CB は，DEX による Akt/mTOR 経路および IGF1 発現の抑制に対しても拮抗作用を示したが, Akt/FOXO 経路の活性化および myostatin 発現には影響を与えなかった．これらの結果は，CB が Akt/mTOR 経路および IGF1 発現の調節を介して，DEX 誘発性の筋萎縮に対する拮抗作用をもつことを示唆する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Protective effects of clenbuterol against dexamethasone-induced masseter muscle atrophy and myosin heavy chain transition

○Umeki D[1]，Ohnuki Y[2]，Ito A[1]，Nakamura Y[1]，Okumura S[2]

[1]Dept Orthodontics, Tsurumi Univ Sch Dent
[2]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent

To gain more insight into the molecular mechanisms of the protective effects of clenbuterol（CB）, a beta2-agonist, against masseter muscle atrophy and fast-to-slow myosin heavy chain（MHC）transition induced by the dexamethasone（DEX）, a glucocorticoid, treatment, we examined the activities of muscle hypertrophic（Akt/mTOR pathway and IGF1 expression）and atrophic（FOXO pathway and myostatin expression）signaling in masseter muscle of rats treated with DEX and/or CB. Male Wistar rats, aged 12 weeks, were divided into four groups: Control, CB-treated（via the drinking water containing 30 mg/L）, Dex-treated（injected i.p. with 6 mg/kg body weight once every other day）and CB ＋ Dex-treated groups. After 2 weeks of each treatment, we examined the effect of CB on DEX-induced masseter muscle atrophy and MHC transition. We also studied the activities of hypertrophic and atrophic signaling with a western blot analysis. CB suppressed the DEX-induced masseter muscle atrophy, concomitantly with inhibition of fast-to-slow MHC transition. CB also attenuated the DEX-induced inhibition of Akt/mTOR pathway and IGF1 expression, while it had no effect on FOXO pathway and myostatin expression. These results indicate that CB antagonizes DEX-induced masseter muscle atrophy and fast-to-slow MHC transition via modulation of Akt/mTOR activity and IGF1 expression.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-96 マウス口腔扁平上皮癌細胞株（Sq1979）のリンパ節転移巣由来サブクローン（L 細胞）による Th1 型免疫反応の促進；その制御因子の同定と機能解析

○足立　充隆[1,2]，神谷　真子[2,3]，川木　晴美[2]，高山　英次[2]，稲垣　俊弘[1,2]，伊藤　宏衣[1,2]，鷲見　成紀[1,2]，村松　泰徳[1]，住友伸一郎[1]，近藤　信夫[2]

[1]朝日大　歯　口腔外科
[2]朝日大　歯　口腔生化
[3]朝日大　営　化学

【目的】C3H マウス口腔扁平上皮癌細胞（OSCC）株 Sq1979 を同系している移植後，リンパ節転移巣より樹立したサブクローン，L 細胞群（L-5 他），は親細胞に比べ刺激脾細胞の INF-γ 産生能を有意に促進した（第 57 回歯科基礎医学会学術大会，稲垣ら）．L 細胞群による Th1 型免疫反応促進機構を解明する目的で，L 細胞群で特異的に発現上昇する遺伝子を同定し悪性度との相関や免疫系に及ぼす影響を検討した．【方法】Sq1979（理研 BRC）に比べて L 細胞群で発現の高い遺伝子を cDNA マイクロアレイ法（SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent）と定量的 PCR 法（SYBR Premix EX Taq, TaKaRa）により同定した．siRNA（Silencer Select pre-designed siRNA, Life technology）を用いて標的 mRNA をノックアウトし刺激脾細胞の INF-γ 産生能に及ぼす効果を検討した．【結果と考察】Sq1979 に比べて L 細胞群では，Krt7, Lmo1, Bcl11a, Fyb, Slc16a13, Slc44a3, Tmem173，および H2-Q7 を始めとする MHC class I 遺伝子の発現が上昇していた．また，L-5 細胞において MHC class I 抗原と合複合体を形成する内在性 β2 マイクログロブリンを siRNA によりノックアウトすると，刺激脾細胞の INF-γ 産生の促進作用が顕著に低下した．以上の事実から転移型 L 細胞群では悪性形質の上昇に伴い Sq1979 に比様々な伝子群が活性化されており，MHC class I 抗原を介して Th1 型免疫が促進することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Promotion of Th1 response by lymphnode-metastatic sub-clones（L cells）of mouse oral squamous cell carcinoma, Sq1979 cells

○Adachi M[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Inagaki T[1,2], Ito H[1,2], Sumi S[1,2], Muramatu Y[1], Sumitomo S[1], Kondoh N[2]

[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent
[3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin

Introduction; We have established L cells from lymphnode metastases of C3H mouse oral squamous cell carcinoma, Sq1979. L cells promoted IFN-gamma-producing capability of mouse spleen cells stimulated by anti CD3+ antibody; however parental Sq1979 cells could not. In this study, we screened over expressed mRNAs in L cells compared to parental Sq1979 cells, and evaluated the function of promoting Th1 immune response. Materials /Methods; Microarray analysis（SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent）and real time PCR methods（SYBR Premix EX Taq, TaKaRa）were performed using samples from Sq1079（RIKEN BRC）and the metastatic sub-clones, L cells. Functional analysis was performed using pre-designed specific siRNA（Silencer Select pre-designed siRNA, Life Technology）. Results /Discussion; Expression of Krt7, Lmo1, Bcl11a, Fyb, Slc16a13, Slc44a3, Tmem173, and H2 mRNAs including H2-Q7 was elevated in L compared to Sq1979 cells. The effect of L-5 cells to promote Th1 response was abolished by knockout of endogenous beta2-microgrobulin, a component of MHC class I complex. These results suggest that, in L cells, Th1 response was promoted via the formation of MHC class I complex.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-97 *Paeonia lutea* 葉の抽出物による扁平上皮癌の増殖・転移抑制効果

○椋代　義樹，本橋　宏美

昭和大　歯　口腔外科

【目的】扁平上皮癌（SCC）は口腔領域において最もよく見られる悪性腫瘍である．一方，*Paeonia lutea*（*P. lutea*）は伝統的中国民間療法で用いられている植物である．そこで本研究では，*P. lutea* 葉からの抽出物による，扁平上皮癌の増殖・転移に対する作用を検索した．
【材料および方法】*P. lutea* 葉より段階的に，メタノール，エタノール，ブタノール，蒸留水により 5 つの抽出分画（ME，EA，BU，BW，W）を得た．PBS に希釈した各分画を，ヒト扁平上皮癌細胞株である SAS 細胞に添加培養した後，細胞の増殖，アポトーシス，細胞外基質への接着，細胞の遊走・浸潤，および，インテグリンタンパクの発現に対する影響を検索した．また，SAS 細胞を背側に移植したヌードマウスに，各分画溶液を 100 mg/kg body weight の濃度で 3 日に一回経口投与し，最大 70 日間飼育した後，扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤・転移に対する影響を検索した．
【結果】各抽出分画の増殖抑制および，SAS 細胞へのアポトーシス誘導の効果は，単層培養ではあまり強くみられなかったが，軟寒天培養においては著明に見られた．さらに，EA および BU 分画の添加は，SAS 細胞の遊走，浸潤，および，細胞外基質への接着を有意に抑制した．さらに，EA および BU 分画の添加は，いくつかのインテグリンタンパクの発現を抑制した．SAS 細胞を移植したヌードマウスにおいては，各分画の投与は，原発腫瘍の増殖および生存率に影響を与えなかったが，EA および BU 分画の投与によって，肝臓および肺への遠隔転移が抑制された．
【結論・考察】*P. lutea* 葉の抽出物質には，扁平上皮癌の増殖には影響しないが，遠隔転移を抑制する物質が含まれていると考えられる．現在その物質の単離を試みている．
会員外演者：代田達夫，近藤誠二（昭和大学歯学部口腔外科学講座），矢澤一良（早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構），繁森英幸，Meilin Zhang（筑波大学生命環境学群生物資源学類）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of the extracts of *Paeonia lutea* on proliferation and metastasis of squamous cell carcinoma

○Mukudai Y，Motohashi H

Dept Oral Surg, Sch Dent, Showa Univ

Squamous cell carcinoma（SCC）is one of the most common cancers of the head and neck region worldwide and is generally treated surgically in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. However, anti-cancer agents have numerous serious side effects, and alternative, less-toxic agents effective as chemotherapeutics for SCC are required. The *Paeoniaceae* family is widely used in traditional Chinese medicine. We examined methanol and butanol extracts of *Paeonia lutea*（*P. lutea*）leaves for their potential as an anti-cancer agent. Both extracts decreased the proliferation of SCC cells, induced apoptotic cell death and modulated migration, adhesion, chemotaxis and hapotaxis in an extra-cellular-matrix（ECM）-dependent manner due to altered expression of several integrin subunits. Subsequently, SCC cells were subcutaneously transplanted into athymic nude mice; the extracts reduced the metastasis of SCC cells, but had little effect on the volume of the primary tumor, or survival or body weight of the mice. The results suggest that the extracts may hold promise for preventing cancer metastasis.
Non-membership co-authors: Seiji Kondo, Tatsuo Shirota（Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Sch. of Dentistry, Showa Univ.）, Kazunaga Yazawa（Div. of Healthfood Science, Nanoscience and Nanotechnology, Waseda Univ.）, Hideyuki Shigemori, Meilin Zhang（Fac. of Life and Environmental Sciences, Univ. of Tsukuba）
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-98　角化嚢胞性歯原性腫瘍における角化関連タンパク質の免疫組織学的検討

○落合　隆永[1]，中野　敬介[2]，長谷川博雅[1]

[1]松本歯大　口腔病理
[2]岡山大　院医歯薬　口腔病理

【緒言】角化嚢胞性歯原性腫瘍（KCOT）は嚢胞状構造を呈する歯原性腫瘍である．KCOT の上皮組織は，錯角化重層扁平上皮で構成されている．KCOT に関する研究は多くなされているが，上皮組織の角化に関する研究報告は少ない．そこで今回我々は KCOT の上皮組織における角化関連タンパク質の局在を免疫組織学的に検討した．【方法】松本歯科大学病院で診断した角化嚢胞性歯原性腫瘍を 20 例抽出し実験に用いた．通法に従いホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し，involucrin（IVL），transglutaminase 1（TGM1），transglutaminase 3（TGM3），transglutaminase 5（TGM5）を一次抗体とする免疫染色をデキストランポリマー法で行った．【結果】IVL，TGM1，TGM3，TGM5 は全例の上皮組織に陽性であった．IVL は有棘細胞から角化細胞の細胞質に局在し，一部で基底細胞の細胞質に陽性であった．TGM3 は基底細胞から有棘細胞の核と細胞質に発現した．TGM5 は基底細胞の核と細胞質に発現し，有棘細胞では核と細胞膜への局在を認めた．TGM5 の一部の症例で散在性に核に陽性を認めた．TGM1 は有棘細胞の核と細胞質に多くの症例で発現したが，基底細胞から角化細胞に様々な局在を示した．【考察】重層扁平上皮における角化機序は IVL や loricrin を TGM1，TGM3，TGM5 が架橋することで角質層の形成が行われる．角化嚢胞性歯原性腫瘍は，TGM3 が基底細胞から有棘細胞で発現した．さらに TGM5 が基底細胞の核と細胞質に発現し有棘細胞では細胞膜への移行が観察された．TGM3 と TGM5 の発現は IVL の局在と関連し，上皮組織の角化に関連すると考えられる．角化嚢胞性歯原性腫瘍では，IVL を TGM3 と TGM5 が架橋することで上皮組織の角化現象に関与する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunohistochemical analysis of cornified cell envelope related proteins in keratocystic odontogenic tumours

○Ochiai T[1]，Nakano K[2]，Hasegawa H[1]

[1]Dept Oral Pathol, Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Oral Pathol and Med, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

Introduction: Keratocystic odontogenic tumour（KCOT）is a benign and cystic odontogenic tumour with comprises parakeratinized stratified squamous epithelium. We examine the localization of cornified cell envelope related proteins in KCOT. Material and methods: All specimens were selected from archived files in the Laboratory of Surgical Pathology, Matsumoto Dental University Hospital. We selected 20 cases of KCOT. Localizations of involucrin（IVL）, transglutaminase 1（TGM1）, transglutaminase 3（TGM3）and transglutaminase 5（TGM5）were analyzed by dextran polymer-based immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin embedded sections. Results: IVL distributed in cytoplasmic of pricle and cornified cells. TGM3 expressed between basal and pricle cells. TGM5 demonstrated in cytoplasms and nuclei of basal cells, and localized in cell membranes and nuclei of pricle cells. TGM1 showed various expression patterns in the epithelium. Conclusion: These results suggest that IVL, TGM3 and TGM5 play important roles in KCOT.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-99　Pim 阻害による骨髄腫骨吸収亢進の抑制

○寺町　順平[1,2]，岡村　裕彦[1]，羽地　達次[1]

[1]徳島大　院医歯薬　口組，[2]徳島大　院医歯薬　血液　内分泌代謝内科

【背景・目的】多発性骨髄腫(MM)は，骨髄微小環境に依存した進展を示し，広範な骨破壊病変を形成する．我々はこれまでに MM で発現亢進している Pim-2 が腫瘍進展や骨形成の抑制に重要な役割を演じていることを示してきた．しかしながら，MM の骨吸収亢進における Pim-2 の役割は不明であったため，今回 MM での破骨細胞形成促進における Pim-2 の役割について以下の検討を行った．【方法・結果】1）骨組織標本で Pim-2 はカテプシン K 陽性成熟破骨細胞に高発現していた．また，前破骨細胞株 RAW264.7 を用いた RANKL による破骨細胞分化誘導系において c-fos, NFATc1 やカテプシン K の発現上昇に伴い Pim-2 の発現も誘導された．2）この RANKL による Pim-2 の発現誘導は古典的 NF-κB 経路の阻害薬により抑制されたが，Pim 阻害薬 SMI-16a は NF-κB サブユニット p50 および p65 の核内移行に影響しなかった．3）SMI-16a は，RANKL や MM 細胞培養上清による RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に必須の転写因子である c-fos や NFATc1 の発現誘導を抑制し，破骨細胞形成と骨吸収の亢進を抑制した．4）SMI-16a は，RAW264.7 細胞において NFATc1 の核への移行を誘導する RANKL による $Ca^{2+}$ オシレーションを抑制した．5）脛骨内移植マウス骨髄腫モデルにおいて，SMI-16a 投与群では骨髄腫腫瘍進展の抑制とともに破骨細胞形成も抑制され，骨量が回復していた．【まとめ・考察】Pim-2 は MM における破骨細胞の分化と機能を促進する重要な調節因子であり，Pim-2 は腫瘍進展，骨形成の抑制に加え骨吸収の亢進にも関わる枢軸的な MM の治療標的であることが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Suppression of bone resorption enhanced in myeloma by Pim inhibition

○Teramachi J[1,2], Okamura H[1], Haneji T[1]

[1]Dept Histol and Oral Histol, Tokushima Univ Inst Biomed Sci, [2]Dept Hematol, Endocrinol Metabolism, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

Myeloma（MM）bone disease is characterized by enhanced bone resorption and impaired bone formation. We demonstrated that Pim-2 is an important therapeutic target to suppress MM tumor growth and resume bone formation. However, the role of Pim-2 in MM-induced bone resorption remains unknown. Therefore, the present study was undertaken to clarify the role of Pim-2 in osteoclastogenesis on MM bone disease. In bone tissues, Pim-2 is highly expressed in mature osteoclasts. RANKL induced Pim-2 in RAW264.7 preosteoclastic cells during their osteoclastogenesis. Although inhibitors of NF-κB pathway abolished the Pim-2 up-regulation by RANKL, Pim inhibition did not affect the nuclear translocation of NF-κB, suggesting Pim-2 as a downstream regulator of the NF-κB pathway. Pim inhibition suppressed the induction of NFATc1 and c-fos by RANKL as well as their osteoclastogenesis and bone resorption. The Pim inhibition suppressed the RANKL-induced $[Ca^{2+}]i$ oscillation to sustain NFATc1 nuclear translocation and trigger osteoclastogenesis. Treatment with SMI-16a reduced osteoclast numbers in bone lesions in MM models with intratibial injection of MM cells. These results demonstrate that Pim-2 play a critical role in osteoclastogenesis in MM. Pim-2 appears to be a pivotal therapeutic target in MM to suppress bone resorption besides inhibiting tumor growth and resuming bone formation

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-100　ニコチンの暴露は口腔がん細胞の増殖促進を誘導する

○西岡　貴志[1,2]，多田　浩之[3]

[1]東北大　院歯　口診
[2]東北大　院歯　インターフェイスプロジェクト支援
[3]東北大　院歯　口腔微生物

【目的】欧米諸国や日本における口腔がんの発症率は，がん全体の数パーセントと頻度はあまり高くないが，発生部位である口腔の特殊性から，摂食・咀嚼・嚥下障害，発音障害，味覚障害など重要な口腔機能が障害されることにより患者の QOL は著しく低下する．その口腔がんの主要なリスクファクターの一つとして喫煙が挙げられる．タバコの煙の中には 4000 種類以上の化学物質が含まれ，そのうち数百種類以上が発がん物質を含む有害物質である．タバコの構成主成分の一つであるニコチンは，習慣性があり，喫煙者の血流に高濃度で存在するが，これまで直接的に発がんに影響することは証明されていない．しかし，今回，ニコチン刺激により口腔がん細胞の増殖が促進され，がんの発症と進行に重要な因子である上皮成長因子受容体（Epidermal Growth Factor Receptor：EGFR）を活性化していることが示唆されたためその影響について報告する．【方法】血清飢餓状態（0.5% FBS 添加）で培養した口腔扁平上皮がん細胞（HSC-2）の培養液中にニコチン刺激（1 時間，2 時間）を加えた後，細胞を回収し，ウェスタンブロット法にて解析を行った．また，ニコチン刺激による細胞増殖促進作用を検討するために Wound healing assay も行った．【結果】ニコチン無刺激に対し，ニコチン刺激では刺激後 1 時間で EGFR のリン酸化が確認された．また，Wound healing assay においてはニコチン刺激群（24 時間）に細胞増殖効果を認めた．【考察】EGFR の下流経路などシグナル伝達のさらなる探索は必要であるが，今回，ニコチンの刺激により，口腔がん細胞が増殖促進されたことから，ニコチンはがん細胞の細胞増殖シグナルに対し付加的に作用することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cell

○Nishioka T[1,2]，Tada H[3]

[1]Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Res Unit Interface Oral Health Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[3]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

As a major environmental risk factor, cigarette smoke affects the development of many human diseases, including cancer. There are more than 4000 compounds in cigarette smoke, most of which are biohazards or carcinogens. Studies from many groups suggested a strong correlation between tobacco smoke and the development of human malignancies in various organs, such as the lung, breast, pancreas, or esophagus. Nicotine is one of the main component constituting the tobacco, there is addictive, which is present in high concentrations in the bloodstream of a smoker. Nicotine has not been demonstrated to affect the direct carcinogenic, but the studies suggested that the nicotine might be able to cell growth or cell proliferation. Signaling mediated by EGFR（Epidermal Growth Factor Receptor）family members is an important factor in the onset and progression of cancer. The underlying mechanisms by which cigarette smoke affects the oral remain unclear. Studies suggested the nicotine is not only only an addictive substance but also able to facilitate tumorigenesis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-101 口腔癌細胞における Kruppel-like factor 4 発現とプロモーターのメチル化

○山口　光祐，千葉　忠成，美原　希美，須藤　　遥，今井　一志

日本歯大　生命歯　生化

【目的】プロモーターのメチル化による遺伝子発現の抑制は，癌や生活習慣病など様々な疾患の発生や病態に大きな影響をおよぼす．転写因子である Kruppel-like factor 4（KLF4）は口腔癌細胞の脱分化を抑制し，低分化癌で発現が低下する．KLF4 遺伝子の発現抑制はプロモーター CpG アイランドの過メチル化によると考えられているが，癌の種類によりメチル化される領域が異なり，口腔癌における過メチル化の有無と領域は不明である．本研究では口腔癌細胞におけるメチル化とタンパク質発現に与える影響を解析した．

【方法】ヒト正常ケラチノサイト株（HaCaT）および口腔癌細胞株（HSC2, HSC3, KOSC2, HOC313, Ca9-22，SCCKN，TSU，HO-1-u-1，OSC19）から抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理後，PCR 増幅した KLF4 プロモーター領域について塩基配列解析によりメチル化部位を同定した．また，癌細胞を脱メチル化剤（5-Aza）で処理し，遺伝子とタンパク質の発現をそれぞれ Real-Time PCR とウエスタンブロットで解析した．

【結果・考察】プロモーター領域 CpG アイランドに存在する 109ヶ所メチル化感受性シトシンのうち，KLF4 を高発現する HaCaT 細胞ではメチル化はみられなかったが，口腔癌細胞株，特に HSC2，HSC3，KOSC2，SCCKN，TSU 細胞では-534 bp～-414 bp の領域において高頻度にメチル化が認められた．5-Aza 処理により口腔癌細胞 KLF4 遺伝子とタンパク質の発現が上昇した．従って，口腔癌細胞にいて KLF4 遺伝子は他の癌細胞種とは異なるプロモーター領域が過メチル化され，それにより KLF4 の発現が抑制されると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Kruppel-like factor 4 expression and methylation of promoter in oral carcinoma cells

○Yamaguchi K，Chiba T，Mihara N，Sudoh H，Imai K

Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

［Purpose］Hypermethylation of gene promoters closely associates with onset and progression of diseases through aberrant inactivation of gene expression. Kruppel-like factor 4（KLF4）that transcriptionally suppresses dedifferentiation of oral carcinoma cells is down-regulated in the poorly differentiated carcinomas. Hypermethylation of CpG islands in KLF4 gene promoter is responsible for the down-regulation. In this study, we analyzed the methylation states and its effect on protein expression in oral carcinoma cells.

［Method］Genomic DNA extracted from a normal keratinocyte line and oral carcinoma cell lines were treated with bisulfite, and applied the sequence analysis after the PCR amplification to identify the methylated sites. Expression of KLF4 gene and protein with or without the treatment with a demethylating reagent, 5-Aza, was monitored by Real-Time PCR and Western blot.

［Result & Discussion］Among 109 methylation-sensitive cytosines in the promoter, the methylation was frequently detected in oral carcinoma cells in contrast to the absence of methylation in normal keratinocyte. The methylation in carcinoma cells was commonly detected in a region from −534 bp to −414 bp up-stream of the gene. Expression of KLF4 gene and protein was up-regulated after the 5-Aza-treatment of cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-102 歯周疾患発症におけるEBVの関与 ―EBVによる炎症性サイトカインの産生誘導にはTLR-NF-κBシグナルが関与する―

○今井 健一，落合 邦康

日本大 歯 細菌

【目的】近年，Epstein Barr ウイルス（EBV）と歯周病発症との関連性を示す興味深い臨床研究データが複数の施設から報告されている．われわれは歯周病変部からEBVが検出されること（Kato et al. 2013），歯周病原菌が酪酸を介して潜伏感染EBVを再活性化することを報告した（Imai et al. 2012）．歯周病の主な原因が宿主側に求められる中，宿主細胞内に寄生し免疫機能低下を誘導するウイルスがその発症に関与するという説は，これまで細菌感染のみでは説明が困難であった歯周病の病因論確立に繋がる可能性がある．しかし，ウイルスがどのように病態形成に関与しているのか，その具体的な分子機構に関しては世界的に報告がない．

【材料と方法】炎症性サイトカインの測定はELISAにて，NF-κBの活性化はLuciferaseとWB法を用い検討した．

【結果と考察】感染能をなくしたEBVは，歯肉線維芽細胞から大量のIL-6とIL-8を誘導した．この作用は，LPSやLTA刺激より強いものであった．詳細な解析の結果，EBVはTLR-NF-κBシグナルを活性化することが明らかとなった．この事実は，ウイルスが本来の感染細胞でない歯周組織の細胞に対しても，細胞と接触するのみで炎症性サイトカインを誘導できる事を意味している．歯周病の発症と進展において，炎症性サイトカインは骨吸収への関与など中心的な役割を演じる．EBVが“歯周病原ウイルス”となりえるのか，新たな視点に立った歯周疾患の病態の理解が新しい治療と予防法の開発につながると考え，現在動物実験も含め研究を進めている．

【結論】EBVは局所および全身の相乗的な作用により歯周病の発症と進展に深く関与している可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## EBV promotes production of inflammatory cytokines through TLR-NF-κB pathway

○Imai K, Ochiai K

Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent

Epstein Barr virus（EBV）is a ubiquitous human gamma herpesvirus that infects more than 90% of the world's population. EBV infection causes several human diseases, including infectious mononucleosis, autoimmune disorders, and a number of malignancies. Interestingly, evidence accumulated over the past 10 years supports the role for EBV as a pathogenic agent of periodontal disease because bacterial activities alone do not explain several of its clinical characteristics. Despite this, it remains unclear how EBV is reactivated in the oral cavity and how activated EBV leads to the progression of periodontal diseases. We focused on the microbial interaction between bacteria and viruses in the etiology of infectious disease and found that the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* could induce EBV reactivation via chromatin modification. Our observations provide evidence for a possible microbial interaction between bacteria and EBV that may contribute to the pathogenesis of EBV-related diseases. In addition, we are doing the research how virus infection leads to progression of periodontal diseases. We found that EBV promotes production of inflammatory cytokines through TLR-NF-κB pathway.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-103 口腔扁平苔癬，苔癬様病変についての病理組織学的，免疫組織化学的検討

○岡田　康男

日歯新潟　病理

【目的】臨床的に口腔扁平苔癬は全身性扁平苔癬の口腔粘膜病変（OLP）と苔癬様病変（OLL）に分けられる．OLP は両側性，対称性に発現し，口腔内に限局する病変や病期により片側性，孤在性も知られており，また，OLL は片側性，孤在性に発現するが，両側性の場合もある．さらに OLP と OLL に臨床症状が類似する上皮性異形成（ED）もあり，癌化との関連や診断上問題となることが多い．そこで，これら疾患の病態を明らかにする目的で免疫組織化学的に検討した．
【対象・方法】対象は，過去 15 間に OLP ないしその疑いの臨床診断で生検が行われ，当教室にパラフィン包埋ブロックが保管されている 200 検体．性別では男性 64 検体，女性 136 検体．年齢は 14～84 歳（平均 61.6 歳）で，60 歳代が 70 検体で最も多く，ついで 50 歳代が 61 検体で多かった．部位別では，頬粘膜 128 検体，下顎歯肉 22 検体，舌 14 検体，上顎歯肉 12 検体，下唇 7 検体，下顎歯肉頬移行部 6 検体，口蓋 5 検体，上顎歯肉頬移行部 4 検体，上唇 2 検体であった．C 型肝炎は 4 例（2.5%）であった．病理組織学的には診断の再検討を行い，免疫組織化学的には Coxsackie－adenovirus receptor（CAR），E-cadherin，N-cadherin，CK13，CK17，Ki-67，p53，CD4，CD8，CD20，Foxp3 の染色を行い評価した．
【結果と結論】病理組織学的に OLP が 81 検体，OLL が 37 検体，ED が 69 検体，その他 13 検体であった．ED の診断には CK13，CK17，p53，Ki67 が有用であった．浸潤リンパ球は OLP，OLL，ED のいずれにおいても CD4 陽性 T 細胞，CD8 陽性 T 細胞，CD20 陽性細胞 B 細胞が混在していた．Foxp3 の発現に差はみられなかった．ED の 5 例に癌の発生を確認し得たが，OLP と OLL では癌の発生はみられなかった．
CAR，E-cadherin，N-cadherin の発現と上皮間葉移行（EMT）ならびに癌化との関連についても検討したので報告する．
本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部倫理委員会の承認を得て行った（ECNG-H-204）．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histopathological and immunohistochemical study of oral lichen planus and lichenoid legion

○Okada Y

Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

Oral lichen planus（OLP）is a disease of the oral mucosa of unknown cause producing lesions with an intense band-like inflammatory infiltrate of lymphocyte to lamina propria and keratinocyte cell death. Histopathological diagnoses of OLP, oral lichenoid lesion（OLL）and epithelial dysplasia（ED）（lichenoid dysplasia）are often difficult. In addition, differentiation between OLL and ED is extremely important to understand the malignant transformation process of ED.
In the present study, with the objective to achieve a higher precision in histopathological diagnosis, we conducted and compared the immunohistochemical stainings of CK13, CK17, Ki-67, p53, CD4, CD8, CD20, Foxp3, Coxsackie-adenovirus receptor（CAR）, E-cadherin, N-cadherin in OLP（81 cases）, OLL（37 cases）, ED（69 cases）and others（13 cases）.
CK13 was positive in OLP and OLL, and negative in epithelial dysplasia. CK17 was positive in OLP, OLL, and epithelial dysplasia. CD4, CD8, and Foxp3 was positive in OLP, OLL, and ED. These findings are useful as an adjunct to histopathological diagnosis.
Also, I report relationships of expressions of CAR, E-cadherin and N-cadherin to epithelial-mesenchymal transition（EMT）and canceration in OLP, OLL, and ED.
This study was approved by the Ethics Committee of The Nippon Dental University, Life Dentistry at Niigata（ECNG-H-204）.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-104　フェニトイン存在下でのヒト培養歯肉線維芽細胞のアポトーシス低下

○竹内　麗理[1]，松本　裕子[2]，平塚　浩一[1]

[1]日大松戸歯　生化
[2]日大松戸歯　薬理

【緒言】フェニトインは歯肉線維芽細胞数を増加させることで歯肉肥厚を誘発すると報告されており，細胞の恒常性維持のためには細胞周期やアポトーシスが重要な役割を担っている．我々はこれまでに，フェニトインがヒト歯肉線維芽細胞の細胞周期の $G_1$期停止を阻害することを報告している．本研究では，ヒト培養歯肉線維芽細胞におけるアポトーシス細胞数およびアポトーシス制御因子に対するフェニトインの影響を検討した.【方法】ヒト初代培養歯肉線維芽細胞を 10％血清含有 DMEM でセミコンフルエンスまで培養し，その後培養液を血清非含有 DMEM に交換，0.25 $\mu$M フェニトイン添加または無添加で，対照として 10％血清含有 DMEM で培養した．72 時間後に総細胞数およびアポトーシス細胞数を ELISA 法にて，24 時間後にアポトーシス制御因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて，また 24 時間後にカスパーゼ-2, -3, -8, -9, -10 活性を ELISA 法にて測定した.【結果および考察】血清非含有 DMEM で細胞を培養した場合, アポトーシス細胞数は増加したが，フェニトインはその増加を有意に抑制した．さらに，フェニトインは bcl-2 mRNA 発現量を増加させ，カスパーゼ-3, -8, -9 活性亢進を有意に抑制した.【結論】フェニトイン誘発性歯肉肥厚の発症には，フェニトインによる bcl-2 遺伝子発現の亢進およびカスパーゼ-3, -8, -9 活性亢進の抑制を介する歯肉線維芽細胞のアポトーシス低下が関与しているものと考えられる.【謝辞】本研究は JSPS 科研費 25861780 の助成を受けたものである.
**【利益相反】**利益相反状態にはありません.

## Depressed apoptosis in cultured human gingival fibroblasts exposed to phenytoin

○Takeuchi R[1]，Matsumoto H[2]，Hiratsuka K[1]

[1]Dept Biochem and Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
[2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

**Introduction.** The aim of this study is to investigate the mechanism of phenytoin（PHT）-induced gingival overgrowth. It has been reported that PHT causes the hyperplastic change in gingiva via increasing the number of gingival fibroblasts. Previously, we have demonstrated that PHT inhibits the $G_1$ cell cycle arrest in human gingival fibroblasts. In the present study, we examined the effects of PHT on the apoptosis and its mediators in human gingival fibroblasts. **Methods.** Cultured human gingival fibroblasts were reached semi-confluence and treated with DMEM containing 10％ serum or serum-free DMEM with or without 0.25 uM PHT. Total cell number, the relative number of apoptotic cells, and the activities of caspases 2, 3, 8, 9, and 10 were assayed by the ELISA, and the apoptotic genes were analyzed by the real-time PCR. **Results and Discussion.** PHT significantly depressed the increase in the number of apoptotic cells and increased the mRNA expression level of bcl-2 in the absence of serum. PHT also decreased the up-regulated activities of caspases 3, 8, and 9 by the serum-starvation. The mechanism of PHT-induced gingival overgrowth may be related to the apoptosis depressed by PHT. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25861780.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-105　ヒト歯髄細胞の産生するシンデカン 4 は炎症に関与する

○鎌田　愛子，田村　　功，合田　征司，吉川　美弘，堂前　英資，池尾　　隆
大阪歯大　生化

【目的】細胞膜プロテオグリカンであるシンデカンは多くのサイトカインと結合能を有し，極めて多様な生物学的過程に影響を及ぼすことが知られている．シンデカンにはコアタンパク質の異なる 4 つのタイプが存在しており，シンデカン 1 は CD138 として形質細胞や上皮細胞でも発現し，シンデカン 2 は間質細胞で，シンデカン 3 は神経系細胞で著明に発現することが知られている．シンデカン 4 は多くの細胞で発現しているが，近年，その遺伝子発現を欠損させると創傷治癒に遅延をきたすことが注目されている．私たちは，これまでにヒトの骨芽細胞や歯肉線維芽細胞がシンデカン 1，2，4 を発現していることを明らかにしてきた．今回，ヒト歯髄細胞におけるシンデカンファミリーの発現と炎症性サイトカインの影響を検討した．
【方法】矯正抜歯時に得られた第 3 大臼歯から歯髄細胞を初代培養し，継代後，実験に用いた．IL-1$\beta$ で刺激した細胞から RNA を抽出し，mRNA の発現を調べた．シンデカンコアタンパク質の発現は Western blotting 法で，糖鎖の関与は heparitinase による消化法で検討した．
【結果と考察】ヒト歯髄細胞ではシンデカンファミリーの全ての mRNA が発現していることが明らかになった．炎症性刺激 24 時間後の RT-PCR で著明な増加を示したのはシンデカン 4 だけで，シンデカン 1 と 2 の発現は抑制され，シンデカン 3 の発現は変動しなかった．炎症性刺激のシンデカン 4 におよぼす影響を詳細に調べたところ，mRNA 発現は刺激 3 時間後に最も上昇し，12 時間後には減少傾向を示した．培養上清の分析から，炎症刺激でシンデカンの細胞膜側が shedding により切断されて，遊離シンデカンが増加することが明らかになった．以上の結果から，歯髄における炎症反応に宿主側の応答としてのシンデカン 4 の関与が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Syndecan-4 is involved in inflammation in human dental pulp cells

○Kamada A，Tamura I，Goda S，Yoshikawa Y，Domae E，Ikeo T
Dept Biochem, Osaka Dent Univ

Syndecans are a family of cell surface heparan sulfate proteoglycans known to play critical roles in regulating multiple cellular functions, including participation in inflammation and wound healing as a host defense molecule. In this study, we demonstrate the syndecan family gene expression in human dental pulp cells and examine the effect of an inflammatory cytokine. Dental pulp cell cultures from impacted third molars were established and maintained in standard medium. Total RNA was extracted from the subconfluent cells 1-24 hr after IL-1beta addition. RT-PCR analysis demonstrated the mRNA expressions of all syndecans in the dental pulp cells. The relative level of mRNA expressions for syndecan-1 and -2 were suppressed significantly by IL-1beta stimulation. The expression of syndecan-3 remained unaltered by IL-1beta, although the expression level for syndecan-4 increased rapidly, showed a highest increase 3 hr after IL-1beta stimulation and subsequently decreased gradually. Our data demonstrate that all of syndecan family express in human dental pulp cells and play different roles, and, most notably, syndecan-4 is involved in inflammation.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-106　胎仔唾液腺の放射線障害に対するラジカルスカベンジャーの効果

○那須　優則[1]，堀江　哲郎[1]，井出　吉昭[2]，三橋扶佐子[1]，中原　　貴[2]

[1]日本歯大　生命歯　リサーチセンター
[2]日本歯大　生命歯　発生・再生

【目的】放射線照射された唾液腺への影響の早期軽減は重要である．胎仔期の唾液腺は上皮を間葉が取り囲む基本的な構造であり，放射線の影響が照射後早期に出現しやすい．マウス胎仔唾液腺に対するラジカルスカベンジャーの放射線防護効果を器官培養法により検討した．
【方法】(1)実験動物：妊娠 C57BL/6 マウスの胎生 15.5 日齢を実験に用いた．(2)ラジカルスカベンジャー投与：X 線照射 30 分前に 100 mg/kg の amifostine を妊娠マウスの腹腔内に投与した．(3) X 線照射：妊娠マウスを仰臥位に固定し，1 Gy，3 Gy の X 線（200 kV, 15 mA, 0.88 Gy/min）を全身に照射し，直ちに胎仔から顎下腺原基を摘出した．(4) 器官培養：顎下腺原基をポアサイズ 0.4 μm の culture cell insert 上で培養し，48 時間後を観察した．DMEM/F12 にペニシリン G（50 Units/ml），ストレプトマイシン（50 μg/ml），アンホテリシン B（Fungizone; 0.25 μg/ml）を添加し培養液とした．(5) 胎仔顎下腺の面積，上皮系組織の体積，HE 染色，AQP5 染色，PCNA 染色，RT-PCR を比較した．
【結果と考察】成長マウスを用いた in vivo の実験系で適正量とされる 100 mg/kg の amifostine 投与量は，無照射の胎仔顎下腺に対しては増殖抑制を示したことから過剰量であった．しかし，3 Gy 照射群では X 線の影響が軽減し，amifostine の胎仔唾液腺に対する放射線の防護効果を示した．今後，edarabone のような副作用が少ないラジカルスカベンジャーの効果を検討することが必要である．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effects of radical scavengers on radiation injury to fetal salivary glands

○Nasu M[1]，Horie T[1]，Ide Y[2]，Mitsuhashi F[1]，Nakahara T[2]

[1]Res Cent for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo
[2]Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

**Purpose** Early mitigation is essential in the treatment of salivary glands exposed to radiation. we examined the radioprotective effects of radical scavengers in the salivary glands of fetal mice using an organ culture assay.
**Materials & Methods** 15.5-day-old fetuses from pregnant C57BL mice were used for the study. 100 mg/kg amifostine was administered intraperitoneally to the pregnant mice 30 minutes before X-ray irradiation. Mice were systemically irradiated with 1 or 3 Gy of X-ray radiation（200 kV, 15 mA, 0.88 Gy/min）. Submandibular gland buds were then removed from the fetuses immediately after irradiation. Submandibular gland buds were cultured and were observed after 48 hours. The surface area of the fetal submandibular glands, the volume of epithelial tissue, and results of HE, AQP5, PCNA and RT-PCR staining were compared with those for non-irradiated mice.
**Results & Conclusion** The 100 mg/kg dose of amifostine was deemed to be excessive due to its growth-inhibiting effects on the submandibular glands of non-irradiated mouse fetuses. However, the fact that it mitigated the effects of X-rays in mice irradiated with a 3 Gy dose indicates that amifostine has a radioprotective effect on the fetal submandibular glands.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-107　三叉神経脊髄路核尾側亜核内アストロサイトの活性化は咀嚼筋への侵害刺激により誘発される

○松田　哲史，中塚美智子，隈部　俊二

大阪歯大　口腔解剖

【目的】炎症性疼痛の発症機序ならびに痛覚過敏との関連について検討するため，咬筋に実験的に炎症を起こした際の，脳幹におけるアストロサイト陽性細胞発現の経時的変化について検索した．【方法】雄性 SD ラット（250 g）の左側咬筋に LPS 2 μg/kg を生理食塩水に溶解したものを 100 μl 投与し，24 時間後に 6％高張食塩水を 100 μl ずつ，90 分間隔で 5 回投与したものを実験群とした．対照群は生理食塩水を 100 μl 投与し，24 時間後に再び生理食塩水を 100 μl 投与したものとした．試薬投与後 1 日，3 日，7 日，2 週にラット脳幹および咬筋を摘出し，通法に従って凍結切片を作製した．免疫組織化学的染色を行い，咬筋におけるブラジキニン B2 受容体の発現およびアストロサイトの発現について検索した．【結果】咬筋におけるブラジキニン B2 受容体の発現は，実験群および対照群ともに，投与後 1 日後に著明に認められたが，投与 7 日後にほぼ消失した．三叉神経脊髄路核尾側亜核では，実験群において試薬投与後 7 日にアストロサイト陽性細胞およびリン酸化 p38 MAPK 陽性細胞の発現を著明に認めた．試薬投与後 1 日ではリン酸化 p38 MAPK 陽性細胞は散見される程度であった．リン酸化 p38 MAPK 陽性細胞の発現は，三叉神経脊髄路核尾側亜核背内側部のみならず，背外側部や中央内側部でも認められた．【結論】咀嚼筋への侵害刺激により，局所の炎症は消退しても，三叉神経脊髄路核尾側亜核においてアストロサイトおよび p38 MAPK の活性化が 1 週間程度持続し，痛みの慢性化に移行している可能性があることが示唆される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Activation of astrocyte in the trigeminal subnucleus caudalis evoked by inflammatory stimulation of the masticatory muscle

○Matsuda Y，Nakatsuka M，Kumabe S

Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ

To estimate the inflammatory hyperalgesia induced by noxious stimulation of the masticatory muscles, we performed an immunohistochemical study on the expressions of activated astrocyte in the trigeminal subnucleus caudalis（Vc）. The left masseter muscle（LMM）of rats（male, 250 g）was stimulated in the following methods: 1）S-S group; the LMM was injected with saline（S, 2 μg/kg, 100 μl）on the 1st day of the experiment. On day 2, the same site was injected with the S again. 2）L-S6 group; the LMM was injected with lipopolysaccharide（LPS, 2 μg/kg, 100 μl）on the 1st day of the experiment. On day 2, the same site was injected with 6 ％ sodium chloride solution（S6, 100 μl, 5 times per 90 min）. Rats were allowed to survive for 1 day, 7 days or 14 days after the last injection. The brainstems were dissected and cut with a cryostat. These specimens were investigated with anti-GFAP enzyme-labeled antibody method. In the L-S6 group, GFAP-IR cells were particularly localized in the left Vc until 7 days after stimulation. The astrocyte activity in the Vc is related to central sensitization in chronic pain of the masseter muscle.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-108 カラゲニンおよびヒスタミン誘発ラット足浮腫に対するデクスメデトミジン塩酸塩の作用機序

○深田　哲也[1]，戸円　智幸[1]，橋本　修一[3]，砂田　勝久[2]

[1]日本歯大　生命歯　リサーチセンター，[2]日本歯大　生命歯　歯科麻酔，[3]日本歯大　生命歯

【目的】デクスメデトミジン（Dex）は $\alpha$2 受容体（$\alpha$2R）作動性の鎮静薬として用いられている．Dex には消炎作用も認められており，Sukegawa らはマウス足浮腫モデルを用いてカラゲニン（Car）による足浮腫抑制を報告している．今回我々は足浮腫形成に対する Dex 及び histamine（His）の早期における作用をラット足浮腫モデルを用いて検討し，さらにヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用い血管透過性に対する作用についても観察した．【方法】ラット足浮腫モデル 7 週齢雄性 Wistar ラットの後肢足底にの 1% Car あるいは 2.7 $\mu$M His を 50 $\mu$L 投与し足浮腫を形成した．Dex 等の薬は Car および His 溶液に混和し，投与した．足浮腫の変化は Car 投与直後の足容積に対して％表記した．His 受容体親和性測定 3H-pyrilamine を用いてヒト H1 受容体（H1R）に対する His および Dex の親和性を測定した．血管内皮細胞透過モデル HUVEC を用い FITC-dextran（FD）透過量から血管透過性を算出した．【結果と考察】Car 投与後，足容積は経時的に増大し，2 時間後に 120％で飽和する傾向が認められた．足浮腫は Dex によって抑制されたが，Dex と同じ $\alpha$2R 作動薬である clonidine では全く抑制されなかった．さらに $\alpha$2R 拮抗薬である atipamezole, yohimbine は Dex の作用に影響を与えなかった．これに対して，imidazoline 受容体（IR）作動薬である idazoxan は Dex の作用と阻害した．一方，His 投与により足浮腫は直ちに形成され 20 分後には約 116％に達した．この His 作用は 20 $\mu$M Dex で有意に抑制された．H1R と Dex の親和性は His のおよそ 1/40 であった．HUVEC の FD 透過率は 0.1 $\mu$M His 添加により 10 分後に 180％に増加したが，10 $\mu$M Dex の同時添加により control 値まで抑制された．本実験により Dex の消炎作用は $\alpha$2R ではなく IR, H1R がターゲットとなり，血管内皮細胞の透過性が関与している可能性が示唆された．**【利益相反】**利益相反状態にあります．

## Mechanisms of dexmedetomidine hydrochloride effects to rat paw edemas induced with carrageenan and histamine

○Fukada T[1]，Toen T[1]，Hashimoto S[3]，Sunada K[2]

[1]Sect Radioisotopes Research, Res Center for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo，[2]Dept Oral Anesth, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo，[3]Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

［Purpose］Dexmedetomidine has sedative and anti-inflammatory actions. Sukegawa *et al*. had shown dexmedetomidine inhibited edema formation in foot paw of mice. In this study, we investigated dexmedetomidine effects on rat paw edema induced by carrageenan or histamine and on permeabilities of human umbilical vein endothelial cells（HUVECs）.［Methods］Rat paw edema were accomplished by injecting 50 $\mu$L of 1 % carrageenan or 2.7 $\mu$M histamine into hindpaw. Dexmedetomidine etc., were injected with carrageenan or histamine. An affinity of dexmedetomidine or histamine to human histamine H1 receptor（H1R）were estimated using 3H-pyrilamine. Permeabilities of HUVECs treated with histamine and/or dexmedetomidine were assayed with FITC-dextran.［Results］Carrageenan-induced paw edema was inhibited by 10 $\mu$M dexmedetomidine. Clonidine, $\alpha$2 receptor agonist did not inhibit the paw edema. atipamezole or yohimbine, $\alpha$2 receptor antagonists id not inhibit the dexmedetomidine effect. Idazoxan inhibited the dexmedetomidine effect. Histamine-induced paw edema decreased by 20 $\mu$M dexmedetomidine. The affinity of dexmedetomidine to H1R was 40 times lower than that of histamine. Dexmedetomidine inhibited the increment of permeability induced 0.1 $\mu$M histamine.［Conclusion］We found that dexmedetomidine exerted anti-inflammatory effects via H1R and imidazoline receptor without $\alpha$2 receptor and the endothelial cells may play important role in the dexmedetomidine effects.

***Conflict of Interest*:** The authors declare conflicts of interest with this manuscript.

## P2-109　歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に対する免疫制御機構の解明

○永尾　潤一，田崎　園子，橋本麻利江，成田　由香，長　　環，田中　芳彦

福歯大　感染生物

歯周病は口腔内の歯周病原細菌が原因となり発症する疾患であり，歯を喪失する最も大きな原因となる．歯周病の病態には，ヘルパーT細胞による免疫応答が深く関与し，その中でもインターロイキン17（IL-17）を産生するT細胞サブセットであるTh17細胞が重要な役割を果たすことが明らかになっている．しかしながら，歯周病においてTh17細胞の分化を誘導する詳細なメカニズムは分かっていない．本研究では，Th17細胞の分化に着目して，歯周病原細菌に対する宿主の免疫応答制御機構の解析を行った．研究対象としてRed complexに分類される歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* W83株を用いた．マウスからナイーブT細胞と抗原提示細胞である骨髄由来樹状細胞を単離し，*in vitro* において *P. gingivalis* 全菌体成分のTh17細胞への分化誘導能をサイトカイン産生を指標としてフローサイトメトリーにより評価した．その結果，*P. gingivalis* 全菌体成分にTh17細胞分化誘導能があることを確認した．現在，歯周病の病態と免疫制御機構の解明を目指して，*P. gingivalis* 全菌体成分から超音波破砕，超遠心，逆相HPLC，SDS-PAGE分離等の手法を用いて抗原タンパク質を絞り込んでいる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis of immune system against periodontal-pathogen *Porphyromonas gingivalis*

○Nagao J，Tasaki S，Hashimoto M，Narita Y，Cho T，Tanaka Y

Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease caused by oral bacterial biofilm consisting of periodontal pathogens that result in tissue inflammation and alveolar bone loss. There is increasing evidence of potential role of the adaptive immune response, particularly the inflammatory cytokine IL-17 and IL-17-producing CD4+ T cells（Th17 cells）in alveolar bone loss. However, the mechanism to induce Th17 immune response against periodontal pathogens has not yet been determined. In this study, we investigated the immune regulatory mechanism against periodontal pathogens by focusing on Th17 differentiation. We targeted *Porphyromonas gingivalis* W83 which is an important periodontal pathogen. We evaluated the differentiation of mouse naive CD4+ T cells into Th17 cells *in vitro* with mouse bone marrow-derived dendritic cells primed with *P. gingivalis* whole cells by flow cytometry. We found that *P. gingivalis* whole cells induced Th17 differentiation. We are trying to identify the CD4+ T-cell epitopes of *P. gingivalis* to induce Th17 differentiation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-110　多機能性糖脂質によるマクロファージ METs 形成メカニズムの解析

○小田　真隆，黒澤　美絵，土門　久哲，寺尾　　豊

新潟大　院医歯　微生物

【目的】結核菌の細胞表層糖脂質をリード化合物として化学合成した多機能性糖脂質（Vizantin）は，マクロファージ活性化作用および緑膿菌の感染拡大抑制作用等を有していた．Vizantin がマクロファージの免疫賦活能を発揮するメカニズムについて解析したところ，マクロファージ細胞外捕獲網（METs）形成が引き起こされていることを見出した．そこで，Vizantin による METs 形成について詳細な分子機構を調べた．【方法・結果】RAW264.7 細胞を Vizantin で処理後，Sytox green（核酸染色剤）で染色した結果，細胞外において緑染された網状の核酸が蛍光顕微鏡下で観察された．次に，網状核酸を主成分とする METs を形成した細胞の生死について解析したところ，多くの METs 形成細胞はアポトーシスやネクローシスを引き起こしていなかった．つづいて，MitoTracker red（ミトコンドリア特異的染色剤），Rhod2-AM（ミトコンドリア特異的カルシウムイオンプローブ），JC-1（ミトコンドリア膜電位測定用蛍光プローブ）で処理した RAW264.7 細胞に Vizantin を添加し，共焦点レーザー顕微鏡で解析した．その結果，METs 形成細胞では，ミトコンドリア内のカルシウムイオンの上昇，膜電位の低下，およびミトコンドリアの形態変化が認められた．さらに，細胞外の核酸を回収後，ミトコンドリア DNA 特異的 Atp6 および Nds1 の有無について PCR 解析を行ったところ，両遺伝子ともに存在が確認された．【考察】Vizantin を RAW264.7 細胞に添加すると，ミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みが亢進した．そして，ミトコンドリアの形態変化を誘導し，細胞外へ Atp6 や Nds1 を含む核酸を放出させて METs 形成を促すことが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular analyses for formation of macrophage extracellular traps induced by multifunctional glycolipid

○Oda M，Kurosawa M，Domon H，Terao Y

Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

**Purpose:** The formation of extracellular traps has recently been recognized as a novel defense mechanism in several types of immune cells. It has been suggested that these structure work as capture devises and contribute significantly to killing several pathogens. However, the mechanism for induction of macrophage extracellular traps（METs）remains little known. In this study, we investigated the mechanism of METs formation from macrophage treated with vizantin, which is an original developmental glycolipid and a safe immune-stimulating compound. **Materials & Results:** We found that vizantin induced the formation of METs from macrophages（RAW264.7 cells, M-CSF-differentiated human macrophages）without cell death. RAW264.7 cells treated with vizantin were stained with MitoTracker red（mitochondria specific dye), Rhod2-AM（mitochondria specific calcium probe), and JC-1（mitochondria membrane potential probe). Vizantin induced the uptake of extracellular calcium ions, the decrease of membrane potential, and the form changes of mitochondria. In addition, the mitochondria specific gene（Atp6 and Nds1）was detected in METs from RAW264.7 cells treated with vizantin. **Conclusion:** We suggested that the uptake of calcium ions in mitochondria leads to METs formation, and METs are comprised of a nucleic acid derived from mitochondria.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-111　上皮細胞における TLR7 を介した免疫制御機能の解析

○松口　徹也[1]，楠山　譲二[2]，柿元　協子[1]，大西　智和[1]

[1]鹿児島大　院医歯　口腔生化
[2]鹿児島大　院医歯　口腔病理

【目的】皮膚や口腔の上皮細胞は，外来病原体に対する物理的バリアーとして働くのみでなく，病原体関連分子パターン受容体（PRRs）である数種類の Toll-like receptors（TLRs）を発現することで，一連の自然免疫反応を制御する機能も有する．TLR7/8 は一本鎖 RNA を認識し，ウィルス感染に重要な役割を果たすことが知られるが，その表皮細胞における機能的役割の詳細は不明である．今回マウス表皮細胞の，TLR7/8 アゴニストに対する反応性を検討した．【方法】マウス表皮角化細胞由来 Pam212 株およびマウス新生仔由来表皮細胞を，TLR7/8 の特異的リガンドである CL075（thiazoloquinolone 派生体）および TLR4 リガンドである LPS で刺激し，ウェスタンブロッティング法によって細胞内シグナル伝達分子の活性化を，定量 RT-PCR 法にて各種サイトカイン/ケモカインおよび TLRs の遺伝子発現レベルを解析した．【結果と考察】Pam212 細胞は定常的に TLR7 mRNA を発現していたが，TLR8 mRNA の発現は検出できなかった．Pam212 に対する CL075 刺激によって強い MAP キナーゼ（ERKs, p38 キナーゼ）のリン酸化と IKK$\alpha$ のリン酸化が誘導されたが，LPS 刺激によっては微弱な MAP キナーゼリン酸化の誘導を認めたのみであった．また，Pam212 の CL075 刺激によって，免疫抑制性サイトカインである IL-10 を含む数種類のサイトカイン/ケモカイン（IL-24, CCL17, CCL20）の mRNA の遺伝子発現の誘導を認めた．表皮細胞は TLR7 を発現し，ウィルス感染に対する免疫反応の制御機能を有することが明らかとなった．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Functional analysis of TLR7-meidated immuno-regulatory responses in epithelial cells

○Matsuguchi T[1]，Kusuyama J[2]，Kakimoto K[1]，Ohnishi T[1]

[1]Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Dept Oral Pathol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

［INTRODUCTION］Skin and oral epithelial cells work as physical barriers against outward pathogens. They are also capable of controlling the subsequent innate immune responses by expressing several members of Toll-like receptors（TLRs）, which are pattern recognition receptors for pathogen-derived components. TLR7/8 recognizes ssRNA and play important roles against viral infection. However, their roles in the epidermis are not known in detail. Here, we analyzed biological responses of epidermal cells to a TLR7/8 agonist.［METHODS］Pam212, a mouse epidermal cell line, was stimulated with CL075（thiazoloquinolone derivative）, a specific TLR7/8 ligand, or LPS, a TLR4 ligand, followed by Western blot and quantitative RT-PCR analyses.［RESUTS & DISCUSSION］Pam212 cells constitutively express TLR7, but not TLR8, mRNA. CL075 stimulation induced stronger phosphorylation of MAP kinases（ERKs & p38 kinase）and IKK alpha than LPS in Pam212 cells. Rapid mRNA induction of IL-10, a immuno-suppressive cytokine, and other cytokines/chemokines（IL-24, CCL17, & CCL20）was observed in CL075-stimulated Pam212 cells. Thus, some epidermal cells express TLR7 and may play regulatory roles of the subsequent immune responses by expressing several cytokines/chemokine including IL-10.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-112　炎症下の口腔粘膜にリクルートするT細胞の解析

○Hirunwidchayarat Worawalun，大野　建州，KANG Siwen，永井　重徳，東　みゆき
医科歯科大　院医歯　分子免疫

## Analyses of oral mucosa recruiting T cells under the inflammatory condition

○Hirunwidchayarat W，Ohno T，Kang SW，Nagai S，Azuma M
Dept Molecular Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci

［Purpose］The oral mucosa is a type II mucosal surface covered by a stratified squamous epithelium, which share many features with the skin. The oral mucosa also functions as a protective barrier against harmful environmental stimuli. It has been believed that oral mucosa is more resistant to inflammatory stimuli and recovers quickly from inflammatory change as compared with the skin. However the regulatory mechanisms have not been clarified yet. In this study, we have established a murine model of hapten-induced oral mucosal inflammation and examined histological changes of oral mucosa and recruitment of immune cells to the local oral mucosa.［Methods and Results］A hapten DNFB（1～1.5%）was painted onto the shaved abdominal skin as the sensitization and then 0.2% DNFB was topically applied onto the ear skin or the buccal mucosa as the challenge. Histological changes after the challenge was examined. At 24h after challenge, the reduction of epithelial thickness, proliferation of basal cells, destruction of basement membrane, infiltration of mononuclear cells within and beneath the epithelium were observed. At 40-48h, most epithelium was destroyed and much more cell infiltrated into the damaged epithelium and lamina propria. Despite the severe damages of epithelium, epithelial layer started to recover at 56h and the thickness returned to the normal level at 72h. Similar kinetical changes were observed between BALB/c and C57BL/6 mice. To analyze recruiting immune cells from the regional lymph nodes（LNs）, we used KikGR mice, in which the photoconvertible fluorescent protein changed from green to red upon 405 nm LED light exposure. In the above model, LED light was exposed on regional LNs（cervical and submandibular LNs）at 2h after the challenge and buccal mucosa was analyzed by histologically and flow cytometry. Kik-Red+ cells were found in the buccal mucosa at 24-48h after challenge and most of Kik-Red+ cells are CD3+ T cells. We will further analyze phenotype of recruiting T cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-113 口腔前癌病変における CD163+ 腫瘍関連マクロファージの分化誘導への浸潤ヘルパー 1 型 T 細胞の関与

○森　一将[1]，廣井　美紀[2]，嶋田　淳[1]，大森　喜弘[2]

[1]明海大　歯　口腔顎顔面外科
[2]明海大　歯　微生物

【緒言】腫瘍関連マクロファージ（以下 MΦ）は，種々な固形腫瘍の増殖，浸潤，転移に関与していると考えられている．しかし，癌の成立する以前の前癌病変における浸潤 MΦ の性状やその役割については明らかにはされていない．演者らは以前，本学会で白板症局所に CD163+MΦ が増加し，この MΦ は M1 MΦ の表現型を示す新たなサブセットである可能性を報告した．今回，この CD163+　M1 MΦ の分化誘導における関連因子ならびに浸潤 T 細胞の関与について免疫組織学的検索を行った．【方法】口腔白板症および病理組織学的な正常粘膜を検体とし，これら試料について各種 CD 抗体（CD163, CD68, CD80, CD4, CD8, CXCR3, CCR5, CCR4）および抗 STAT1（signal transducer and activator of transcription 1），抗 CXCL9 抗体を用いた免疫組織学的解析を行った（明海大学歯学部倫理委員会承認番号　A0920 号）【結果】白板症部で CD163+ MΦ の浸潤が認められ，CD163+ MΦ と CD4+ T 細胞の浸潤に正の相関関係が認められた．また Th1 のマーカーであるケモカインレセプター CXCR3 並びに CCR5 陽性細胞が認められた．一方，CCR4 陽性細胞（Th2）は認められなかった．Th1 からはインターフェロン γ（IFNγ）が産生されることから IFNγ 誘導性遺伝子産物である転写因子 STAT1 及び Th1 のケモカインである CXCL9 陽性細胞が認められ，活性型 STAT1 であるリン酸化 STAT1 の発現も認められた．さらに CD163+MΦ と STAT1 との共局在が蛍光二重染色により確認された．【結論】これらの結果から白板症部は Th1 優位な微少環境であり，ケモカイン CXCL9 によって浸潤した Th1 が IFNγ を産生し，CD163+　M1 MΦ の分化誘導に関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of infiltrated T-helper cell type 1 in differentiation of CD163-positive tumor associated macrophages in oral premalignant lesion

○Mori K[1]，Hiroi M[2]，Shimada J[1]，Ohmori Y[2]

[1]Div Oral Maxillofacial Surg, Dept Diagn Therapeutics Sci, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div Microbiol and Immunol, Dept Oral Biol Tissue Engineer, Meikai Univ Sch Dent

Background: Tumor-associated macrophages（TAMs）are implicated in the growth, invasion and metastasis of various solid tumors. However, the phenotype of TAMs in premalignant lesions has not been clarified. We have previously reported that the CD163+ TAMs in leukoplakia are a new subset expressed M1-related markers. In the present study, we investigate the involvement of infiltrated T cells and the mediators that participate in the polarization of CD163+ M1 TAMs. Methods: The subjects were biopsy specimens from patients with oral leukoplakia. Immunohistochemical analysis was carried out using antibodies against various CD antigens. Results: An increase in the rate of infiltrating CD163+ TAMs was observed in leukoplakia, and this rate positively correlated with the rate of infiltration of CD4+ Th cells. Although CCR4+ cells（Th2）rarely infiltrated, CXCR3+ and CCR5+ cells（Th1）were observed in the lesions. Cells positive for STAT1 and CXCL9, which are IFN-gamma-induced gene products, were also observed. Immunofluorescence double staining demonstrated that the cells positive for CD163 colocalized with those positive for STAT1. Conclusions: These results indicate that oral premalignant lesions is a Th1-dominated micromilieu and suggest that the IFN-gamma from infiltrated Th1 cells, which are recruited by CXCL9, participates in the differentiation of CD163+ M1 TAMs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-114　マウス舌癌モデルにおけるケモカイン遺伝子の発現動態

○山口　　花，大森　喜弘

明海大　歯　微生物

【目的】口腔癌の発症，進展には癌細胞の遺伝子変異だけでなく癌細胞の存在する微小環境が大きな影響を及ぼしている．とくに微小環境に存在するサイトカイン，ケモカインは免疫系細胞の浸潤，活性化だけでなく腫瘍細胞の増殖，浸潤にも関与している．そこで口腔癌の発症，進展におけるケモカインの役割を解明するため，野生型マウスに化学発癌物質を経口投与し，舌に発生する腫瘍形成とケモカイン，サイトカインの遺伝子の発現について検討した．【方法】C57BL/6 マウスに 4NQO（4-nitroquinoline 1-oxide）を 16 週間飲水させ，その後，通常飲水に切りかえて腫瘍形成確認後に舌組織を採取し，real time PCR による mRNA 発現解析ならびに病理組織学的解析を行った．検体採取は実験開始 16 週間後，および 28 週間後の 2 回行った．【結果】実験開始 7 週間後より，4NQO 飲水群において肉眼にて舌腫瘍が確認でき，検体採取日まで腫瘍の増大が認められた．4NQO 飲水群では，飲水群（対照群）に比べ，16 週で *CXCL1, CXCL10, CCL20* の発現が認められ，28 週でも高い発現が認められた．*CCL17, CCL22* の発現は 16 週で認められたが 28 週では減弱傾向を示した．*CCL3, CCL4, CXCL3, CXCL5* は 16 週では発現が弱かったが 28 週では増強した．また炎症性サイトカインである *IL-1β, TNF* は 16 週から検出され，*IFNγ* は 28 週で発現増強が認められた．一方，*IL-4, IL-10, IL-13* はいずれの時期においても有意な発現は認められなかった．【考察】化学発癌による舌癌病変の形成過程に，炎症性ケモカインの発現が認められ，腫瘍の増大と共に変動する遺伝子群が認められた．これらのケモカイン遺伝子の発現と浸潤免疫担当細胞，腫瘍形成との関連性について現在検討を行っている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Kinetics of chemokine gene expression in a mouse tongue cancer model

○Yamaguchi H，Ohmori Y

Div Microbiol Immunol Dept Oral Biol, Meikai Univ Sch Dent

**Background:** Tumor microenvironment significantly affects initiation and development of oral cancer. Especially chemokines and cytokines in the microenvironment influence the growth and invasion of tumor cells as well as infiltration and activation of immune cells. To elucidate the role of chemokine/cytokine in the development of oral cancer, we used a mouse tongue cancer model using the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide（4-NQO）, and examined carcinogenesis process and kinetics of chemokine/cytokine gene expressions. **Methods:** 4-NQO was delivered by drinking water for 16weeks, then changed to drinking water contained no 4-NQO. The tongues were dissected at 16 or 28 weeks, and real-time RT-PCR and pathological analysis were performed. **Results:** Levels for *CXCL1, CXCL10, CCL20* were higher in 4-NQO-treated mice than that of control at 16 or 28 weeks. Levels for *CCL17, CCL22* were high at 16 weeks but decreased at 28 weeks. Levels for *CCL3, CCL4, CXCL3,* and *CXCL5* were low at 16 weeks but increased at 28 weeks. Although levels for inflammatory cytokines such as *IL-1β* and *TNF* were high at 16 weeks, no significant expression of *IL-4, IL-10, IL-13* were observed. These results indicate that the modulation of inflammatory chemokines was observed during the development of tongue tumor.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-115 *Porphyromonas gingivalis* fimbriae による樹状細胞のクロスプレゼンテーション誘導

○多田　浩之[1]，松下　健二[2]，高田春比古[1]

[1]東北大　院歯　口腔微生物
[2]長寿センター　口腔疾患

【緒言】樹状細胞（dendritic cell, DC）による MHC class I を介した cross-presentation は，細胞寄生性細菌に対する $CD8^+$ 細胞傷害性 T 細胞応答の誘導に重要な役割を担っている．TLR や NLR リガンドなどアジュバントによる DC 活性化は cross-presentation 誘導に深く関わっているが，*Porphyromonas gingivalis* による cross-presentation 誘導機序は不明である．そこで，同菌の fimbriae による DC の cross-presentation 誘導について検討した．【方法】C57BL/6 野生型マウスおよび $TLR2^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を GM-CSF 添加 RPMI1640 培地で 5 日間培養後 $CD11c^+$ DC を分離した．DC を ovalbumin（OVA）ならびに *P. gingivalis* 381 株 fimbriae で刺激後，DC の CD40 発現を FACS で解析し，*Tap1* mRNA 発現を定量性 RT-PCR 法で測定した．また cross-priming 誘導は，OVA 処理 DC を $H\text{-}2K^b$-SIINFEKL 特異的 B3Z 細胞と 24 時間共培養後，B3Z 細胞の増殖を $\beta$-galactosidase 活性にて測定した．【結果】DC を fimbriae で刺激すると TLR2 依存的に CD40 発現が増強され，*Tap1* mRNA 発現が約 5 倍亢進した．OVA 処理 DC による B3Z 細胞の増殖は，DC を fimbriae で刺激すると増強された．【考察】*P. gingivalis* fimbriae は DC の cross-presentation 誘導を亢進させることが示唆された．今後，*P. gingivalis* 感染における DC の cross-presentation 誘導機序について検討する予定である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## *P. gingivalis* fimbriae enhances dendritic cell-mediated cross-presentation

○Tada H[1]，Matsushita K[2]，Takada H[1]

[1]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Dis Res, NCGG

**Objective** Cross-presentation of an exogenous antigen with MHC class I by dendritic cells（DCs）is critical for CTL induction. In this study, we investigated the effect of fimbriae from *Porphyromonas gingivalis* in inducing the cross-presentation on murine DCs in culture. **Methods** Bone marrow cells isolated from wild-type（WT）and $TLR2^{-/-}$ mice were cultured in RPMI1640 medium supplemented with GM-CSF for 5 d, then $CD11c^+$ DCs were selected. DCs were treated with ovalbumin（OVA）or with OVA plus *P. gingivalis* 381 fimbriae. The CD40 and *Tap1* mRNA expressions were determined by flow cytometry and real-time RT-PCR, respectively. To evaluate the cross-priming induction in vitro, DCs prepared from WT mice were cocultured with $H\text{-}2K^b$-SIINFEKL specific $CD8^+$ T（B3Z）cells, and the proliferation was determined by beta-galactosidase activity. **Results** We found that the level of CD40 was increased by the stimulation with fimbriae on the DCs from WT mice, but not from $TLR2^{-/-}$ mice. The expression of *Tap1* was efficiently upregulated in DCs from WT mice upon stimulation with fimbriae. DCs stimulated with fimbriae significantly enhanced the proliferation of B3Z cells. **Conclusion** These results suggest that fimbriae augments cross-presentation on DCs. The molecular mechanisms involving in the process are currently under investigation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-116 *Porphyromonas gingivalis* で増悪する動脈硬化および歯周病における NLRP3 インフラマソームの活性化

○落合　智子，小林　良喜，瀧澤　智美，桑原　紀子，續橋　　治，齋藤　真規

日大松戸歯　微生物免疫

*Porphyromonas gingivalis*（*P. g*）は高脂血症動物の動脈硬化進展に関与することが報告されている．動脈硬化は動脈壁の慢性炎症に基づく疾患である．近年の研究からインフラマソームが血管の炎症および動脈硬化の進展に重要な役割を果たしている事が示唆されている．今回，我々は高脂血症 Apoe 欠損（$Apoe^{shl}$）マウスを用いて，*P. g* 感染により誘導される動脈硬化におけるインフラマソームの関与を調べた．更に NLRP3 欠損マウスを用いて，血管炎症および骨吸収に及ぼす影響を検討した．*P. g* 野生株（ATCC33277）の感染は KDP136（gingipain-欠損株）or KDP150（FimA-欠損株）と比較して，骨吸収，大動脈起始部での動脈硬化病巣，および歯肉又は大動脈における NLRP3, pro-IL-1$\beta$, pro-IL-18, pro-caspase-1 の遺伝子発現を有意に増強した．*P. g* ゲノム DNA は野生株感染マウスの大動脈，歯肉組織，脾臓及び心臓中に検出されたが，KDP136 又は KDP150 感染マウスの検出率は低下していた．野生マウスに比較して，NLRP3 欠損マウスへの *P. g* 感染は骨吸収の増加を有意に減少した．NLRP3 欠損マウスにおいては，*P. g* 感染により誘導された歯肉又は大動脈における NLRP3, pro-IL-1$\beta$, pro-IL-18, pro-caspase-1 の遺伝子発現が有意に低下していた．これらの結果から，*P. g* は炎症応答を介して動脈硬化および歯周病を促進する可能性が示唆された．更に線毛やジンジパインなどの細菌表層タンパクが *P. g* による炎症応答に関与していることが示唆された．（非会員共同研究者：山口陽平　東京女子医大；鈴木敏彦　琉球大学）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Activation of NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerrated atherosclerosis and periodontal disease

○Ochiai To，Kobayashi R，Takizawa T，Kuwahara N，Tsuzukibashi O，Saito M

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

*Porphyromonas gingivalis*（*P. g*）has been shown to accelerate atherosclerotic lesion development in hyperlipidemic animals. Atherosclerosis is a disease characterized by inflammation in the arterial wall. Recent studies have suggested that the inflammasome plays an important role in the development of vascular inflammation and atherosclerosis. We investigated a possible association between the inflammasome in atherosclerosis induced by *P. g* infection using $Apoe^{shl}$ mice, and further investigated the effect of NLRP3 deficiency on vascular inflammation and bone loss. *P. g* challenge significantly increased alveolar bone loss, lesion area of the aortic sinus covered with atherosclerotic plaque, gingival or aortic gene expression of NLRP3, pro-IL-1b, pro-IL-18, pro-caspase-1, compared with KDP136（gingipain-null mutant）or KDP150（FimA-deficient mutant）challenge. *P. g* genomic DNA was detected in the aorta, gingival tissue, spleen and heart of *P. g*-challenged mice. The persistence of bacterium in these organs were distinctly different from that of KDP136- or KDP150-challenged mice. The increased levels of bone loss and gene expression in gingival tissue and aorta induced by *P. g* in wild mice were significantly decreased in NLRP3 KO mice. These results indicate that *P. g* promotes atherosclerosis and periodontal disease through the inflammatory response, an effect mediated by NLRP3 inflammasome activation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-117 マウス骨髄由来間葉系幹細胞は共培養下で未分化単球／マクロファージ系細胞を CD206 陽性の免疫抑制性（M2）マクロファージに分化誘導する

○客本　斉子[1]，滝沢　尚希[2]，島　　杏奈[3]，帖佐　直幸[1]，加茂　政晴[1]，大久保直登[4]，衣斐　美歩[5]，八重柏　隆[2]，石崎　　明[1]

[1]岩医大　歯　生化，[2]岩医大　歯　歯周，[3]岩医大　薬　機能生化，[4]北大　院薬　臨床病態，[5]岩医大　薬　分子細胞薬理

【目的】 間葉系幹細胞（MSC）はその組織修復能力に加え，最近では免疫制御能力にも注目されてきている．我々はこれまでにマウス骨髄組織から MSC と血球性細胞を同時に増殖させる独自の培養系を開発した．この初代培養系では，MSC から分泌される因子によりもう一方の細胞である未分化単球・マクロファージ（Mφ）系細胞の増殖が促進される．また，興味深いことに，この未分化単球・Mφ 系細胞は共培養された MSC の作用により，免疫抑制性（創傷治癒促進性）Mφ マーカーである CD206 陽性（約 70-80％）の M2-Mφ に分化誘導されていることが明らかになった．そこで本研究では，これら両細胞がいかに相互作用し細胞増殖の制御や Mφ の M2 化がなされるのかを明らかにすることを目的とした．【方法】 td-Tomato あるいは EGFP 蛍光強発現 TG マウス骨髄組織を採取し培養後，Lineage（Lin）Cell Depletion Kit と磁気細胞分離装置を用いて，MSC（Lin-）と血球系細胞（未分化単球・Mφ 系細胞/Lin+）とに分離した．フローサイトメトリーで両細胞のマーカー発現を確認した後，各細胞の増殖と M2-Mφ 分化に影響を与える因子について調査した．M2 化については，両細胞を transwell を用いた非接着共存培養と接着共存培養を行い M2 マーカ発現を比較した．【結果・今後の展開】 共培養された MSC（Lin-）から分泌され，他方の未分化単球・Mφ 系細胞（Lin+）の増殖を促進する液性因子 A を同定した．2 つの系での共存培養の結果，Lin+細胞は共培養された Lin-により M2-Mφ へと分化誘導されたが，両者の細胞間接着は M2 化をより強く誘導した．このことから，Lin+の M2 化には一部，Lin－との接着シグナルの関与が示唆された．今後は，タンパク質などの因子のみで M2-Mφ を選択的に増殖・分化させる新たな培養系の確立を目指すとともに，MSC と M2-Mφ との協調作用による組織修復能力について *in vitro* と *in vivo* で調査を進めたい．**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## MSCs educate undifferentiated monocytes/macrophages to the CD206-positive immunosupressive（M2）macrophages in the co-culture of mouse bone marrow cells

○Kyakumoto S[1]，Takizawa N[2]，Shima A[3]，Chosa N[1]，Kamo M[1]，Okubo N[4]，Ibi M[5]，Yaegashi T[2]，Ishisaki A[1]

[1]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ，[2]Div Perio, Dept Preserv, Sch Dent, Iwate Med Univ，[3]Dept Biochem, Sch Pharmaceut Sci, Iwate Med Univ，[4]Lab Pathophysiol and Therapeut, Fac Pharmaceut Sci, Hokkaido Univ，[5]Dept Mol Cell Pharma, Sch Pharma Sci, Iwate Med Univ

Messenchymal stem cells（MSCs）have recently been known to exert the potent immunosuppressive effects. We have established the bone marrow-derived MSCs cell culture system in which MSCs and blood cells proliferate together. We found that the blood cells were differentiated to the CD 206（alternatively activated macrophage（M2）marker）-positive immunosuppressive macrophages during the co-culture with MSCs. In this study, we investigated how these cells interact with each other in the primary co-culture and the resulting M2 macrophage polarization of blood cells occurs. MSCs and blood cells were separated by using Lineage（Lin）Cell Depletion Kit from the 2-passage cells grown in the co-culture, and the separated cells were examined for the growth, differentiation, and the cell surface markers expression. The growth of blood cells（Lin+）was sustained by a soluble factor A that was secreted by Lin- cells. The co-culture experiment using a transwell revealed that the expression of CD 206 in Lin+ cells directly adhered with Lin- cells was higher than that cultured separately with Lin- cells in a transwell. The results suggested that the direct physical cell to cell interaction is partly responsible for the up-regulation of the CD206 expression in Lin+ cells. ***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-118　概日リズムに依存した分泌型 IgA 抗体誘導経鼻ワクチン投与

○小林　良喜，桒原　紀子，續橋　　治，齋藤　真規，落合　智子

日大松戸歯　微生物免疫

約 24 時間周期で自立振動する概日リズム（サーカディアンリズム）は，生体機能の発現に必要であり生体が恒常性を維持するために極めて重要な役割を果たしている．近年，抗原提示能，リンパ球の増殖，サイトカイン産生などの免疫機能も概日リズムにより制御されていることが報告されている．粘膜ワクチンは粘膜分泌液中と血液中への抗原特異的抗体の誘導が可能であり，感染症予防に対して全身と粘膜の 2 方面からの防御を誘導することができる．なかでも経鼻ワクチンは投与量が他の粘膜ワクチンよりも少ないことが利点である．そこで本研究では概日リズムを利用した粘膜分泌液中の抗原特異的分泌型（S-）IgA 抗体産生誘導能を検討した．卵白アルブミン（OVA）を粘膜アジュバントとしてコレラ毒素（CT）と共に週 1 回，3 週間経鼻投与を行った．投与時間による抗原特異的抗体応答を検討するために，昼間（9:00）投与群と夜間（21:00）投与群の 2 群とした．最終投与から 7 日後，夜間投与群において顕著な OVA 特異的 S-IgA 抗体の産生を鼻腔洗浄液中に認め，同様に OVA 特異的抗体産生細胞の増加を鼻腔組織に認めた．また血液中への IgG，IgA 抗体と抗体産生細胞の増加傾向を認めた．興味深いことに頸部リンパ節における抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖活性は昼間投与群に比べて増加していた．粘膜分泌液中の抗原特異的 S-IgA 抗体産生を誘導するには昼夜間の投与に大きく依存していたことから，粘膜ワクチン投与による効果的な誘導を得るには概日リズムを考慮することが必要であると考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of immuno responses with nasal immunization by differential time condition

○Kobayashi R，Kuwahara N，Tsudukibashi O，Saito M，Ochiai T

Dept Microbiol and Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Light and daily rhythms are thought to have strong influence on immune function. It is becoming increasingly evident that disruption of daily rhythms affects the immune response. Recently, it is reported that circadian rhythms control immunoreactions such as antigen presentation, lymphocyte proliferation, and cytokine expression. Although several studies have shown that the immunoreactions and onset of the inflammatory disease exhibit circadian variation, the molecular details of the circadian rhythms in lymphocytes are poorly understood. In this study, we attempted to clarify the immune responses of mice nasally immunized under the condition at different time. Mice were given nasal OVA plus native CT（nCT）for 3 consecutive weeks with day- or night-time differences. Seven days after the last immunization, significant high levels of OVA-specific secretory（S-）S-IgA Ab responses were detected in the nasal washes, and saliva of night-time immunization group. These results were confirmed at the cellular levels. Our findings suggest that nasal immunization at night-time strongly enhances mucosal immune responses than the immunization during the day-time.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-119　抗微生物ペプチド cathelicidin の象牙質修復に対する促進的関与

○堀部　寛治，細矢　明宏，平賀　　徹，中村　浩彰

松本歯大　口腔解剖Ⅱ

【目的】cathelicidin は感染刺激に応答して好中球や単球などから分泌され，抗微生物作用を発揮するペプチドである．また，cathelicidin は創傷時においても産生され，受容体である Formyl peptide receptor 2（Fpr2）と結合することで創傷治癒を促進することが報告されている．本研究では，歯損傷時における cathelicidin の発現および，その象牙質修復に対する関与について組織学的，細胞生物学的に検討を行なった．【実験方法および結果】（1）6 週齢ラットの上顎第一臼歯近心面に歯科用エンジンを用いて象牙質までの窩洞形成を行なった後，cathelicidin および Fpr2 陽性細胞の局在を免疫組織学的に検索した．窩洞形成 3 日後の切削部近傍部歯髄において cathelicidin 陽性の炎症性細胞の局在が認められ，またその周辺の紡錘形細胞において Fpr2 の陽性反応が認められた．窩洞形成 7 日後に Dentin sialoprotein（DSP）陽性の修復象牙質が形成された．（2）6 週齢ラットの下顎切歯より歯髄組織を採取し，コラゲナーゼ処理後，3.5 cm dish に播種した．LPS またはヒト cathelicidin を添加し，24 時間後に total RNA を回収し，リアルタイム RT-PCR に供した．LPS 添加により cathelicidin mRNA 発現がコントロールと比較して有意に上昇した．また，cathelicidin 添加により dentin sialophosphoprotein（Dspp）mRNA 発現レベルが有意に上昇した．【考察】侵襲刺激後の歯髄では cathelicidin 陽性細胞が増加し，その後修復象牙質形成が生じることが明らかとなった．また，LPS 刺激により培養歯髄細胞の cathelicidin mRNA 発現が上昇し，cathelicidin 添加によって Dspp mRNA 発現が上昇したことから，cathelicidin は侵襲刺激後の修復象牙質形成に寄与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of antimicrobial peptide cathelicidin on reparative dentin formation.

○Horibe K，Hosoya A，Hiraga T，Nakamura H

Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ

Cathelicidin is antimicrobial peptide secreted by monocytes and neutrophils in reponse to infective stimulus. Cathelicidin production is promoted by wounds, and involves in wound repair by binding Formyl peptide receptor 2（Fpr2）. In this study, we investigated the expression of cathelicidin and Fpr2 after pulp injury in order to clarify their role in reparative dentin formation by immunohistochemical and cell biological methods. Cavity was prepared on the mesial surface of the upper first molar in 6-week-old rats. Immunohistochemistry for cathelicidin, Fpr2 and Dentin sialoprotein（DSP）was performed on paraffin sections. At 3 days after cavity preparation, cathelicidin-positive inflammatory cells were seen in the pulp under the cavity. Fpr2-positive fibroblastic cells were detected in the vicinity of injured pulp. After 7 days, reparative dentin was formed and showed DSP-positive reactivity. Harvested pulp cells from lower incisors of 6-week-old rats cultured with LPS or human cathelicidin. After 24 hours, total-RNA was extracted and used for realtime RT-PCR. LPS significantly increased cathelicidin mRNA expression in pulp cells. In addition, dentin sialophosphoprotein（Dspp）mRNA expression level was enhanced by cathelicidin. These results suggest that cathelicidin contributes to the reparative dentin formation after pulp injury.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-120　免疫応答を誘導する歯周病原細菌の菌体成分の探索

○成田　由香，田崎　園子，橋本麻利江，永尾　潤一，長　　環，田中　芳彦
福歯大　感染生物

歯周病はRed complex細菌をはじめとする口腔細菌により引き起こされる慢性感染症であり，歯周病の発症と進行には免疫応答が関与する．ヘルパーT細胞を欠損したマウスでは歯周病感染に抵抗性であり，その病態にT細胞による免疫応答が関与する．歯周病患者の口腔内にはヘルパーT細胞が多く存在することが知られており，歯周病原細菌そのものがヘルパーT細胞を分化する抗原であることが示唆されている．これまでに歯周病原細菌のコンポーネントを単発的に用いてヘルパーT細胞の分化への影響を検討した報告はあるものの，歯周病原細菌の抗原性に着目して包括的に解析した研究は見当たらない．そこで，重度歯周炎に関連するRed Complexに属する歯周病原細菌でありゲノムシーケンスが決定されている*Porphyromonas gingivalis* W83株ならびに*Tannerella forsythia* ATCC43037株を対象とし，サイトカインの産生を指標としてヘルパーT細胞の分化への影響を包括的な解析を行った．骨髄由来樹状細胞を抗原提示細胞とし，抗原として全菌体抽出液および分画した細胞質画分，内膜画分，外膜画分といった各種菌体成分を用いて，野生型マウスから単離したナイーブT細胞をin vitroでヘルパーT細胞の分化誘導を行い，主要な抗原部位を有する菌体成分の探索を行った．ヘルパーT細胞を分化誘導する歯周病原細菌の菌体成分を見出したので報告する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Exploration of periodontal pathogen's components inducing immune response

○Narita Y，Tasaki S，Hashimoto M，Nagao J，Cho T，Tanaka Y
Sec Infct Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll

Periodontal diseases are chronic infections caused by oral pathogenic bacteria, and immune response contributes to their onset and progression. CD4+ T cells knockout mice are resistant to periodontal infections, and immune response of T cells contribute to its clinical condition. It is known that CD4+ T helper cells exist in the oral cavity of periodontal disease patients, and periodontal pathogens themselves are considered as the antigen in CD4+ T helper cell differentiation. However, there is a little known about periodontal pathogen's components inducing immune response of T helper cells. Therefore, we conducted a comprehensive analysis how Red complex bacteria, such as *Porpyoromonas gingivalis* W83 and *Tannerella forsythia* ATCC43037, associated with severe periodontitis affected T helper cell differentiation. We divided Red complex bacteria into several components to explore periodontal pathogen's epitopes in T helper cell differentiation. Indeed, we used whole cell extracts and fractionated bacterial components as the antigen with bone marrow-derived dendritic cells as the antigen presenting cell, and stimulated naive T cells isolated from wild-type mice to differentiate into T helper cell subsets in vitro. We report periodontal pathogen's components inducing immune response of T helper cells.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-121 *Porphyromonas gingivalis* の 外膜ヴェシクルは 2 型免疫応答を誘導する

○中尾　龍馬，泉福　英信

感染研　細菌一

グラム陰性菌は菌体表層から外膜ヴェシクルと呼ばれる小胞を菌体外に放出する．様々な細菌種において，外膜ヴェシクルには病原因子や抗原が含まれていることが報告されている．臨床的には，髄膜炎菌の外膜ヴェシクルが既に免疫原としてヒト用ワクチンに応用され，一定の防御効果が得られている．本研究では，大腸菌，髄膜炎菌，*Porphyromonas gingivalis* の 3 種のグラム陰性細菌から外膜ヴェシクルを得て，これらをマウスの経鼻免疫実験に供試して，宿主免疫応答の違いを比較した．1 μg の外膜ヴェシクルを粘膜アジュバント Poly(I:C) と共に BALB/c マウスの鼻腔へ免疫した．血清，鼻腔洗浄液，唾液を 2 回目の免疫をした 2 週間後に回収して，それらを全菌体を固相化した ELISA に供試した．本実験に使用したすべての細菌種由来外膜ヴェシクルは，血清中および全身の粘膜面で，それぞれ菌特異的 IgG と s-IgA を効果的に誘導することができた．また血清 IgG サブクラス解析では，*P. gingivalis* は IgG1/IgG2a 比が，大腸菌や髄膜炎菌のそれに較べ有意に高かったことから，*P. gingivalis* の 外膜ヴェシクルは大腸菌や髄膜炎菌と異なり，宿主の 2 型免疫応答を強く誘導することが明らかとなった．以上，外膜ヴェシクルの経鼻免疫法は，種の違いに関わらず効果的に宿主の血中および粘膜面での免疫応答を誘導できること，また *P. gingivalis* の外膜ヴェシクルは 2 型免疫に傾いたユニークな免疫応答を誘導することが示唆された．

**【利益相反】** 利益相反状態にはありません．

## Intranasal immunization with outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* induces a biased type 2 response

○Nakao R，Senpuku H

Dept Bacteriol, Natl Inst Infect Dis

Outer membrane vesicles（OMVs）were released from the cell surface of Gram-negative bacteria during normal bacterial growth. In the present study, we aimed to compare the immune responses against three different OMVs derived from *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* as well as *Porphyromonas gingivalis*. BALB/c mice were intranasally immunized twice by 1 microgram of OMVs with a mucosal adjuvant, Poly(I:C). Serum, nasal wash, and saliva specimens were collected at two weeks after second immunization and analyzed using whole-cell ELISA. Pathogen-specific IgG in sera were successfully elicited in all pathogen OMV models. OMVs of all tested pathogens could also elicit pathogen-specific s-IgA at mucosal surfaces of whole body. Serum IgG subclass analysis revealed that IgG1 is predominant in *P. gingivalis* model, while IgG2a is predominant in *E. coli* or *N. meningitidis* model. The findings suggest that *P. gingivalis* OMV vaccine induces a biased type 2 response, in contrast to the cases of *E. coli* and *N. meningitidis*. In conclusion, we suggest the general applicability of the intranasal immunization model for eliciting both systemic and mucosal immune responses against pathogens irrespective to the species type. We also demonstrated an unique character of *P. gingivalis* OMVs in the context of host immune responses.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-122　ワイセラ乳酸菌 W3 株のミュータンスバイオフィルム形成抑制効果

○土居　哲平，毛利　彰太，成瀬　　敦

ロッテ中研　口腔科学研

う蝕は歯面に形成される口腔バイオフィルムによって生じるバイオフィルム感染症である．つまりバイオフィルム形成を抑制することはう蝕を予防する効果的な手段である．近年，一部の乳酸菌の摂取がう蝕や歯周病を予防する可能性について議論されている．我々は乳酸菌の中でも特に Weissella 属乳酸菌が *Streptococcus mutans* バイオフィルムの形成を抑制することを確かめたので，食品由来でより活性の高い Weissella 菌をキムチから探索することにした．さらに，分離された Weissella 菌と *S. mutans* との糖類の代謝の違いからプレバイオティクスの可能性について検討した．市販のキムチを MRS 培地に塗布して乳酸菌を分離し，16S rRNA 遺伝子を塩基配列分析によって乳酸菌種を同定した．Weissella 乳酸菌と同定された 20 菌株をそれぞれ *S. mutans* とともに 0.25％スクロースを含む BHI 培地で 37℃，嫌気条件で 18 時間混合培養し，バイオフィルム形成抑制活性を比較した．半数の 10 株は *S. mutans* バイオフィルム形成抑制効果を示し，抑制率が約 75％と最も活性の高い W3 株を選び出した．W3 株はキシロース存在下でグルコースよりもよく増殖したが，*S. mutans* ではほとんど増殖しなかった．さらに，1％キシロース存在下条件では W3 株の *S. mutans* バイオフィルム形成抑制効果が高まった．Weissella W3 株とキシロースを組み合わせて口腔へ応用することで，ヒト口腔バイオフィルムの形成が抑制されることを期待する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Inhibition effect of Weissella strain W3 on *Streptococcus mutans* biofilm formation

○Doi T，Mouri S，Narise A

Oral Sci Sec, Central Laboratory, LOTTE CO, LTD

Dental caries is defined as an infectious disease caused by the biofilm accumulated on tooth surface. It was effective means of suppressing biofilm formation to prevent dental caries. Recently, it was discussed that supplements of some lactic acid bacteria（LAB）may contribute oral health; dental caries or periodontal disease. Our pilot study found that one of Weissella species had inhibited *S. mutans* biofilm formation than other LAB. Aims of this study were finding the higher active isolation among Weissella in kimchi, and examining the oral prebiotic effect of several sugars. Half of Weissella isolates had the inhibitory effect of biofilm formation, and the strain W3 had 75％ inhibition at biofilm index. Weissella W3 grew more rapidly with xylose than with glucose unlike in case of *S. mutans*. Thereof biofilm formation inhibition activity of Weissella W3 was increased in 1％ xylose. We hope an application of Weissella with xylose to keep oral health.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-123 *Streptococcus mutans* の既成バイオフィルムにおけるモノテルペンアルコールならびにセスキテルペンアルコールの浸透機構の評価

○藤田　真理[1]，長田　和実[2]，宮川　博史[1]，鎌口　有秀[1]，中澤　　太[1]

[1]北医療大　歯　微生物
[2]北医療大　歯　生理

我々はこれまでに植物精油由来テルペノイド terpinen-4-ol（モノテルペンアルコール）が nerolidol（セスキテルペンアルコール）と比較して既成バイオフィルム中の細菌に対して顕著な抗菌効果を示すことを報告し，それらの浸透性を評価するために環境分析などに応用されるヘッドスペース固相マイクロ抽出法（HS-SPME 法）を用いた既成バイオフィルム中における残留テルペノイドを抽出，定量する方法を確立している．本研究では，HS-SPME 方法を応用し，*Streptococcus mutans* の既成バイオフィルムにおけるモノテルペンアルコールとセスキテルペンアルコールの浸透機構の評価をおこなった．
*Streptococcus mutans* Ingbritt 株の既成バイオフィルムをテルペノイドで処理後，PBS で洗浄し，バイオフィルム内に残留したテルペノイド量とその上清中に浸出したテルペノイド量を HS-SPME 法を用いて抽出し，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で分析した．また，処理後の既成バイオフィルムは PBS 中に再懸濁して TY 寒天培地上に播種し，培養後，コロニー数を計測して生菌数を算出した．
処理後の既成バイオフィルムにおいて terpinen-4-ol は nerolidol よりも高い濃度で検出され，その濃度依存的にバイオフィルム中の細菌に対する顕著な抗菌活性が確認された．また，nerolidol は上清における検出濃度が高く，バイオフィルム中に残留する濃度が低いことから，内部には浸透していないことが示唆された．
以上の結果より，バイオフィルムにおける個々のテルペノイドの異なる浸透機構が確認され，今後のバイオフィルムに対する応用においてそれらの機構を検討する必要がある．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evaluation of penetration mechanism of monoterpene alcohol and sesquiterpene alcohol into the preformed biofilm of *Streptococcus mutans*

○Fujita M[1], Osada K[2], Miyakawa H[1], Kamaguchi A[1], Nakazawa F[1]

[1]Dept Oral Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent
[2]Div Physiol, Dept Oral Biol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

We had previously reported that terpinen-4-ol（monoterpene alcohol）derived from plant essential Oil had the superior antibacterial effect on bacterial cells in the preformed biofilm compared with nerolidol（sesquiterpene alcohol）, and established new quantitative measurement method of terpenoids in the preformed biofilm by headspace solid-phase microextraction（HS-SPME）. In this study, we evaluated the penetration mechanism of monoterpene alcohol and sesquiterpene alcohol into the preformed biofilm of *Streptococcus mutans*.
After treatment and washing with PBS, the amounts of terpenoids in the preformed biofilm and in the washing supernatant were quantified with HS-SPME conjunction with a gas chromatograph mass spectrometer. In addition, the total viable counts in the biofilm were examined.
Terpinen-4-ol remaining in the preformed biofilm was detected at higher concentration than the case of nerolidol. Furthermore, remarkable antibacterial activity of terpinen-4-ol against bacteria in the preformed biofilm was shown in a concentration dependent manner. On the other hand, much amount of nerolidol was detected in the washing supernatant compared with terpinen-4-ol. Accordingly, it was suggested that nerolidol may not penetrate into the biofilm.
These results demonstrated that individual terpenoids have different penetration mechanism into the preformed biofilm, and the mechanism should be considered for using terpenoids to preformed biofilm.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-124 Roselle 抽出物のバイオフィルム形成，サイトカイン産生ならびに gingipaon 活性における影響

○Sulistyani Herastuti，藤田　真理，宮川　博史，鎌口　有秀，中澤　　太
北医療大　歯　微生物

## Effect of Roselle calyx extract on biofilm formation, cytokine production and gingipain activity

○Sulistyani H，Fujita M，Miyakawa H，Kamaguchi A，Nakazawa F
Dept Oral Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent

**Purpose**: To investigate the effect of Roselle calyx extract on biofilm formation, IL-6 and IL-8 production and gingipain activity.

**Materials & Methods**: The bacteria used in this study were *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. Roselle calyx extract was prepared by soaking with ethyl alcohol for 24 hour in room temperatur. After centrifugation, the extract was lyophilized. Then the extract was soluble in Phosphate Buffered Saline（PBS）, adjusted the pH and filtered aseptically. The Minimum Inhibitory Concentration（MIC）was determined using micro dilution method and the effect of extract on biofilm formation was determined using a polystyrene micro plate assay. For the effect of extract on cytokine production, KB cells were incubated with *Porphyromonas gingivalis* and extract at various concentrations. After incubation, the supernatants were collected, and then the level of IL-6 and IL-8 were quantified using ELISA kit. The inhibitory effect of extract on Arg- and Lys-gingipain was evaluated by using synthetic subtrates colorimetric assay.

**Results & Conclusion**: Roselle calyx extract showed inhibitory effect on biofilm formation at MIC and sub-MIC levels. The extract inhibited IL-6 and IL-8 production from KB cells induced *Porphyromonas gingivalis* in a dose dependent manner. In addition, the extract inhibited Arg-gingipain and Lys-gingipain activities. These results indicate that Roselle calyx extract would be considered for controlling periodontal diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-125 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素は上皮細胞に対する細胞傷害性を有する

○岡橋　暢夫[1]，中田　匡宣[2]，住友　倫子[2]，桜井　敦朗[3]，桑田　啓貴[4]，川端　重忠[2]

[1]大阪大　院歯　口腔フロンティア
[2]大阪大　院歯　口腔細菌
[3]東歯大　小児
[4]昭和大　歯　口腔微生物

【目的】ミティス群口腔レンサ球菌は，口腔における優勢常在細菌である．これらのレンサ球菌は，抜歯などの際に菌血症や心内膜炎を引き起こすなど，病原細菌としての一面も持ち合わせている．我々は，以前，ミティス群口腔レンサ球菌の産生する過酸化水素がマクロファージに細胞死を誘導することを報告した．ここでは，外敵の侵入から全身を守る防御バリアとして重要な働きをしている上皮細胞に対する細胞傷害性を報告する．
【方法と結果】ヒト上皮細胞株 Detroit 562, Calu-3, HeLa に口腔レンサ球菌を感染させたところ，*Streptococcus oralis* や *S. sanguinis* は全ての細胞株に細胞死を誘導したが，*S. mutans* や *S. salivarius* は影響を与えなかった． *S. oralis* などのミティス群口腔レンサ球菌は過酸化水素を産生するが，この過酸化水素が上皮細胞の細胞死に関与しているのかどうかを調べるため，感染の際に catalase を添加した結果，細胞死の抑制が認められた．さらに，過酸化水素の産生に必須の pyruvate oxidase 遺伝子をノックアウトした *S. oralis* 変異株を作成し，それを Detroit 562 に感染させたところ，親株と比較して細胞毒性が減少していた．また，過酸化水素単独でも同様に細胞死が誘導された．最後に，*S. oralis* の感染が Detroit 562 に対してサイトカイン産生などの炎症応答を促進するかどうかを検討した結果，IL-6, IL-8 及び抗菌ペプチド $\beta$-defensin の産生が誘導されることが分かった．過酸化水素単独でもこれらの炎症メディエーターが産生された．
【結論】ミティス群口腔レンサ球菌は，上皮細胞に細胞死及び炎症メディエーター産生を誘導するが，それには菌が産生する過酸化水素が重要な役割を果たしていると考えられる．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral streptococci

○Okahashi N[1]，Nakata M[2]，Sumitomo T[2]，Sakurai A[3]，Kuwata H[4]，Kawabata S[2]

[1]Cent Frontier Oral Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent
[2]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Pediatric Dent, Tokyo Dent Coll
[4]Dept Oral Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent

Some members of the mitis group of streptococci, such as *Streptococcus oralis* and *S. sanguinis*, are primary colonizers of the human oral cavity. Recently, we found that hydrogen peroxide（$H_2O_2$）produced by *S. oralis* is cytotoxic to human macrophages, suggesting that streptococcus-derived $H_2O_2$ may act as a cytotoxin. Since epithelial cells provide a physical barrier against pathogenic microbes, we investigated their susceptibility to infection by $H_2O_2$-producing streptococci in this study.
Infection by *S. oralis* and *S. sanguinis* was found to stimulate cell death of Detroit 562, Calu-3 and HeLa epithelial cell lines at a multiplicity of infection greater than 100. Catalase, an enzyme that catalyzes the decomposition of $H_2O_2$, inhibited *S. oralis* cytotoxicity, and $H_2O_2$ alone was capable of eliciting epithelial cell death. Moreover, *S. oralis* mutants lacking the *spxB* gene encoding pyruvate oxidase, which are deficient in $H_2O_2$ production, exhibited reduced cytotoxicity toward Detroit 562 epithelial cells. In addition, enzyme-linked immunosorbent assays revealed that both *S. oralis* and $H_2O_2$ induced interleukin-6 production in Detroit 562 epithelial cells.
These results suggest that streptococcal $H_2O_2$ is cytotoxic to epithelial cells, and promotes bacterial evasion of the host defense systems in the oral cavity and upper respiratory tracts.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-126 *Streptococcus gordonii* Hsa とシアロ糖複合糖質との結合には 2 つのアルギニン残基が関与する

○田代有美子，高橋　幸裕，古西　清司

日本歯大　生命歯　微生物

【目的】*Streptococcus gordonii* DL1 の表層タンパク質 Hsa は赤血球の膜タンパク質 glycophorin A や band3，血小板の表層タンパク質 GPIb$\alpha$ に結合する．この結合はこれらの糖タンパク質に存在する $\alpha$2-3 結合のシアル酸末端に Hsa の NR2 領域が結合することで起こる．しかしながら，Hsa の NR2 領域によるシアル酸結合に関する詳細なメカニズムは未だ不明である．そこで本研究では，NR2 領域内のシアル酸との結合に必須なアミノ酸残基の特定を行った．【方法】GST 融合 HsaNR2 タンパク質の NR2 領域内のアルギニン残基をアスパラギン残基に置換した変異体を 7 種作製した．これらの GST 融合タンパク質を用いて赤血球凝集反応，血小板凝集反応，シアル酸結合実験を行った．さらに，上記と同じ部位のアルギニン残基をアスパラギン残基に置換した Hsa をコードする遺伝子をレンサ球菌プラスミドで構築し *S. gordonii* DL1 の *hsa* 欠損株に移入させた株を作製し，赤血球凝集反応，血小板凝集反応，ヒト白血球との結合実験を行った．【結果】作製した変異体のうち R340 と R365 に変異を入れた変異体では赤血球凝集能および，血小板凝集能が欠損していた．また，シアル酸に対する結合能も消失していた．さらに，*S. gordonii* DL1 Hsa 変異株においても赤血球凝集能や血小板凝集能が欠失していただけでなく，ヒト白血球との結合も消失していた．【考察】これらの結果から Hsa とシアル酸との結合には R340 と R365 の 2 つのアルギニン残基が関与していることが考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Two arginine residues of *Streptococcus gordonii* Hsa essential for the binding to sialoglycoconjugates

○Tashiro Y，Takahashi Y，Konishi K

Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Objectives : Hsa is a large serine rich protein of *Streptococcus gordonii* and mediates binding to $\alpha$2-3-linked sialic acid termini of platelet glycoprotein Iba, and erythrocyte membrane protein glycophorin A and band3. The binding interaction appears to be mediated by an NR2 resion of Hsa. However, the molecular details of the interaction between Hsa NR2 region and these glycoproteins are not well understood. In this study, we analyzed the amino-acid residues of Hsa NR2 region involved in sialic-acid recognition. Method : We constructed seven mutants of GST-HsaNR2, each containing a point mutation of an arginine residue. Using these GST fusion proteins, we performed hemagglutination assay, platelet aggregation assay, and sugar binding assay. Furthermore, we established *hsa* mutants of *S. gordonii* DL1 and determined the ability of *S. gordonii* DL1 *hsa* mutants to adhere to human peripheral leukocytes. Results : Two of those mutants R340N and R365N failed to interact with human erythrocytes and platelets. Sugar binding assay showed that these mutants completely eliminated the binding of sialic acids. Conclusion : these results indicate that at least two arginine residues（R340 and R365）of Hsa are involved in the binding to sialoglycoconjugates.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-127 歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛形成における Mfa5 の役割の解析

○長谷川義明[1]，永野　恵司[1]，吉田　康夫[1]，村上　幸孝[2]，吉村　文信[1]

[1]愛院大　歯　微生物
[2]朝日大　歯　口腔微生物

【目的】*Porphyromonas gingivalis* は Mfa1 のポリマーからなる Mfa1 線毛を菌体表面に発現している．Mfa3，Mfa4 および Mfa5 はアクセサリータンパク質として微量に存在している．本研究では，Mfa5 の役割を明らかにすることを目的として，*mfa5* 遺伝子欠損株を作製し，線毛形成に及ぼす影響を検討した．
【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 由来 *fimA* 変異株から *mfa5* 変異株（FMFA5）および *mfa5* 相補株（FMFA5C）を作製した．菌体表面での Mfa1 線毛発現量は抗 Mfa1 線毛抗体を使用した ELISA により評価した．各菌株から，全菌体抽出液（WCL），可溶性（SOL）およびエンベロープ（ENV），内膜（IM）および外膜画分（OM）を調製した．Mfa1 線毛は，イオン交換クロマトグラフィーにより精製した．線毛タンパク質の検出は，ウェスタンブロット法にて行った．
【結果と考察】FMFA5 菌体における Mfa1 線毛の発現量は親株と比較して有意に減少した．また，精製線毛では Mfa5 のみならず Mfa3 および Mfa4 も検出されなかった．親株では成熟型 40-kDa Mfa3 は線毛だけでなく，WCL，SOL，ENV および OM において検出され，未成熟型 43-kDa Mfa3 は IM において検出された．一方，FMFA5 では未成熟型 Mfa3 は WCL，ENV，IM および OM において検出されたが，成熟型 Mfa3 はいずれの画分にも検出されなかった．FMFA5C 菌体での線毛発現量は親株レベルに回復した．また，Mfa3 の成熟化および Mfa3 および Mfa4 の線毛への組込みも確認された．以上の結果から，Mfa5 が，菌体表面への Mfa1 線毛の発現，Mfa3 の成熟化，Mfa3 および Mfa4 の線毛への組込みに関与することが考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A study on role of Mfa5 in biogenesis of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*

○Hasegawa Y[1]，Nagano K[1]，Yoshida Y[1]，Murakami Y[2]，Yoshimura F[1]

[1]Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent
[2]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent

*Porphyromonas gingivalis* expresses Mfa1 fimbriae, which are composed of polymers of Mfa1. The minor accessory components Mfa3, Mfa4 and Mfa5 are incorporated into the Mfa1 fimbrial structure. In this study, we characterized Mfa5 using genetically modified strains. Mfa1 fimbriae expression on the cell surface was determined by ELISA analysis of intact bacterial cells. Whole-cell lysate（WCL）, envelope（ENV）, soluble（SOL）, outer and inner membrane（OM, IM）fractions were prepared. Mfa1 fimbriae were purified by ion exchange chromatography. Then western blot analysis using antisera against fimbrial proteins was performed. Deficiency in the *mfa5* gene decreased, but did not eliminate, expression of Mfa1 fimbriae. Mfa3 and Mfa4 were not incorporated into fimbriae. In WCL from parent strain, Mfa3 was detected as bands of 40 and 43 kDa. The mature 40-kDa form was detected in SOL and ENV. In addition, the unprocessed 43-kDa and mature 40-kDa forms were enriched in IM and OM, respectively. In contrast, the mature 40-kDa Mfa3 was not detected at all in *mfa5* mutant. Notably, complementation of *mfa5* restored expression of structurally intact and functional Mfa1 fimbriae. Taken together, these results indicate that the accessory proteins Mfa5 is crucial to the expression of the proper Mfa1 fimbriae.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-128 感染性心内膜炎由来 *Streptococcus oralis* 308 株の細菌学的解析

○近藤　好夫[1]，佐藤　啓子[2]，今村　圭吾[1]，星野　倫範[1]，中山　浩次[2]，藤原　　卓[1]

[1]長崎大　院医歯薬　小児歯
[2]長崎大　院医歯薬　微生物

感染性心内膜炎（IE）は心内膜に疣贅を形成し，多彩な症状を呈する炎症性疾患である．本疾患の原因菌は口腔由来のビリダンスレンサ球菌があるが，その関与については不明な点が多い．本研究では IE を発症した患児の血液から分離された菌株を用いて病態形成について検討を行った．

患児は 8 歳女児で不明熱の原因精査を目的に当院小児科を受診した．新生児期より心房中隔欠損症と診断されていたが，欠損部が小さく，無治療で経過観察されていた．発熱が 3ヶ月持続し，血液培養でビリダンスレンサ球菌が検出され，心エコーでは三尖弁尖に疣贅を認めたため，Duke 診断基準に従い感染性心内膜炎と診断された．また，本症例では発症前の歯科治療の既往はなかったが，口腔衛生状態は不良であり，日常的生活行動が原因となった菌血症から IE が発症したと考えられた．

分離された本菌株の生化学的性状は *Streptococcus mitis* と類似していたが，位相差顕微鏡を用いた観察では一般的な同菌とは異なり連鎖が短かった．全ゲノム解読を行い，ハウスキーピング遺伝子（*gyrB, dnaK, recA, parE, groEL, rpoE*）を連結した塩基配列を用いて multi-locus sequence typing 法を行った．その結果，本菌は *Streptococcus oralis* であることが示され，本菌を *S. oralis* 308 株と名付けた．すでに全ゲノム配列が公開されている口腔由来の *S. oralis* Uo5 株との dot plot 解析では，両菌株間に顕著な変化はなく，90.8%と高い相同性を示した．一方で *S. oralis* 308 株にはファージなどから由来する外来遺伝子群が存在することも見出された．これらの獲得が本菌の IE に対する病原性に強く関与すると思われ，さらなる解析が必要である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The microbiological analysis of *Streptococcus oralis* strain 308 isolated from infective endocarditis

○Kondo Y[1]，Sato K[2]，Imamura K[1]，Hoshino T[1]，Nakayama K[2]，Fujiwara T[1]

[1]Dept Pediatr Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Div Microbiol and Oral Infct, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Infective endocarditis（IE）is characterized by formation of septic masses of platelets on the surfaces of heart valves and oral viridans streptococci are the major pathogens of IE. In this study, to elucidate the virulence factors, whole genome sequence from a strain of *Streptococcus oralis*, isolated from an 8-year-old girl diagnosed IE, was determined and compared with that of *S. oralis* Uo5 derived from oral cavity. The biochemical properties of the isolated strain were similar to those of *Streptococcus mitis*. However, the cell chain length of the strain was shorter than those of *S. mitis* typical strains in phase-contrast microscope observation. After the whole genome sequence, multi-locus sequence typing of 6 housekeeping genes（*gyrB, dnaK, recA, parE, groEL, rpoE*）revealed that this strain was *S. oralis*, then named *S. oralis* 308. Strain 308 shared high identity（90.8%）in nucleotide sequence with strain Uo5 by the dot plot analysis, showing no prominent change. On the other hand, strain 308 possessed a number of foreign genes derived from genomes of phages and other streptococci. These results suggested that the virulence of the strain would be related with the presence of foreign genes.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-129　黄色ブドウ球菌の牛血清中における病原性因子発現性及び増殖性

○大貝　悠一，小松澤　均

鹿児島大　院医歯　口腔微生物

ヒト常在性細菌のひとつである黄色ブドウ球菌は日和見感染菌であり，時に肺炎や敗血症などの様々な疾患を引き起こす．病院内においては多剤耐性黄色ブドウ球菌による院内感染が大きな問題となっている．我々は黄色ブドウ球菌の生体中における病原性を解析することを目的とし，子ウシ血清(CS)で黄色ブドウ球菌 MW2 株を培養した際の遺伝子発現性解析を行った．その結果，CS で培養した黄色ブドウ球菌は細菌用増殖培地に比べ白血球殺滅毒素，エンテロトキシン，細胞付着因子など多くの病原性因子，鉄獲得性因子及びアミノ酸代謝系因子の発現増加を示した．特に，2 成分制御系因子である Agr 制御下の病原性因子の発現は顕著に増加した．CS 培養で発現増加した因子の多くは鉄を添加した CS 中では発現抑制が認められた．次に，黄色ブドウ球菌 MW2 株のトランスポゾン変異株ライブラリーを用い，CS 中における増殖に影響を及ぼす変異株の同定を行った．結果，二成分制御系因子 ArlR 及び SaeR，アミノ酸生合成因子 Asd，タンパク膜透過チャネル SecDF，機能未知因子 MW0883 の変異株が CS 中において野生株と比較し顕著に低い増殖性を示した．リシン，スレオニン及びメチオニンの生合成経路が阻害される *asd* 変異株においては，CS にスレオニンを添加することにより増殖性が回復した．以上の結果により，黄色ブドウ球菌は哺乳動物内に適応し増殖するために，様々な病原性因子や鉄獲得因子，アミノ酸生合成因子の発現を変動することが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Virulence gene expression and growth of *Staphylococcus aureus* in calf serum

○Oogai Y，Komatsuzawa H

Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci

*Staphylococcus aureus* is one of the commensal bacteria and pathogens in human. To understand the virulence in mammalian host, we investigated genes expression in *S. aureus* MW2 grown in calf serum (CS). We found that *S. aureus* had increased expression of virulence factors, iron acquisition factors and amino acids metabolism factors in CS compared to in bacterial culture medium. The expressions of these many factors were suppressed by addition of iron in CS. Next, we tried the identification of low growth mutant in CS using transposon mutant library. We found five mutants (*saeR*, *arlR*, *asd*, *secDF* and MW0883) showed significantly low growth in CS compared to wild type. Asd is associated with lysine, threonine and methionine biosynthesis from aspartate. The low growth of asd mutant was complemented by addition of threonine in CS. These results suggest that *S. aureus* can adapt to the mammalian host by altering expression of virulence factors, iron acquisition factors and amino acid biosynthesis factor.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-130　緑膿菌 AHL 類似化合物によるビアペネム殺菌効果の増強について

○村上　圭史，弘田　克彦，三宅洋一郎

徳島大　院医歯薬　口腔微生物

緑膿菌マウス感染モデルにおいて，リアルタイム in vivo イメージング解析の結果により，クオラムセンシング機構のシグナル分子であるアシルホモセリンラクトン（AHL）の新規類似化合物がビアペネム（BIPM）の抗菌活性を増強させることが報告されている．そこで本研究では，この化合物の抗菌活性増強のメカニズムを明らかにすることを目的として，in vitro での殺菌試験を行い，BIPM に対し感受性及び耐性の緑膿菌に対する効果を検討した．菌株は緑膿菌 PAO1 株を親株として，*oprD* 遺伝子欠損株を作製した．また，*oprD* 遺伝子に IS 挿入が確認された TUH44 株と，排出ポンプ MexEF-OprN が過剰発現した NfxC-type mutant である TUH81 株の臨床分離株を使用した．殺菌試験では，対数増殖期まで培養した各菌株に，BIPM 単独，もしくは BIPM と新規化合物を同時に作用し培養を続け，経時的に CFU を測定し各時間の生存率を算出した．殺菌試験の結果，PAO1 株において 32 μg/ml の BIPM のみを作用した場合と比較すると，化合物との併用により，24 時間後の生存率が約 1/100 に減少していた．また，*oprD* 欠損株，TUH44 株，TUH81 株を用いて耐性菌に対する殺菌試験を行ったところ，いずれの菌株においても，BIPM（64 μg/ml または 128 μg/ml）単独の場合と比較して化合物を併用することにより生存率が約 1/100 減少していた．以上の結果から，この新規化合物は緑膿菌の BIPM に対する殺菌作用を増強させ，耐性菌に対しても同様の効果を与えることが確認された．これらのことから，この新規化合物は感染症に対する新たな治療法開発に向けてのリード化合物である可能性が示唆された．今後はこのメカニズムについて検討をしていく予定である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## BIPM killing enhancing effect of a *P. aeruginosa* AHL analog compound

○Murakami K，Hirota K，Miyake Y

Dept Oral Microbiol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci

A new compound is the analog of one of Acyl-Homoserine Lactone（AHL）of *P. aeruginosa*. It was reported that the combined use of this compound and biapenem（BIPM）was more effective than the administration of BIPM alone in acute animal infection model. The aim of this study is to investigate the effect of a new compound on antibiotic resistant *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* wildtype PAO1, *oprD* mutant and BIPM resistant clinical isolates were used. BIPM were used for killing test. In the killing test, the cells were incubated in the presence of antibiotics or this compound and the CFU was determined. Combined use of BIPM and this compound decreased BIPM tolerance approximately 100 times compared with BIPM in PAO1. In *oprD* mutant and resistant strains, combined use was more effective than BIPM alone. These results suggest that this effect was seen not only in sensitive strain but also in resistant strains, and that this compound is a potent drug for clinical treatment of infections by antibiotic-resistant bacteria.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-131 *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子変異株の性状解析

○菊池有一郎[1]，柴山　和子[1]，国分　栄仁[1,2]，大原　直也[3]，中山　浩次[4]，石原　和幸[1,2]

[1]東歯大　微生物
[2]東歯大　口科研
[3]岡山大　院医歯薬　口腔微生物
[4]長崎大　院医歯薬　微生物

【目的】細菌の ECF シグマ因子は，菌体外の生活環境変化に応答し，菌体の環境ストレスからの回避に働く．歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* は 6 種の ECF シグマ因子を保有している．ECF シグマ因子の一部については DNA 修復や酸化ストレス物質の消去等について関与するとの報告があるが，その機能については十分に明らかにされていない．我々は本研究にて ATCC 33277 株を親株としたそれぞれの ECF シグマ因子の遺伝子挿入変異株の性状解析を行い，その機能の解明を試みた．
【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 株を親株とし，各 ECF シグマ因子遺伝子内にエリスロマイシン耐性遺伝子カセットが挿入された変異株を homologous recombination により作製した．親株と ECF シグマ因子変異株を用い，ジンジパイン（Rgp, Kgp）活性試験，赤血球凝集活性試験，自己凝集能試験について評価した．
【結果と考察】ジンジパイン活性試験の結果，野生株と比較し PGN_0274 変異株は，Rgp, Kgp 両方とも活性の顕著な減少を認めた．また PGN_0274 変異株は，赤血球凝集活性試験にて凝集能を認めず，自己凝集能試験においても凝集能の顕著な低下が認められた．この現象はジンジパイン活性の低下が原因と考えられる．またそれぞれの変異株についてバイオフィルム形成能を検討したところ，PGN_0274, PGN_0319, PGN_1740 変異株にてバイオフィルム形成の増加を認めたことを前年度の本学会にて報告した．特に PGN_0274 と PGN_1740 変異株は，その増加が顕著であった．以上の結果より，*P. gingivalis* が病原性を発現する際，ECF シグマ因子は重要な役割を果たすことが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization of putative ECF sigma factor mutants of *Porphyromonas gingivalis*

○kikuchi Y[1]，Shibayama K[1]，Kokubu E[1,2]，Ohara N[3]，Nakayama K[4]，Ishihara K[1,2]

[1]Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll
[2]Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll
[3]Dept Oral Microbiol, Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Okayama Univ
[4]Div Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

**Objectives**: *Porphyromonas gingivalis* has been recognized as a major pathogen in the development and progression of chronic periodontitis. To colonize and survive in the gingival crevice, *P. gingivalis* must regulate gene expression in response to the various extracellular changes. Some bacteria utilize sigma factor proteins of the extracytoplasmic function（ECF）subfamily. In this study, we have investigated the ECF sigma factors in *P. gingivalis* ATCC 33277 strain to determine their roles in this bacterium.
**Methods**: ECF sigma factor mutants with the erythromycin resistance gene cassette were constructed by electroporation in *P. gingivalis* ATCC 33277. Gingipain activities（Kgp, Rgp）, hemagglutination activities and autoaggregation activities were measured in the wild-type strain and the ECF sigma factor mutants.
**Results and Conclusions**: Kgp and Rgp activities of the PGN_0274 mutant decreased remarkably compared with the wild-type. In addition, the PGN_0274 mutant showed no hemagglutination activity and much less aggregation. We have already reported that the PGN_0274 and PGN_1740 mutants had increased biofilm formation compared with the wild-type. Taken together, our findings indicated that the ECF sigma factors in play a role in the pathogenicity in *P. gingivalis* ATCC 33277.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-132　イヌ僧帽弁閉鎖不全症における歯周病関連細菌の関与

○渡辺　清子，浜田　信城

神奈川歯科大　微生物感染

【目的】歯周疾患はアテローム性動脈硬化症，冠動脈疾患，脳卒中などを含む全身疾患との関連が示されている．コンパニオンアニマルの歯周炎は発症過程や病態がヒトと同様であると言われており，4歳以上のイヌやネコの約80%が何らかの歯周病変を有している．また，イヌもヒトと同様に僧帽弁閉鎖不全症に罹患することが知られているが，歯周病関連細菌と心臓疾患との関連性についての報告はない．本研究では，イヌ僧帽弁閉鎖不全症の弁置換術中に採取した心臓組織における歯周病関連細菌の検出についてPCR法を用いて検討した．【材料および方法】日本大学動物病院にて僧帽弁置換術を受けたイヌ81匹の左心房，左心室および僧帽弁から心臓サンプルを得た．サンプル中の歯周病関連細菌の検出は，*Porphyromonas gulae* を含む8菌種について，16S rRNA菌種特異的プライマーを用いたPCR法にて検討した．歯周病態の検討は，ポケット深さの測定，出血の有無ならびにペリオチェックによるトリプシン様酵素活性を基準として行った．【結果および考察】PCR法を用いた解析の結果，81匹中46匹の心臓サンプルから *P. gulae*，*Tannerella forsythia*，*Fusobacterium nucleatum* ならびに *Campylobacter rectus* の4菌種の歯周病関連細菌の存在が認められた．心臓サンプルから検出された4菌種は口腔サンプルからも高頻度に検出され，70%以上の被験犬の口腔ではトリプシン様酵素活性が認めらた．さらに，心臓サンプルから歯周病関連細菌が検出された群のトリプシン様酵素活性およびポケット深さは検出されなかった群と比較して有意に上昇していた．以上の結果から，イヌにおいて歯周病関連細菌は細菌性心内膜炎に関係し，僧帽弁閉鎖不全症を引き起こす可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of periodontitis-related bacteria in canine mitral regurgitation

○Watanabe K，Hamada N

Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ

**Objective:** Periodontitis in companion animals is an almost identical disease to that in human. However, relationship between periodontal pathogens and cardiovascular diseases in dogs is unknown. The purpose of this study is to examine the involvement of periodontopathic bacteria in canine mitral regurgitation. **Materials:** A total 81 dogs with mitral regurgitation were referred to the Nihon University Animal Medical Center. The distribution of an animal periodontopathic organism *Porphyromonas gulae*（*P. gulae*）, in addition to 7 human periodontopathic bacteria were examined by polymerase chain reaction（PCR）with species-specific sets of primers. Trypsin-like enzyme activity was evaluated using commercial Periocheck periodontal diagnostic kit. Pocket depth and bleeding on probing were measured as clinical parameters. **Results and conclusion:** PCR analysis identified periodontopathic bacteria in 46/81 study animals. Four species including *P. gulae*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Campylobacter rectus* were detected in dogs heart specimen. Those four bacterial species were highly detected in oral specimens from the same subjects. Trypsin-like enzyme activity in periodontopathic bacteria positive subjects was significantly higher than that in periodontopathic bacteria negative subjects in their heart specimen. These results suggest that periodontopathic bacteria are related to bacteremia and may be contribute the development of cardiovascular diseases in canine.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-133 *Candida albicans* の新規 T 細胞分化誘導抗原の探索

○長　　環，田崎　園子，永尾　潤一，成田　由香，橋本麻利江，田中　芳彦

福歯大　機能生物

*Candida albicans* はヒトの皮膚や粘膜に常在する真菌であるが，宿主の生体防御能の低下に伴い難治性のカンジダ症を起こす日和見感染菌でもある．これまでに表在性カンジダ症における宿主応答は C タイプレクチン受容体の Dectin を介した自然免疫系を中心に研究されてきた．しかし，Conti, H.R.ら（2009）によりインターロイキン（IL）-17 産生を特徴とするヘルパー T 細胞（Th17）欠損マウスにおける口腔カンジダ症の重篤化が報告されて以来，獲得免疫系でのヘルパー T 細胞の役割が注目されている．我々は，本菌を用いて粘膜に常在している微生物が粘膜感染症を引き起こすメカニズムを粘膜免疫の機構にフォーカスして解析を試みている．今回は *C. albicans* を用いて T 細胞の分化に影響する T 細胞受容体を介した抗原性分子の探索を目的とした．

*C. albicans* は環境に依存した酵母形増殖，菌糸形増殖を示す二形性真菌であり，病巣ではこれらの形態が複雑に絡み合ったバイオフィルムを形成することから，実験では酵母形および菌糸形それぞれの菌体を抗原抽出材料とした．菌体の物理的破砕を施した後，超遠心法にて細胞質および膜画分を分離した．細胞壁タンパク質は，薬剤処理により outer wall 画分とマイルドアルカリ感受性画分を調整した．感染防御を誘導する T 細胞の分化誘導能の高い画分は膜および outer wall 画分と示唆された．現在これらの画分から T 細胞受容体を介した抗原の同定を進めており，合わせて報告する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Exploration of novel *Candida albicans* derived antigens recognized by T-cell receptor of $CD4^+$ T cell

○Cho T，Tasaki S，Nagao J，Narita Y，Hashimoto M，Tanaka Y

Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll

*Candida albican*s is a commensal of the oral cavity and the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy individuals. The organism is also a common mucosal and systemic pathogen in the setting of immunosuppression. *C. albican*s is recognized by the C-type lectin receptors including dectin-1 and 2. Conti, H.R. et al (2009) reported that Th17-deficient and IL-17R-deficient mice experiences severe thrush. Therefore, the Th17 cell response could be a major mechanism of mucosal antifungal host defense.

We focus on the mechanism of mucocutaneous immunity to both of *C. albican*s commonly being on the mucosal surfaces and causing disease. Here we report on the methods of exploration of *C. albicans* derived antigens recognized by T-cell receptor of $CD4^+$ T cell.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-134　若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性

○福井佳代子[1]，今井あかね[2,3]，桑島　治博[1]，仲村健二郎[1]

[1]日歯新潟　薬理，[2]日歯新潟　生命歯　生化，[3]日歯新潟　短大

【目的】近年，免疫不全患者の増加に伴い重篤な真菌症が増えており，日和見感染や菌交代症に注意が必要である．今回，若年層健常人における口腔内 *Candida* 属真菌の分離状況と薬剤感受性を検索した．【方法】日本歯科大学新潟生命歯学部 2 年生 101 名の口腔内より，スワブ法にて酵母様 *Candida* 属真菌を採取分離した．分離菌株はゲノム DNA 抽出後，種特異的プライマーによる multiplex PCR を行い *Candida.albicans, C.dubliniensis, C.glabrata, C.krusei, C.parapsilosis, C.guilliermondii, C.tropicalis* の 7 種類に同定した．併せて酵母真菌薬剤感受性キット ASTY を用いて抗真菌薬 7 剤の最小発育阻止濃度（MIC）を調べた．【結果】若年健常人 101 名のうち，25 名（24.8%）から真菌が分離された．分離同定された菌株は *C.albicans, C.dubliniensis, C.parapsilosis,* 未同定株の 4 種類であり，それぞれの割合は 85.2%，7.4%，3.7%，3.7%であった．薬剤感受性において Flucytosin, Fluconazole（FLCZ）, Micafangin, Itraconazole, Voriconazole（VRCZ）に耐性株は認められなかった．VRCZ は ASTY で詳細な結果が得られず，段階希釈プレートで MIC を求めたところ，0.015 μg/mL（中央値）であった．【考察】諸外国の臨床分離株では FLCZ 耐性が増加傾向にあり，日本でも耐性が出現しはじめている．しかし，本実験の若年層健常人分離株から耐性は認めず，FLCZ 耐性の蔓延化は進んでいないと考えられる．VRCZ は分離菌全株で低い MIC となり，若年層健常人の口腔内 *Candida* 属真菌には高い抗真菌活性を有していることが認められた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Survey on oral carriage of genus *Candida* in young healthy students and the antifungal susceptibility of the isolates

○Fukui K[1]，Imai A[2,3]，Kuwashima H[1]，Nakamura K[1]

[1]Dept Pharmacol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata，[2]Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata，[3]Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata

［Introduction］Candidiasis is one of the most frequent and important mycoses in humans. It's important to grasp the carriage of genus *Candida* and the antifungal susceptibility of those for prevention of candidiasis. Therefore we investigated the prevalence of genus *Candida* and tested the antifungal susceptibility of the *Candida* isolates.

［Materials & Methods］Specimens on the tongues of 101 students were collected by swabbing method, and cultured for 48h in Sabouraud agar plate. The resulting yeasts were identified by multiplex PCR. The antifungal susceptibility was tested using a commercially prepared colorimetric microdilution panel（ASTY）.

［Results］Twenty five（24.8%）of 101 subjects were positive for oral yeasts. Two students carried doubly. Of 27 isolates, *Candida albicans, C. dubliniensis, C. parapsilosis* and unidentified strain occupied 23（85.2%）, 2（7.4%）, 1（3.7%）and 1（3.7%）respectively. The isolates were susceptible to the tested drugs. The minimum inhibitory concentration of Voriconazole that showed the strongest activity among them was 0.015 μg/mL（median）.

［Discussion］The development of antifungal resistance in clinical *Candida* isolates is reported both in Japan and the other countries. In contrast, the spread of such antifungal resistance is not observed in *Candida* isolates in this study.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-135 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関与する CoA-transferase に関する研究

○佐藤　満成[1,2]，吉田　康夫[2]，永野　恵司[2]，長谷川義明[2]，武部　　純[1]，吉村　文信[2]

[1]愛院大　歯　有床義歯
[2]愛院大　歯　微生物

【目的】歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* はその培養上清中に多量の短鎖脂肪酸を放出することが報告されている．代表的な短鎖脂肪酸である酪酸は上皮細胞や免疫細胞にアポトーシスを惹起し，歯周病の発症や進行の増悪因子となる事が示唆されている．しかし，同菌における酪酸産生機構は未だ解明されていない．そこで，本研究では *P. gingivalis* の酪酸産生機構解明を目的として，酪酸産生機構に関与する CoA-transferase の機能検討を試みた．【方法】*P. gingivalis ATCC 33277* 株において，腸内細菌の一種である *Roseburia sp.*の CoA transferase と，約 25 から 40%のアミノ酸相同性を示す PGN_0725，PGN_1341 および PGN_1888 タンパク質をコードしている遺伝子を，それぞれエリスロマイシン耐性遺伝子に置換して不活化した．その変異株の培養上清の短鎖脂肪酸濃度を GC/MS にて測定した．また同遺伝子から発現ベクター pGEX6p-1 を用いて組換えタンパク質を精製した．同タンパク質を用い butyryl-CoA と sodium acetate を基質とし，その酵素学的性質を比色法にて検討した．【結果と考察】全ての遺伝子不活化株の培養上清において，野生株と比較して酪酸の濃度が減少した．また，各組換えタンパク質を用い，butyryl-CoA と sodium acetate を基質に酵素反応を行うと，全てのタンパク質において酪酸産生能が確認された．以上の結果から，*P. gingivalis* において，butyryl-CoA から酪酸を産生する反応には *PGN_0725*，*PGN_1341* および *PGN_1888* 遺伝子が関与していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A study on CoA-transferases involving the butyrate produce in *Porphyromonas gingivalis*

○Sato M[1,2]，Yoshida Y[2]，Nagano K[2]，Hasegawa Y[2]，Takebe J[1]，Yoshimura F[2]

[1]Dept Removable Prosthodontics, Aichi Gakuin Univ Sch Dent
[2]Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent

［Purpose］The periodontopathogenic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*, has been reported to release short chain fatty acids（SCFA）into the culture supernatant. Since butyrate induces apoptosis in gingival fibroblasts and immunocytes, the molecule is presumably associated with initiation of periodontitis. However, molecular pathway of butyrate production has not been elucidated. In the current study, we focused on PGN_0725, PGN_1341 and PGN_1888 proteins responsible for the production of butyrate from butyryl-CoA to clarify the mechanism to produce butyrate.［Materials & Methods］We constructed mutant strains lacking *PGN_0725, PGN_1341 or PGN_1888* gene. The GC-MS analysis demonstrated that concentrations of SCFA in supernatants from mutant strains were compared with those from wild type. Purified recombinant PGN_0725, PGN_1341 and PGN_1888 proteins were obtained using pGEX6P-1 vector. GC-MS and colormetric analyses were employed to enzymatically characterize each protein as a butyryl-CoA transferase.［Result & Conclusions］The concentrations of butyrate in the culture supernatant from mutant strains were lower than that of the wild type. It was suggested that PGN_0725, PGN_1341 and PGN_1888 proteins were associated with the butyrate metabolic pathways. Butyrate was detected in the reaction mixture in the presence of each protein, suggesting that those proteins are involved in the butyrate production as a butyryl-CoA transferase.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-136 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関与する Succinyl-CoA 還元酵素の酵素学的解析

○吉田　康夫，佐藤　満成，永野　恵司，長谷川義明，吉村　文信

愛院大　歯　微生物

【目的】*Porphyromonas gingivalis* は多量の短鎖脂肪酸を培養上清中に放出することが報告されている．短鎖脂肪酸の一種である酪酸は口腔組織へ為害作用があることが知られている．重度の歯周病患者の歯周ポケットでは，酪酸の歯肉溝内の濃度が健常人の 10 倍程度増加しており，歯周病のマーカーとしても臨床的に有用であることが示唆されている．しかし，同菌の酪酸の産生機構についての分子生物学的な解明は未だ十分になされていない．本研究では，*P. gingivalis* の酪酸産生機構に関与する分子（Pgn_0723）に着眼し，その分子生物学的な解明を試みた．【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277 株において succinyl-CoA から succinate semialdehyde を産生すると予測されている Pgn_0723 タンパク質をコードしている遺伝子に，エリスロマイシン耐性遺伝子を挿入して不活化した．それらの株の培養上清の短鎖脂肪酸の量を GC/MS にて定量した．また，pGEX6p-1 ベクターを用いて組換えタンパク質を精製して，succinyl-CoA と NADH を基質として，その産生産物を LC-M/MS で定性し，NADH の消費を比色法を用いて酵素学的パラメーターを決定した．さらに，Propionyl semialdehyde dehydrogenase（Protein code 4C3S）を鋳型に立体構造のモデルを作製した．【結果と考察】Pgn_0723 遺伝子の不活化株の培養上清中において，酪酸のみならず，イソ酪酸およびイソ吉草酸も野生株と比較して有意に低下していたが，プロピオン酸の産生は野生株とほぼ同等であった．Pgn_0723 に基質として succinyl-CoA を加えたところ，NADH の消費と succinate semialdehyde および CoA の産生を認めた．Pgn_0723 と 4C3S の比較から，Thr405 から Gly415 の範囲で立体構造が大きく異なることが示唆され，同領域が基質である succinyl-CoA の結合部位であることが示唆された．（会員外共同研究者：　岩手医科大学薬学部　毛塚雄一郎）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Enzymatic characterization of succinyl-CoA reductase associated with biosynthesis of butyrate in *Porphyromonas gingivalis*

○Yoshida Y，Sato M，Nagano K，Hasegawa Y，Yoshimura F

Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent

*Porphyromonas gingivalis* releases a large amounts of short chain fatty acids（SCFA）in the culture supernatant. Butyrate, which is one of SCFA, is known to be toxic to oral tissue. Based on the finding that the concentration of butyrate in periodontal pockets of patients with severe periodontitis was approximately 10 times more than that of healthy subjects, the molecule is suggested to be a possible clinical marker. However, the mechanism for butyrate production in *P. gingivalis* has not been fully elucidated. The gene encoding Pgn_0723, which is annotated as succinate semialdehyde dehydrogenase, was inactivated by insertion of the erm gene. The concentrations of SCFS in the supernatants were quantified using GC-MS. The recombinant protein was obtained using pGEX-6P-1, and enzymatically characterized. The 3D-structure of Pgn_0723 was constructed using propionyl semialdehyde dehydrogenase（Protein code 4C3S）as template. The concentrations of SCFA in the supernatant of the mutant strain were mostly lower than those of the wild type. Incubation of Pgn_0723 with succinyl-CoA and NADH resulted in production of succinate semialdehyde and consumption of NADH. The C-terminal region of Pgn_0723（Thr405-Gly415）might be important for substrate binding, since the 3-D structure of the region was remarkably different between Pgn_0723 and 4C3S.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-137 *Streptococcus mutans* のフッ化物耐性に寄与する chloride channel permease

○村田　貴俊，花田　信弘

鶴見大　歯　探索歯

フッ化物毒性に抵抗するフッ化物輸送体遺伝子の存在が報告された．これら遺伝子産物は細胞外にフッ化物イオンを排出する働きがあり，多くの微生物種に存在する可能性があるという．*Streptococcus mutans* のゲノム検索によると，2つの相同なフッ化物輸送体遺伝子（GenBank locus tag SMU1290c and SMU1289c）がゲノム上に連続して並ぶユニークな配列をしており，その遺伝子産物（chloride channel permease）がフッ化物輸送体の働きをすると予測される．本研究の目的はこの2つの遺伝子が真に *S. mutans* のフッ化物耐性に寄与しているかを確認することである．

*S. mutans* UA159 の SMU1290c 破壊株，SMU1289c 破壊株，SMU1290c・SMU1289c 両破壊株を作製し，フッ化物耐性を野生株と比較した．またフッ化物輸送体遺伝子を破壊した *E.coli* BL21（DE3）派生株に，発現ベクターに組み込んだ SMU1290c または SMU1289c 遺伝子で形質転換を行ない，フッ化物耐性の回復を評価した．

作製したすべての *S. mutans* 遺伝子破壊株のフッ化物耐性は野生株よりも低かった．また，SMU1290c または SMU1289c 遺伝子で形質転換をおこなうと，フッ化物輸送体遺伝子を破壊した *E.coli* のフッ化物耐性を回復することができた．

SMU1290c 遺伝子産物，SMU1289c 遺伝子産物である chloride channel permeases は *S. mutans* のフッ化物耐性に寄与する．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Contribution of chloride channel permeases to fluoride resistance in *Streptococcus mutans*

○Murata T，Hanada N

Dept Translational Res, Tsurumi Univ Sch Dent Med

The genes coding for fluoride transporters were reported in many bacterial and archaeal species. The genome sequence of the cariogenic *Streptococcus mutans* predicts the presence of putative fluoride transporters（called chloride channel permease）. The two homologs of this gene（GenBank locus tag SMU1290c and SMU1289c）reside in tandem in the genome of *S. mutans*. The aim of this study is to demonstrate that the chloride channel permeases contribute to fluoride resistance.

We constructed SMU1290c- and SMU1289c-knockout *S. mutans* UA159. We also constructed the double knockout strain. We transformed SMU1290c or SMU1289c into a fluoride transporter-disrupted *E.coli* BL21（DE3）derivative. We cultured all bacterial strains in appropriate conditions with or without sodium fluoride（NaF）, and evaluated fluoride resistance.

All the three gene-disrupted *S. mutans* strains were less resistant to NaF than wild type. SMU1290c or SMU1289c transformation rescued the fluoride transporter-disrupted *E.coli* from NaF toxicity.

We conclude that chloride channel permeases contribute to fluoride resistance in *S. mutans*.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-138 *Porphyromonas gingivalis* のリポ多糖合成に関わる3つの糖転移酵素遺伝子の発見

○庄子　幹郎[1]，佐藤　啓子[1]，雪竹　英治[1]，鎌口　有秀[2]，内藤真理子[1]，中山　浩次[1]

[1]長崎大　院医歯薬　微生物
[2]北医療大　歯　微生

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* には，O抗原の組成が異なる二つのLPSがあることが知られている．一つは4つの単糖がリピート構造をもつもので，O-LPSと呼ばれている．もう一つは，陰性荷電を側鎖に持つマンノースを主成分とするもののリピート構造で，A-LPSと呼ばれている．本菌の主要な病原性タンパク質が菌体表面に局在する為には，A-LPSの存在が必須であることから，その生合成機構を明らかにすることは重要である．これまで，A-LPSの存在を明らかにする抗体として，mAb 1B5が使用されてきた．最近，我々はO-LPSの存在を明らかにする抗体として，mAb TDC-5-2-1を報告している．既にLPS生合成に関わる遺伝子変異株として，A-LPSのみ欠損している株，もしくは両LPSを欠損している株を得ている．しかしながら，O-LPSのみ欠損している株は得られていない．本研究では，15個の糖転移酵素遺伝子について変異株作製を試み，両LPSの存在の有無を抗体により調べた．【結果】15個の糖転移酵素遺伝子のうち，2個の遺伝子については変異株が得られなかった．PGN_0361遺伝子変異株は，A-LPSのみ欠損していた．PGN_1239遺伝子変異株はA-LPS生合成の部分的減少を示していた．また，PGN_1240遺伝子変異株は両LPSを欠損していた．次に，PGN_0361とPGN_1239はアミノ酸配列に相同性があることから，それらの二重変異株を作製したところ，その変異株は両LPSを欠損していた．【考察】これらの結果より，PGN_1240タンパク質は両LPSの生合成に必須であること，PGN_0361タンパク質はA-LPSの生合成に重要であること，また，PGN_0361とPGN_1239タンパク質はそれぞれが機能的にO-LPSの生合成に関わることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Discovery of three genes encoding glycosyltransferases involved in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide synthesis

○Shoji M[1]，Sato K[1]，Yukitake H[1]，Kamaguchi A[2]，Naito M[1]，Nakayama K[1]

[1]Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci
[2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Objectives: *Porphyromonas gingivalis* has two different lipopolysaccharide（LPS）molecules, designated O-LPS and A-LPS. As A-LPS plays a role in anchorage of virulence proteins on the cell surface, it is important to elucidate the mechanism of A-LPS synthesis. We have constructed mutants of genes relating with LPS biosynthesis and found that some mutants showed deficient in A-LPS or both LPSs, but so far we have not found an O-LPS-deficient and A-LPS-sufficient mutant. In this study, we constructed mutants deficient in genes encoding putative glycosyltransferases and examined the mutants for presence of LPSs. Results: We found that a PGN_0361 gene mutant showed A-LPS-deficient and O-LPS-sufficient, a PGN_1239 gene mutant exhibited the partial aberrancy of A-LPS synthesis and O-LPS-sufficient, and a PGN_1240 gene mutant was deficient in both LPSs. Next, we constructed a double mutant of PGN_0361 and PGN_1239 since there is high similarity in amino acid sequence between the two proteins, and found that the mutant was deficient in both LPSs. Conclusion: These results suggest that PGN_1240 protein is essential for the synthesis of both LPSs, PGN_0361 is necessary for A-LPS synthesis, and PGN_0361 and PGN_1239 proteins functionally compensate each other in O-LPS synthesis.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-139 *Porphyromonas gulae* 41-kDa 線毛の役割

○佐々木　悠，渡辺　清子，古谷田泰徳，浜田　信城

神奈川歯科大　微生物感染

【目的】*Porphyromonas gulae* はイヌの歯肉溝から高頻度に検出される黒色色素産生性偏性嫌気性グラム陰性桿菌である．*P. gulae* は，DNA 相同性および 16S rRNA 遺伝子解析により，2001 年にヒト口腔から分離される慢性歯周炎の原因細菌である *Porphyromonas gingivalis* とは異なる菌種として報告されている．しかし，本菌の歯周病原因子に関する報告は未だ認められない．本研究では，*P. gulae* ATCC 51700 株に存在する 41-kDa 線毛の歯周組織破壊における病原性について検討した．【方法】*P. gulae* 41-kDa 線毛タンパク質は，DEAE-Sepharose CL-6B を用いて陰イオンカラムクロマトグラフィーにより精製した．精製タンパク質による破骨細胞分化誘導は，BALB/c マウス骨髄細胞と破骨細胞分化支持細胞である MC3T3-G2/PA6 の共培養系を用いて行った．また，各種濃度の線毛タンパク質刺激による象牙片を用いた吸収窩形成活性の測定を行った．さらに，サイトカイン産生誘導能については，BALB/c マウス腹腔マクロファージを用いて検討した．実験的歯周炎は Sprague-Dawley 系ラットを用い，*P. gulae* 菌液を口腔内に接種し，歯槽骨吸収量を指標として判定した．【結果】 *P. gulae* 41-kDa 線毛タンパク質は，無刺激コントロールと比較して有意に破骨細胞の誘導と吸収窩形成誘導能が認められた．また，マウス腹腔マクロファージから IL-1$\beta$ および TNF-$\alpha$ の産生が認められた．さらに本菌は，ラット実験的歯周炎モデルにおいて顕著な歯槽骨吸収を惹起した．【考察】*P. gulae* 菌体表層に存在する 41-kDa 線毛は，破骨細胞の誘導と炎症性サイトカインの産生が認められたことから，歯周組織破壊を引き起こす重要な病原因子である事が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Role of *Porphyromonas gulae* 41-kDa Fimbriae

○Sasaki H，Watanabe K，Koyata Y，Hamada N

Dept Microbiol, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ

［Objectives］*Porphyromonas gulae* is considered to be associated with canine periodontitis. We examined the involvement of the 41-kDa fimbrial protein in osteoclast differentiation and cytokine production in murine macrophages. Furthermore, alveolar bone resorption induced by *P. gulae* infection in rats was evaluated.［Methods］To estimate osteoclast differentiation, bone marrow cells and MC3T3-G2/PA6 cells were cultured with or without the 41-kDa fimbrial protein for 7 days. BALB/c mouse peritoneal macrophages were stimulated with the 41-kDa fimbrial protein, and the levels of interleukin（IL）-1$\beta$ and tumor necrosis factor（TNF）-$\alpha$ production were determined by ELISA.［Results］Osteoclast differentiation was significantly enhanced by treatment with the 41-kDa fimbrial protein in a dose-dependent manner. The total area of pits formed on the dentine slices with osteoclasts incubated with the 41-kDa fimbrial protein was significantly greater than that of the control. The purified 41-kDa fimbrial protein induced IL-1$\beta$ and TNF-$\alpha$ production in BALB/c mouse peritoneal macrophages after6 hr of incubation in a dose-dependent manner. The bone loss level in rats infected with *P. gulae* was significantly higher than that of the sham-infected rats.［Conclusion］These results suggest that *P. gulae* 41-kDa fimbriae play important roles in the pathogenesis of periodontal disease.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-140 *A. actinomycetemcomitans* 簡易検出キットの開発と臨床応用

○續橋　治，桑原　紀子，齋藤　真規，瀧澤　智美，小林　良喜，落合　智子

日大松戸歯　微生物免疫

【目的】*A. actinomycetemcomitans*（*A. a*）は，侵襲性歯周炎の主要な病原菌と考えられている．我々は，口腔全体の細菌叢を反映する唾液試料から A.a を検出することが可能な選択培地を開発した．我々は，広く用いられているミュータンス連鎖球菌検出キットである Dentocult SM®と同様な，唾液を試料とし，チェアーサイドで簡易に検査可能で，かつ安価で検出感度と定量性に優れた *A.a* 検出キットの開発を試み，その定量性を検討した．【方法】 我々が開発した *A.a* 選択培地を改良し，その組成による選択液体培地を基に *A.a* を選択的に検出できる検査キットを開発した．細胞培養用プラスチックフラスコに本選択液体培地を注いだものを本 *A.a* 検出キットの試作品とした．慢性歯周炎患者 30 名および歯周健常者 30 名から唾液試料を採取し，本キットを用いて同菌の定量的検出を行なった．同時に従来の選択平板培地による定量的検出およびダイレクト PCR 法による検出結果と比較検討を行なった．これらの結果から本検出キットの有用性を検討した．【結果と考察】選択性は従来の選択培地を改良することにより顕著に目的外菌の発育は抑制された．本検出キットにおける *A.a* の検出者率は，PCR 法および従来の選択平板培地による本菌の検出結果と同様であった．さらに，本検出キットにおける *A.a* 検出菌数と選択平板培地による *A.a* 菌数にも相関が認められたことより，菌数定量も優れていることが確認できた．これらの結果から，本検出キットは唾液試料から *A.a* を定量的に，かつ確実に検出することができ，臨床に応用可能であると推察された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Development of an easy-to-use clinical kit for estimating *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* levels

○Tsuzukibashi O，Kuwahara N，Saito M，Takizawa T，Kobayashi R，Ochiai T

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Purpose: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（*A. a*）is considered a major etiologic bacterium of aggressive periodontitis. Purpose of this study is to develop an inexpensive and applicable clinical kit for estimating *A.a* level in saliva sample, like the Dentocult SM® which is clinical kit for mutans streptococci. Materials & Methods: A clinical kit for estimating *A.a* level was developed using the selective medium broth made from an improved composition of the selective medium agar normally used for the isolation of *A.a*. The prototype of the proposed clinical kit was made by pouring the selective medium broth into a plastic flask for cell cultures. For examination of clinical efficacy, saliva samples were collected from 30 volunteers of periodontally healthy persons and 30 chronic periodontitis patients. The result obtained by using the proposed clinical kit was compared with the results by both PCR method and selective medium agar. Results & Conclusion: The growth of oral bacteria other than *A.a* was markedly inhibited in this proposed clinical kit. Moreover, the result obtained by using the clinical kit was similar to the results obtained by both PCR method and selective medium agar. Thus, since this clinical kit is able to estimate accurately *A.a* level, it will be clinically useful.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-141 *Prevotella intermedia* における菌株間のゲノム比較

○内藤真理子，中山　浩次

長崎大　院医歯薬　微生物

歯周病原菌の一つである *Prevotella intermedia* は慢性歯周炎のみならず妊娠性歯肉炎の患部からも検出される．我々はこれまでに臨床分離株，OMA14 の完全長ゲノム配列を決定した．得られたゲノム配列をこれまでにゲノム配列が解析されている同菌の strain 17 株の完全長ゲノム配列と比較したところ本菌の特徴的なゲノム構造が明らかになった．*P. intermedia* のゲノムは 2 つの環状染色体から成り，第一染色体のゲノム長は株によって違いは見られなかった．しかし第二染色体には顕著なゲノム長の差が認められた．2 株の完全長ゲノム配列からは複数の転移性遺伝因子が見いだされ，それぞれの全ゲノム配列のうち，OMA14 株では 14.6%，strain 17 株では 4.8%を占めていた．またこの転移性遺伝因子の挿入により第二染色体のゲノム長の差がもたらされていることと，大規模なゲノム構造の再構成が起きていることも示唆された．また菌株特異的な遺伝子の多くがこれらの転移性遺伝因子由来であった．2 株から見いだされた転移性遺伝因子のうち intact な 7 種は染色体から切り出されて intermediated form を形成することが確認された．この結果から本菌の転移性遺伝因子に伝達活性がある可能性が示された．また 188 bp からなる新規の反復配列が OMA14 株から 177 個，strain 17 株から 184 個見いだされた．この反復配列は本菌の近縁種のうち，*P. nigrescen*，*P. falsenii*，*P. disiens* からのみ検出されたことから，PINSR, *P. intermedia-nigrescens* group specific repeat.と名付けた．PINSR は本菌とこれらの近縁種のゲノムの特異的検出に役立つと考える．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Fine intra-species genomic comparison in *Prevotella intermedia* strains.

○Naito M，Nakayama K

Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

*Prevotella intermedia* is one of the putative periodontal pathogens. Its whole genome sequence has been determined in strain 17, but not yet fully analyzed. We have determined the whole genome sequence of another clinical strain, OMA14. Here we performed a genomic comparison between those strains to define their characteristic genome structures. The genomes of both strains were comprised of two circular chromosomes; the larger ones were similar in size but the smaller ones showed a significant difference in size. Various mobile genetic elements were found in both strain genomes. They accounted for 14.6% of OMA 14 genome and 4.8% of strain 17 genome, resulting in the size difference of the smaller chromosomes. Furthermore, insertions of those elements might make large genome rearrangements in the smaller chromosome. We also found a novel 188-bp repeat sequence; 177 copies in OMA14 and 184 copies in strain 17. This repeat was found in several *Prevotella* spp. closely related to *P. intermedia*; *P. nigrescens, P. falsenii* and *P. disiens*, which was termed, *P. intermedia-nigrescens* group specific repeat (PINSR). PINSR-specific PCR may be useful to detect of *P. intermedia-nigrescens* group.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-142 非 RI 蛍光試薬による *Porphyromonas gingivalis* のアミノ酸とジペプチドの取り込みの評価

○小早川　健，根本　優子，馬場　友巳，根本　孝幸

長崎大　院医歯薬　口腔生化

*P. gingivalis* はアミノ酸を代謝してエネルギーを産生することから，菌体外ペプチド分解とアミノ酸取り込みは密接に関連していると推定される．我々はこれまで，ジペプチジルペプチダーゼ（DPP）5, DPP11，及びオリゴペプチダーゼ AOP を見出し，ペリプラズム間隙でのジペプチド産生系の全容を明らかにしてきた．本研究ではジペプチドの取り込み・代謝効率の評価方法の確立を目的とした．【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277，及び *dpp4-5-7-11* 欠失株，*E. coli* TG1, *Streptococcus anginosus* NCTC 10713, *S. mutans* ATCC 25175 を前培養し，50 mM HEPES（pH7.4）に懸濁した．菌液に 1-10 mM アミノ酸単体や当量の Gly 含有ジペプチド，オリゴペプチドを添加し，レサズリンを用いて蛍光強度（Em/Ex = 585/550）の経時変化から代謝活性を評価した．【結果】*S. anginosus*，*S. mutans* ではアミノ酸単体，及び種々のジペプチド添加による代謝活性の上昇率に差はなく *E. coli* では，GE, GG でやや高い上昇傾向が観察された．これらに対して，*P. gingivalis* 野生型や DPP 欠損株ではジペプチド（GG, GQ, GS）添加での顕著な上昇が見られたが，この現象は，ジペプチドの構成アミノ酸単体の添加では再現されないことから，*P. gingivalis* がアミノ酸ではなくもっぱらジペプチドを細胞内に取り込むことが判明した．【結論】各種 DPP を発現する *P. gingivalis* の場合，アミノ酸ではなくジペプチドが取り込まれる最終分子であることが示された．また，本評価系を用いることにより，non-RI でのオリゴペプチドトランスポーターの解析が可能となった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evaluation of amino acid and dipeptide uptakes of *Porphyromonas gingivalis* by non-RI assay using redox indicator

○Kobayakawa T，Ohara-Nemoto Y，Baba TT，Nemoto TK

Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Since *P. gingivalis* utilizes amino acids as energy sources, there may be the relationship between the peptide-degrading system at periplasm and amino acid incorporation across the inner membrane. This study aimed to establish a method evaluating the incorporation of dipeptides produced by dipeptidyl peptidases（DPPs）. *P. gingivalis* ATCC 33277, NDP 212（*Δdpp4-5-7-11*）, *Escherichia coli* TG1, *Streptococcus anginosus* NCTC 10713, *S. mutans* ATCC 25175 were suspended in 50 mM HEPES（pH7.4）. Amino acids, Gly-containing dipeptides, and oligopeptides were added to the cell suspensions. After an incubation with resazurin, fluorescence intensity（FI）was measured by a fluoroplate reader（Em/Ex = 585/550）. No significant difference was obtained in the increases in FI on *Streptococcus* species among any kinds of amino acids and dipeptides. FI increase with GE and GG was slightly higher in *E. coli*, In contrast, FI was remarkably increased in *P. gingivalis* incubated with GG, GQ, GS, while FI was not increased with the combination of amino acids constituting the dipeptides. These results indicated that dipeptides produced by DPPs are final entities incorporated into *P. gingivalis*. In addition, this non-RI method can be practically applicable to evaluate oligopeptides transporters in this organism.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-143 *P. gingivalis* ジンジパインによる PI3K/Akt 経路の抑制効果とその意義

○中山　真彰[1]，内藤真理子[2]，中山　浩次[2]，大原　直也[1]

[1]岡山大　院医歯薬　口腔微生物
[2]長崎大　院医歯薬　微生物

*Porphyromonas gingivalis*（*Pg*）の持続感染は，歯周組織に影響を及ぼし，口腔機能の低下を招く．本研究では，細胞の生存・増殖，代謝などに重要な機能を持つ PI3K/Akt 経路へ与える Pg 感染の影響とその作用機序を解析した．Pg を歯肉上皮細胞に感染させ，PI3K と Akt の kinase 活性，Akt 下流因子のリン酸化レベルの変化を in vitro kinase assay, western blotting，免疫蛍光染色によって解析を行なった．また Akt 上流因子 PDK1 の挙動解析を行なうために細胞膜を分画し，PDK1 の局在変化を解析した．次に Pg の病原因子ジンジパインの関与について検討するために，ジンジパイン完全欠損変異株（KDP136 株）を用いた感染実験を行ない，野生株（WT 株）を用いた場合と比較した．*Pg*-WT 株は PI3K と Akt の活性を抑制し，Akt 下流因子のリン酸化レベルを変化させていた．Akt 上流因子 PDK1 は，*Pg*-WT 株の感染により細胞膜に局在しないことが示された．KDP136 株では，PI3K や Akt の抑制，PDK1 の細胞膜局在に変化は認められなかった．一方で，Pg の細胞内侵入と PI3K/Akt の活性抑制や PDK1 の細胞膜局在変化，Akt 下流因子のリン酸化レベルの変化には全く影響しないことが示唆された．従って，*Pg* 感染においてジンジパインが細胞膜タンパク質に影響を与え，PI3K 活性の低下による PDK1 の細胞膜局在に変化を起こし，PDK1/Akt 伝達遮断により Akt 経路撹乱に繋がっていると考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp

○Nakayama M[1]，Naito M[2]，Nakayama K[2]，Ohara N[1]

[1]Dept Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

*Porphyromonas gingivalis*（*P. gingivalis*）is a major pathogen of periodontal diseases, including periodontitis. We have investigated the effect of *P. gingivalis* infection on PI3K/Akt signaling pathway in gingival epithelial cells. Here, we found that live *P. gingivalis*, but not heat-killed *P. gingivalis*, reduced Akt phosphorylation. PI3K, which is upstream of Akt, was also inactivated by *P. gingivalis*. Furthermore, GSK3, mTOR, and Bad, which are downstream proteins in the PI3K/Akt cascade, were also dephosphorylated, a phenomenon consistent with Akt inactivation by *P. gingivalis*. However, these events did not require direct interaction between bacteria and host cells, and *P. gingivalis* invasion into the cells. The use of a gingipain-null *P. gingivalis* mutant（KDP136）revealed that the gingipains were essential for the inactivation of PI3K and Akt. Moreover, PDK1 translocation to the plasma membrane was reduced by WT-*P. gingivalis*, but not KDP136. Therefore, it is likely that PI3K failed to transmit homeostatic extracellular stimuli to intracellular signaling pathways by gingipains. Taken together, our findings indicate that *P. gingivalis* attenuates the PI3K/Akt signaling pathway via the proteolytic effects of gingipains, resulting in the dysregulation of PI3K/Akt-dependent cellular functions and the destruction of epithelial barriers.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-144 歯周ポケットから分離された赤色色素産生性新規 *Propionibacterium* 属菌の解析

○齋藤　真規，桑原　紀子，續橋　　治，小林　良喜，瀧澤　智美，落合　智子

日大松戸歯　微生物免疫

【目的】歯周炎患者の病巣内から歯周病原細菌の分離を行っていた際に得られた赤色でラフ型集落を呈する菌種（SK-1）について報告する．【方法】生化学的解析方法として Rapid ID 32 A および api ZYM を用いて行った．遺伝子解析として 16S rRNA 遺伝子配列を決定し，菌種同定および近縁菌との比較解析を行った．また，DNA 中の GC 含量は UPLC 法を用いて測定した．グルコースの最終代謝産物の検出には HLPC 法を使用した．【結果】SK-1 は Gram 陽性芽胞非形成桿菌であり, 血液平板上での 37℃, 96 時間培養することにより非溶血性で赤色のラフ型集落を形成した．16S rRNA 遺伝子配列の相同性の比較から，もっとも近縁であったのは *Propionibacterium propionicum* であり，相同性は 96.64％であった．16S rRNA 遺伝子を基に作成した系統樹において SK-1 株は *Propionibacterium* 属菌のクラスターに分類され，*P. propionicum* にもっとも近縁と判断された．また，DNA 中の GC 含量は 61.8％であった．グルコースの最終代謝産物でもっとも多量に検出されたのは酢酸であったが，プロピオン酸の検出は少量だった．【結論】以上の結果から，SK-1 株は赤色色素を産生する新しい *Propionibacterium* 属菌であることが示唆された．
本研究は JSPS 科研費 25870768 の助成を一部受けたものです．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization and identification of red-pigmented novel species of genus *Propionibacterium* isolated from periodontal pockets

○Saito M，Kuwahara N，Tsuzukibashi O，Kobayashi R，Takizawa T，Ochiai T

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Background: Unusual rough colony with red pigmentation on blood agar was observed and isolated during our studies on the microbial flora of human periodontal pockets. We describe characterization and identification of this strain（designated as SK-1）. Methods: Biochemical analysis was conducted using the Rapid ID 32 A and Api ZYM systems. To determine the phylogenetic affinity of strain SK-1, 16S rRNA gene was sequenced and subjected to a comparative analysis. The G + C contents of the DNA preparations were determined by UPLC method, while fermentation products were analyzed by HPLC method. Results: SK-1 is Gram-stain-positive, non-spore-forming bacilli. Colonies are red, non-haemolytic after incubation on blood agar at 37℃ for 96 h. The 16S rRNA gene sequence data of SK-1 showed 96.64％ similarity with that of *Propionibacterium propionicum* similarity, phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequence showed that SK-1 was related most closely to *P. propionicum*. In addition, the DNA G + C contents were 61.8 mol％. The fermentation products were mainly acetic acid, but the propionic acid was in small amounts. Conclusion: These results suggest that strain SK-1 is novel strain of genus *Propionibacterium*. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25870768.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-145 *Mycoplasma salivarium* による NLRP3 インフラマソームの活性化

○杉山　正博，佐伯　　歩，長谷部　晃，柴田健一郎

北大　院歯　口腔分子微生

インフラマソームで制御されている炎症性サイトカインである IL-1β は歯周炎の病態形成において重要な役割を果たしている．*Mycoplasma salivarium*（MS）は代表的な口腔マイコプラズマであり，歯周炎や顎関節症との関連性が疑われている．本研究では，MS が樹状細胞ならびにマクロファージに IL-1β の産生を誘導するかどうかを検証した．

MS の生菌あるいは死菌（100℃，5 分）で，XS-106 細胞（A/J マウス由来樹状細胞株），C57BL/6（B6）マウスならびに caspase-1，ASC あるいは NLRP3 を欠損させたマウスより採取した骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ（BMM）を刺激し，産生された IL-1β を ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した．

MS の生菌，死菌共に XS-106 細胞に IL-1β 産生を誘導し，これらの活性は caspase-1 に特異的な siRNA の導入により有意に抑制された．MS は B6 由来 BMM に IL-1β の産生を誘導する活性を示したが，その活性は caspase-1-/-ならびに ASC-/- 由来 BMM に対しては完全に消失し，また，NLRP3-/-由来 BMM に対しは部分的ではあるが有意に阻害された．これらの結果は，本菌が BMM に対して NLRP3 インフラマソームを含むいくつかのインフラマソームを活性化し，IL-1β の産生を誘導することを示唆している．

本研究から，MS が歯周炎の発症ならびに増悪において IL-1β を介した何らかの病因的な役割を果たしていることが推測される．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Activation of NLRP3 inflammasome by *Mycoplasma salivarium*

○Sugiyama M，Saeki A，Hasebe A，Shibata K

Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med

The proinflammatory cytokine IL-1beta is known to play etiological roles in periodontitis. *Mycoplasma salivarium*（MS）, a representative oral mycoplasma, is suggested to be involved in etiology of oral infectious diseases. To initially clarify this, this study determined whether MS induces IL-1beta production by innate immune cells such as dendritic cells or macrophages. Both live and heat-killed cells of MS induced IL-1beta production by XS106 cells（a murine dendritic cell）as well as pyroptosis. The activity was significantly downregulated by silencing of caspase-1. Bone marrow-derived macrophages（BMMs）from wild-type（C57BL/6）and NLRP3-, ASC-, and caspase-deficient mice were examined for IL-1beta production in response to MS. The live cells of MS induced IL-1beta production by BMMs from C57BL/6 mice, but almost completely lost the activity toward BMMs from ASC- and caspase-1-deficient mice. The activity toward BMMs from NLRP3-deficient mice were significantly but not completely attenuated. These results suggest that live cells of MS can activate several types of inflammasomes including the NLRP3 inflammasome. Taken together, MS is considered to play some etiological role in the onset and/or progression of periodontitis through induction of IL-1beta production by dendritic cells or macrophages.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-146　肺炎球菌による宿主細胞の細胞死誘導能の解析

○土門　久哲[1]，坂上　雄樹[1]，小田　真隆[1]，山口　雅也[2]，川端　重忠[2]，寺尾　　豊[1]

[1]新潟大　院医歯　微生物
[2]大阪大　院歯　口腔細菌

【目的】肺炎球菌感染に起因する肺炎が重症化すると，多量に遊走した好中球からエラスターゼが放出され，肺組織が傷害を受けると推察されている．しかしながら，そのメカニズムは十分に解明されていない．本研究では，肺炎球菌の病原因子である自己融解酵素 autolysin と菌体内毒素 pneumolysin に着目し，宿主細胞に対する細胞死誘導能について解析した．【方法】*Streptococcus pneumoniae* D39 株（肺炎球菌野生株）もしくは *lytA* 欠失株を培養し，上清を採取した．別途 *lytA* 欠失株を autolysin にて融解した後，上清を採取した．それぞれの上清を，ヒト単球系細胞株 THP-1 培養系に添加し，細胞毒性試験を行った．また，上清中の pneumolysin 遊離量を Western blot 法にて調べた．次に，ヒト肺胞上皮細胞株 A549，THP-1，およびヒト好中球に対する pneumolysin の細胞毒性試験を行った．その際，好中球から放出されるエラスターゼ活性も測定した．【結果】*lytA* 欠失株の培養上清は，THP-1 に対し細胞毒性を示さなかったが，野生株および autolysin 処理 *lytA* 欠失株の上清は細胞毒性を示すとともに，上清中の pneumolysin 遊離量は増加していた．Pneumolysin は THP-1 と好中球に強い細胞毒性を示したが，A549 に対してはわずかであった．また，pneumolysin を添加した好中球の培養上清中のエラスターゼ活性は上昇した．【考察と結論】肺炎球菌は，自己融解酵素の働きで pneumolysin を放出し，免疫細胞を傷害することが判明した．好中球エラスターゼは肺胞上皮細胞にアポトーシスを誘導することが報告されており，傷害された好中球より放出されたエラスターゼと pneumolysin が複合的に作用して肺組織傷害を引き起こす可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analysis of pneumococcus-induced cell death

○Domon H[1]，Sakaue Y[1]，Oda M[1]，Yamaguchi M[2]，Kawabata S[2]，Terao Y[1]

[1]Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent

Objectives: *Streptococcus pneumoniae* is a Gram-positive bacterium that is a leading cause of bacterial pneumonia. It was suggested that excessively activated neutrophils release proteinases such as elastase that contribute to lung injury in severe pneumonia. However, underlying mechanisms are not fully understood. In this study, we investigated the effects of pneumococcal autolysin and pneumolysin against alveolar epithelial cells and neutrophils. Methods: A549 lung epithelial cells, THP-1 monocytes, and human neutrophils were exposed to heat-killed *S. pneumoniae*, pneumococcal supernatant, autolysin, and pneumolysin for various time period and cytotoxicity were evaluated by LDH assay. In addition, elastase activity are evaluated in the culture supernatant of neutrophils exposed to these stimuli. Results and discussion: Heat-killed *S. pneumoniae* and autolysin had no cytotoxicity against A549 cells, THP-1 cells, and neutrophils. However, supernatant of autolysin-treated *S. pneumoniae* induced cytotoxicity in THP-1. Pneumolysin and pneumococcal supernatant induced greater cytotoxicity in THP-1 and neutrophils compared with A549 cells. Although pneumolysin and pneumococcal supernatant did not up-regulate elastase mRNA expression, these stimuli enhanced elastase activity in neutrophil culture supernatant. These findings suggest that *S. pneumoniae* induce neutrophil elastase via neutrophil cell death caused by pneumococcal autolysis and subsequent release of pneumolysin and may trigger neutrophil elastase-dependent lung injury.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-147　病原タンパク質分泌に関わる細胞内品質管理プロテアーゼ HtrA について

○佐藤　啓子[1]，近藤　好夫[2]，今村　圭吾[2]，内藤真理子[1]，中山　浩次[1]

[1]長崎大　院医歯薬　微生物
[2]長崎大　院医歯薬　小児歯

*Porphyromonas gingivalis*　は最も代表的な歯周病細菌であり，様々な病原因子を持つ．なかでも，菌体表面，菌体外に存在する強力なプロテアーゼであるジンジパインは自身も病原因子となるだけでなく，そのプロテアーゼ活性でもって，本菌の持つ凝集素，線毛などの他の病原因子の成熟にも関わる．ジンジパインを含めた多くの病原タンパク質が 9 型分泌機構（T9SS）を介して菌体表層および菌体外に分泌されている．ジンジパインにはペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain（RgpA, RgpB）と Lys-gingipain（Kgp）があり，いずれの遺伝子上にもシグナルペプチド領域，プロ配列領域，プロテアーゼドメイン，Ig-like domain，C 末端領域（CTD）がコードされている．Ig-like domain 欠失変異型ジンジパインは菌体外に分泌されることなく，菌体内で細胞品質管理プロテアーゼ HtrA（HtrA プロテアーゼは正常に折りたたまれたタンパク質には分解活性を示さないが，誤って折りたたまれたタンパク質には分解活性を示す）によって分解されたことから，T9SS で輸送される分泌タンパク質の品質管理に HtrA が関わっていることが示唆された．一方，T9SS 構成因子である PorK, L, M, N の欠損株では，分泌タンパク質がプロ型のまま菌体内に蓄積することがわかっている．この T9SS 構成因子欠損株では HtrA タンパク質の発現量が上昇していた．これらのことから，異常タンパク質が菌体内に蓄積することにより，HtrA を含めたストレス応答因子が働いていることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## HtrA protease involved in protein quality control of the type IX secretion system（T9SS）

○Sato K[1]，Kondo Y[2]，Imamura K[2]，Naito Ma[1]，Nakayama Ko[1]

[1]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Bio Sci
[2]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

The Gram-negative bacterium *Porphyromonas gingivalis*, a major pathogen causing periodontal disease, possesses a number of virulence factors, including fimbriae, hemagglutinins, and proteinases. Highly active extracellular and surface proteinases named gingipains（Kgp, RgpA and RgpB）are of particular importance because they have the capacity to mature these virulence factors. Many of cell surface proteins including gingipains secreted through the type IX secretion system（T9SS）. The *kgp*, *rgpA* and *rgpB* genes encode polyproteins that consist of a signal peptide, a propeptide, proteinase domains, an immunoglobulin（Ig）-like domain, and a C-terminal domain. Gingipains lacking the Ig-like domain were degraded in the cell by HtrA protease（HtrA protease degrades misfolded proteins but not the correctly folded proteins）. In T9SS-deficient mutants, gingipain proproteins accumulate in the periplasmic space, and no extracellular or cell surface gingipain activity is detected. More amount of HtrA protein was detected in the T9SS-deficient mutants than in T9SS-proficient strains. Three results suggested that HtrA functions as a protease for protein quality control in the T9SS by degrading misfolded forms of T9SS-dependent secretory proteins.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-148 次世代シークエンスを用いた口腔ケア剤使用時における健康高齢者口腔細菌数の網羅的解析

○田村　宗明[1,2]，阿部　和正[1]，大屋　　学[1,3]，関　　啓介[1,3,4]，落合　邦康[1,2]

[1]日本大　歯　細菌，[2]日本大　総歯研　生体防御，[3]日本大　歯　口腔健康科学，[4]日本大　歯　総合歯

【目的】近年，高齢者の増加に伴い口腔環境の維持・改善は全身疾患予防の点からも極めて重要課題となっている．演者らは，要介護高齢者の口腔環境改善目的で口腔病原性菌に抗菌効果を示すが，口腔の正常環境維持に重要なレンサ球菌には影響を与えないカテキン含有ジェル（カテキンジェル）を開発し，臨床応用への道を開いた．今回，健康高齢者を対象にカテキンジェルの口腔内塗布が口腔細菌数に及ぼす影響についてより詳細な検討を行った．【方法】介護予防教室（川口市）に参加，実験内容に賛同を得た高齢者 69 名（平均年齢 76.4 歳）に，プラセボもしくはカテキンジェルを 1 日 3 回，4 週間の口腔内塗布を実施した．塗布前と 4 週間後に唾液を採取し，抽出した DNA を試料として次世代シーケンサ解析を行った．その解析結果より，特異プライマーを用いて総レンサ球菌数，Red complex の *P. gingivalis*，*T. forsythia*，*T. denticola* の 3 菌種およびカンジダ菌数について Real-time PCR 法にて解析した．なお，本研究は日本大学歯学部倫理委員会より審査・承認を受けている．【結果および考察】次世代シーケンス解析の結果，カテキンジェル塗布は口腔のレンサ球菌属に影響を与えなかった．一方，口腔内で病原性を発揮する数菌属の比率減少が見られ，Real-time PCR 法にて当該菌種解析を行ったところ，Red complex の 3 菌株およびカンジダ菌数は有意に減少していた．しかし，同様にレンサ球菌群の菌数への影響は認められなかった．カテキンジェルは高齢者の口腔細菌叢のコントロールと口腔環境維持に有効であると共に長期使用の使用が可能であると思われる．今後，このジェルの影響についてより詳細に網羅的な解析を進めるとともにメタボローム解析等も実施する予定である．（実験協力者：デンタルサポート株式会社歯科事業部口腔ケア課；仁後真記子・城　明妙・柳橋巳智子・新居直実，川口市介護保険課；小澤賢二・岩渕里栄）
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Exhaustive analyse of the number of oral bacterial strains found among heaothy elderly treated with catechin gel : Next generation sequencing approach

○Tamura M[1,2]，Abe K[1]，Ohya M[1,3]，Seki K[1,3,4]，Ochiai K[1,2]

[1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent，[2]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent，[3]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent，[4]Dept Compre Dent Clin Edu, Nihon Univ Sch Dent

We developed a gel-entrapped catechin（GEC）which is compounded from a mixture of different types of catechins that has both anti-bacterial and anti-fungal activities. Throughout the study, we examined the antimicrobial action of GEC against oral microorganisms found in healthy elderly individuals. Either GEC or placebo gel was applied along the oral cavity 3 times a day for 4 weeks. DNA was extracted from collected saliva. At first, the analysis of next generation sequencing was performed. Afterwards, microbial number of red complex group including *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* , *Candida albicans* and oral *Streptococcus* spp. were computed through real-time PCR. In the new generation sequensing analysis, treatment of GEC had no effect on *Streptococcus*, but reduced the rate of some pathogenic bacteria. In the real-time PCR analysis, the number of red complex and *C. albicans* were significantly decreased attributed to GEC application. No significant differences were observed in total number of bacteria and oral *Streptococcus* spp. in both applications. The present study demonstrates that antimicrobial action of GEC and its potential use in controling the number of oral pathogenic microorganisms found amoung healthy elderly.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-149 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 血清型 g のゲノム解析

○桑原　紀子，齋藤　真規，續橋　　治，瀧澤　智美，小林　良喜，落合　智子

日大松戸歯　微生物免疫

【目的】*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は侵襲性歯周炎の主要な病原性細菌の一つであり，6 血清型（a-f）に分類されている．当研究室において歯周ポケットから分離された *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 株は新規な血清型 g を有していた．今回，病原性が高いとされている血清型 b の *A. actinomycetemcomitans* HK1651 と比較解析を行うことを目的に *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 株の全ゲノム配列を決定した．

【方法】NUM4039 株のゲノム配列は GS-FLX system（Roche 社製）を用いてパイロシークエンスを行った．得られたデータをアセンブルし，contig を構築した．Primer walking 法によりゲノム配列を取得し，DDBJ MiGap による遺伝子予測アノテーションを行った．*A. actinomycetemcomitans* HK1651（ATCC 700586）株の配列とデータは GenBank より取得した．

【結果】NUM4039 株のゲノムをパイロシークエンスした結果，44 個の contig を構築することが出来た．取得したゲノムは 1 本の環状で，そのサイズは 2.839 Mb であり HK1651 株の 2.105 Mb より長かった．MiGap アノテーションの結果，GC 含量は 44.34%，23 個の CDS が予測された．また 6 コピーの rrn オペロンに 19 個の rRNA，55 個の tRNA がコードされていた．NUM4039 株と HK1651 株を比較解析したところ，頻繁なゲノム再構成が認められた．*A. actinomycetemcomitans* の主要な病原因子である leucotoxin 遺伝子は遺伝子構造，構成とも保存されていたが，プロモータ領域の解析の結果，ロイコトキシン低産生株型を示していた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Genome analyses of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype g

○Kuwahara N，Saito M，Tsuzukibashi O，Takizawa T，Kobayashi R，Ochiai T

Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo

Objective:*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is an important periodontal pathogen. *A. actinomycetemcomitans* NUM4039 strain was isolated from human periodontal pockets as a new serotype g. In this study, we have determined the whole NUM4039 genome sequence in order to compare that of *A. actinomycetemcomitans* HK1651 serotype b strain.

Methods: Whole genome NUM4039 sequencing was determined using a combined strategy of 454 pyrosequencing and primer walking. A total of 283,910 reads were assembled into one large scaffold including 44 large contigs. Gap closing was performed by sequencing the PCR products. The genome sequence was automatically annotated with the DDBJ Microbial Genome annotation Pipeline.

Results: Complete genome sequence of the NUM4039 consists of a single circular chromosome of 2.38 Mbp in length, with a GC content of 44.34%. A total of 2,364 CDS, 55 tRNAs, 19 rRNAs, 3 CRISPERs, and 6 predicted prophage elements were identified in the NUM4039 genome. Whole genome sequence alignment analysis revealed that extensive genomic rearrangements have taken place between NUM4039 and HK1651. Moreover, *ltx* gene, which is an important pathogenetic factor gene of *A. actinomycetemcomitans* encoding leukotoxin, was maintained in the NUM4039 genome. However promoter region analysis of *ltx* genes indicated that NUM4039 belonged to the low leukotoxicity group.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-150 *Streptococcus criceti* OMZ 61 株の遺伝子変異 A2059G 23S rRNA と G439A *rplC*

○田村　晴希，山田ありさ，加藤　裕久

岩医大　歯　薬理

【目的】*Streptococcus criceti* OMZ 61 株のエリスロマイシン耐性に関わる因子を同定するために，本研究では 23S rRNA 遺伝子とリボソームタンパク質 L3 と L4 の遺伝子 *rplC*，*rplD* の塩基配列の解析を目的とした．

【方法】*S. criceti* 4 菌株（HS-6 株，HS-1 株，E49 株および OMZ 61 株）を用いて，薬剤感受性試験，DNA ハイブリダイゼーション，塩基配列の解析および PCR-RFLP を行った．

【結果と考察】 OMZ 61 株はアジスロマイシン，ジョサマイシおよびクリンダマイシンに耐性を示した．23S rRNA 遺伝子プローブにより検出されたバンドのパターンが，制限酵素二重消化の場合に限り，OMZ 61 株で異なった．塩基配列の解析結果から，23S rRNA 遺伝子の A2059G 変異と *rplC* 遺伝子の G439A 変異が OMZ 61 株で認められた．しかしながら，*rplD* 遺伝子には変異が認められなかった．塩基配列と *Bbs*I を用いた PCR-RFLP の解析から，OMZ 61 株の 23S rRNA 遺伝子に A2059G 変異があることがわかった. この部位の塩基は細菌ではアデニンと保存されており，グアニンへの変異により，エリスロマイシン耐性を示す報告が他の細菌で知られている．これらの結果から，OMZ 61 株の薬剤耐性は 23S rRNA と *rplC* 遺伝子の変異の関与が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A2059G 23S rRNA and G439A *rplC* gene mutations in *Streptococcus criceti* strain OMZ 61

○Tamura H，Yamada A，Kato H

Div Bioregulatory Pharmacol, Dep Pharmacol, Iwate Med Univ

**Purpose** As *Streptococcus criceti* strain OMZ 61 has been identified to be resistant to erythromycin, we aimed to analyze nucleotide sequences of 23S rRNA gene and *rplC* and *rplD* genes for L3 and L4 proteins, respectively.

**Materials & Methods** Antimicrobial susceptibility testing, DNA hybridization and nucleotide sequence analyses and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis（PCR-RFLP）were performed using four *S. criceti* strains including strain OMZ 61.

**Results & Conclusion** Strain OMZ 61 showed resistance to azithromycin, josamycin and clindamycin. DNA hybridization analysis of the 23S rRNA genes revealed that, with the double digestions, the hybridization patterns in strain OMZ 61 differed from those in the other three strains. Nucleotide sequence analysis indicated that strain OMZ 61 contained an A-to-G substitution at nucleotide position 2059 in a 23S rRNA gene and a G-to-A substitution at nucleotide position 439 in the *rplC* gene, whereas no mutation in the *rplD* gene was found. DNA sequencing and PCR-RFLP analysis showed the A2059G mutation in 23S rRNA genes in strain OMZ 61. These findings suggest that the resistance to the drugs in strain OMZ 61 might be conferred by the alterations in 23S rRNA and ribosomal protein L3.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-151　歯学部学生における喫煙者と非喫煙者の口腔内細菌叢の比較

○中野　善夫[1]，谷口　奈央[2]，米田　雅裕[3]，廣藤　卓雄[3]，桑田　文幸[1]，埴岡　　隆[2]

[1]日本大　歯　化
[2]福歯大　口腔保健
[3]福歯大　総合歯

【目的】近年，喫煙は歯肉溝細菌叢に影響を与えることが報告された．本研究では，喫煙が唾液と舌苔の細菌叢に与える影響を，臨床的に健康な口腔内環境を持つ被験者を対象として調べた．【方法】本研究は福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理審査委員会の承認を得て実施した（第 249 号）．福岡歯科大学口腔歯学部 6 年生 50 名を対象とし，安静時唾液と舌苔を回収した（喫煙者 18 名，非喫煙者 32 名）．抽出した細菌 DNA から 16S rRNA 遺伝子を PCR によって増幅し，高速シーケンス解析法によって唾液サンプルで 2058 万リード数（約 3.1 億塩基），舌苔サンプルで 1990 万リード数（約 3.0 億塩基）の配列を得た．OTU 解析後，口腔内細菌 16S rRNA 塩基配列データベースを用いて相同性検索を行い，菌叢解析を行った．【結果と考察】唾液において，構成する菌種の数は非喫煙群に比べて喫煙群で多かったが有意差はなかった．喫煙群は *Treponema* 属と *Selenomonas* 属の割合が高く，*Capnocytophaga* 属と *Cardiobacterium* 属の割合が低かった．*Treponema* 属と *Selenomonas* 属は，歯周炎など病的状態で多く分離されるグラム陰性の運動性桿菌である．舌苔において，構成する菌種の数は喫煙群と非喫煙群で変わらなかった．喫煙群は *Dialister* 属，*Atopobium* 属などの割合が高く，*Haemophilus* 属，*Gemella* 属，*Peptostreptococcus* 属などの割合が低かった．*Dialister* 属や *Peptostreptococcus* 属は歯周病との関連が示唆されている．また *Atopobium* 属は口臭患者の唾液に高い割合で存在する．【結論】喫煙は唾液や舌苔の細菌構成に影響を与えていた．喫煙者では口腔内の病的状態と関係する菌種が高い割合でみられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Comparison of oral microbiota between smokers and non-smokers in dental students

○Nakano Y[1]，Taniguchi N[2]，Yoneda M[3]，Hirofuji T[3]，Kuwata F[1]，Hanioka T[2]

[1]Dept Chem, Nihon Univ Sch Dent
[2]Dept Preventive Public Health Dent, Fukuoka Dent Coll
[3]Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll

Recent studies reported that smoking affects microbiota in subgingival sites. In this study, the effects of smoking on salivary and tongue microbiota have been examined. Study populations were fifty healthy volunteers including 18 smokers and 32 non-smokers, and their resting saliva and tongue coating were collected. Bacterial 16S rRNA genes were amplified from the samples, and their nucleotide sequences were determined using barcoded pyrosequencing analysis. The diversity of the microbiota was not significantly different between smokers and non-smokers. Concerning salivary samples, the proportions of Treponema sp. and Selenomonas sp. in smokers were significantly higher than those in non-smokers. Those bacteria are recognized as Gram-negative motile rods that are detected often in periodontitis. The proportions of Capnocytophaga sp. and Cardiobacterium sp. were significantly lower in smokers. Concerning tongue samples, the proportions of Dialister sp. and Atopobium sp. in smokers were significantly higher than those in non-smokers, whereas those of Haemophilus sp., Gemella sp. and Peptostreptococcus sp. were significantly lower in smokers. Dialister sp. and Peptostreptococcus sp. are considered as periodontopathic bacteria. Atopobium sp. is detected in patients with oral malodor. In conclusion, smoking affects salivary and tongue microbiota, and the proportions of some pathogenic bacteria were higher in smokers.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-152 歯周病原菌代謝産物・酪酸が PC12 細胞のデスレセプターシグナリングに及ぼす影響

○関　啓介[1,2]，神尾　宣昌[3,4]，Cueno Marni[3]，田村　宗明[3,4]，紙本　篤[2]，落合　邦康[3,4]

[1]日本大　歯　口腔機能科学
[2]日本大　歯　総合歯
[3]日本大　歯　細菌
[4]日本大　歯　生体防御

【目的】歯周病原菌の主要代謝産物である酪酸は，免疫担当細胞にアポトーシスを誘導するとともにミトコンドリアや細胞質に酸化ストレスを発生させることが報告されている．われわれはラット副腎髄質褐色細胞腫細胞の PC12 を供試し，酪酸誘導性のアポトーシスについて報告した．しかし，酪酸が PC12 細胞のデスレセプターシグナリングに及ぼす影響の検討については報告されていない．今回，演者らはデスレセプターのうち TWEAK（TNF-like weak inducer of apoptosis）と TRAIL（TNF-related apoptosis- inducing ligand）に着目し，これらレセプターに及ぼす酪酸の影響について検討した．【方法】PC12 細胞は NGF（Nerve Growth Factor）にて処理し，種々の酪酸濃度下（0, 0.5, 1.0, 5.0 mM）にて培養した．培養後，回収した上清中の TWEAK 量および TRAIL 量を ELISA 法で定量した．一方，PC12 細胞質中の Caspase8 活性および Caspase10 活性は Kit を用いて定量した．それぞれの分析結果は Student's t 検定により危険率 5 もしくは 1 %（$p<0.05$; $p<0.01$）にて統計処理を行った．【結果および考察】培養上清中の TWEAK 量および TRAIL 量は低濃度の酪酸存在下で共に増加した．しかし，TWEAK 量は酪酸濃度依存的に減少したが，TRAIL 量では濃度依存的な増加が認められた．細胞基質中の Caspase8 活性は高濃度の酪酸存在下（1.0 と 5.0 mM）でコントロールと比較して有意的に増加（$p<0.05$）が見られたが，低濃度（0.5 mM）では影響しなかった．一方，Caspase10 活性ではどの濃度でもコントロールと有意差が見られず，酪酸による影響を受けないことが示唆された．これらの結果から，TRAIL および TWEAK は酪酸誘導性の初期デスレセプターシグナリングとして関与してしないものと考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Butyric acid induce TWEAK and TRAIL signaling in NGF treated PC12 neuronal cell

○Seki K[1,2]，Kamio N[3,4]，Cueno M[3]，Tamura M[3,4]，Kamimoto A[2]，Ochiai K[3,4]

[1]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent
[2]Dept Compre Dent Clin Educ, Nihon Univ Sch Dent
[3]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent
[4]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent

Butyric acid（BA）, an extracellular periodontopathic metabolite, induce apoptosis in immune cell and oxidative stress in both mitochondria and cytoplasm. We have reported that BA induce apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells. However, the death receptor signaling pathway utilized by BA was never determined. Here, we incubated NGF- treated PC12 cells to varying BA concentrations［0（control）, 0.5, 1.0, 5.0 mM］. We measured TWEAK（TNF-like weak inducer of apoptosis）and TRAIL（TNF-related apoptosis-inducing ligand）in the culture medium, while CASP8 and CASP10 were quantified in the cytosol. We found that TRAIL amount were increased dose-dependently in the presence of BA, whereas, TWEAK levels were decreased dose-dependently. Moreover, we observed that CASP10 concentrations were unaffected, while CASP8 levels were increased in 1.0 and 5.0 mM BA concentration. This would imply that BA related dose-dependent effects in TWEAK and TRAIL does not affect CASP10 activity. Similarly, BA-related dose-dependent decrease in TWEAK amounts is inconsistent with increased CASP8 activity attributable to with BA concentration, which suggest that TWEAK is not a BA-related DCR signal. However, considering TRAIL levels were increased similar to CASP8 activity, we suspect that TRAIL is utilized by BA for DCR signaling, however, only at high BA concentrations.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-153 FRET バイオセンサーを用いた時計タンパク質 BMAL1- CLOCK 二量体形成および細胞内局在の解析

○西出　真也

北大　院歯

唾液分泌や睡眠覚醒など多くの生理機能は約 24 時間周期の概日リズムを示す．全身に存在する細胞はそれぞれ自律的に振動する能力を持ち，細胞間でリズムが機能的に統合されることにより個体として同調したリズムを示す．細胞の概日リズムは複数の時計遺伝子の周期的な転写，翻訳，翻訳後修飾により形成され，他の生理機能を持つ分子を 24 時間周期で制御する．哺乳類において転写因子 BMAL1- CLOCK 二量体は時計遺伝子や他の遺伝子の発現を 24 時間周期で促進することが知られているが，BMAL1 および CLOCK がいつ，細胞内のどこで，どのようにして二量体を形成し活性化するのか詳細は不明である．FRET（Förster resonance energy transfer）は波長の異なる二種の蛍光タンパク質が近接した際に起こる分子間のエネルギー移動であり，この現象を利用して分子間の相互作用や三次元構造の変化を波長の変化として検出することができる．本研究では BMAL1, CLOCK タンパク質にそれぞれ蛍光タンパク質を結合し細胞内局在を生きた細胞において可視化するとともに，その二量体形成を FRET バイオセンサーを利用して解析した．また，BMAL1 および CLOCK タンパク質のこれまで知られていなかった細胞内局在が観察されたので合わせて報告する．本研究は大場雄介（北海道大学大学院医学研究科・細胞生理学分野，以下同じ），南保明日香，藤岡容一朗との共同研究である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Circadian profiling of a dimerization of BMAL1 and CLOCK and their subcellular localization by a FRET biosensor

○Nishide S

Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med

A circadian rhythm is a crucial factor in the regulation of a wide range of physiological processes that are involved in biological systems such as the salivary secretion and the sleep-wake cycle. The systemic circadian system can be broken down into cellular rhythms, which are maintained by periodic change in the status of a set of clock genes and proteins. Such proteins oscillate not only at the levels of their expression but also at those of posttranslational modification. FRET（Förster resonance energy transfer）is a phenomenon of radiationless energy transfer between a pair of fluorophores, where wavelengths of fluorescence emission are altered in a manner dependent on the distance between the fluorophores. Therefore, in combination with a color pallet of different fluorescent proteins, it enables us to examine protein-protein interaction, protein conformational change, and enzymatic activity in living cells or organisms. In this study, we have constructed fluorescent biosensors for clock proteins, Bmal1 and Clock, and performed qualitative and quantitative observation of circadian rhythms of protein dynamics, including their subcellular localization, mobility, and interaction, in living cells. This research has been conducted with Yusuke Ohba, Asuka Nanbo and Yoichiro Fujioka（Hokkaido Univ.）.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-154 長鎖遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気管平滑筋細胞増殖作用とその細胞内機序

○水田健太郎

東北大　院歯　麻酔

【目的】肥満は気管支喘息重症化のリスク因子である．肥満が気管支喘息を増悪させる機序については諸説あるものの，確たる証左は得られていない．近年我々は，長鎖遊離脂肪酸をリガンドとする FFAR1 受容体が，膵β細胞や腸管のみならず気管平滑筋上にも発現し，気管収縮促進作用をもたらす，すなわち長鎖遊離脂肪酸が肥満と気管支喘息を結ぶ鍵分子の 1 つであることを報告した．今回我々は，FFAR1 受容体を介した長鎖遊離脂肪酸による気道リモデリング作用とその細胞内機序について検討した．【方法】長鎖遊離脂肪酸（オレイン酸）投与によるヒト気管平滑筋細胞増殖作用は，BrdU 細胞増殖アッセイで評価した．オレイン酸または選択的 FFAR1 刺激薬（GW9508）投与による Akt, ERK, p70S6K のリン酸化は Western blot 法で評価した．またこれらのリン酸化が，siRNA による FFAR1 受容体のノックダウン，$G_i$蛋白阻害薬（百日咳毒素），Src 阻害薬（PP1），$G_{\beta\gamma}$サブユニットシグナル阻害薬（gallein），PI3K 阻害薬（LY294002），MEK 阻害薬（U0126），mTOR 阻害薬（rapamycin）により阻害されるかを Western blot 法で評価した．【結果】オレイン酸及び GW9508 の投与によりヒト気管平滑筋細胞の増殖促進及び ERK，Akt，p70S6K のリン酸化が生じた．オレイン酸による ERK 及び Akt リン酸化は FFAR1 受容体のノックダウンにより有意に抑制された．Akt リン酸化は，百日咳毒素，PP1，LY294002 の前投与で有意に抑制されたのに対し，ERK リン酸化は百日咳毒素，gallein，U0126 の前投与により有意に抑制された．オレイン酸による p70S6K リン酸化は LY294002，U0126，rapamycin の前投与により有意に抑制された．【考察】FFAR1 を介した気管平滑筋細胞増殖作用と p70S6K リン酸化は，$G_i$-Src-PI3K/Akt 及び $G_i$-$G_{\beta\gamma}$-MEK/ERK 経路を介して生じることが明らかとなった．これらの知見は，FFAR1 が気道リモデリングにおいて重要な役割を果たすことを示唆するものである．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Long-chain free fatty acid receptor FFAR1 induces cell proliferation in human airway smooth muscle cells

○Mizuta K

Dept Dento-oral Anesthesiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Obesity is one of the risk factors for asthma. We have reported that activation of long chain free fatty acids receptor FFAR1 induces airway smooth muscle contraction. Airway smooth muscle cell proliferation is one of the key features of airway remodeling. We questioned whether stimulation of FFAR1 induces human airway smooth muscle（HASM）cell proliferation, and evaluated its intracellular mechanisms. FFAR1 natural ligand（oleic acid）or the FFAR1 selective agonist（GW9508）stimulated HASM cell proliferation and phosphorylated Akt, ERK, and p70S6K in HASM cells. Down regulation of FFAR1 in HASM cells by siRNA attenuated oleic acid-induced phosphorylation of Akt and ERK. Oleic acid-induced Akt phosphorylation was inhibited by the $G_i$ protein inhibitor pertussis toxin, Src kinase inhibitor PP1, and PI3K inhibitor LY294002, while ERK phosphorylation was inhibited by pertussis toxin, G protein beta-gamma subunit signaling inhibitor gallein and MEK inhibitor U0126. Phosphorylation of p70S6K by oleic acid was inhibited by LY294002, U0126, and mTOR inhibitor rapamycin. These findings suggest that activation of the FFAR1 promoted airway smooth muscle cell proliferation and p70S6K phosphorylation through $G_i$-Src-PI3K/Akt and $G_i$-G protein beta-gamma subunit-MEK/ERK signaling pathway. FFAR1 on airway smooth muscle could be an important regulator of airway remodeling.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-155　歯周病と老化との関連性：歯周病で見られる酪酸濃度が血液老化に及ぼす影響

○Cueno Marni[1]，田村　宗明[1,2]，落合　邦康[1,2]

[1]日本大　歯　細菌
[2]日本大　総歯研　生体防御

【目的】歯周病原菌が産生する酪酸は酸化ストレスを惹起する．以前より老化と酸化ストレスとには深い関連性が報告されている．したがって，酪酸によって発生する酸化ストレスは老化と関連しているものと推察される．そこで，われわれはラットを供試して関連性について検討を行った．【方法】酪酸を若年（20 週齢）と中年（40 週齢）の SD ラット歯肉に接種し，その後採血を行った．血液中の酸化ストレスと細胞死と老化マーカーを測定した．【結果と考察】実験の結果，酪酸接種した若年ラットでは血液中の酸化ストレスと細胞死と老化マーカーは濃度依存的に上昇した．一方，中年ラットでは変化は認められた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Periodontal disease level-butyric acid putatively contributes to blood ageing: A proposed link between periodontal diseases and the ageing process

○Cueno M[1]，Tamura M[1,2]，Ochiai K[1,2]

[1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent
[2]Div Immunol Pathobiol, Res Cent Nihon Univ Sch Dent

Butyric acid（BA）is produced by periodontopathic bacterial pathogens and is proven to induce oxidative stress. Ageing and oxidative stress has long been linked to one another. In this regard, this would suggest that BA-induced oxidative stress may contribute to the ageing process. Here, we used 20 wk-old（young）and 40 wk-old（middle-age）Sprague-Dawley male rats. We simulated BA-based oral infection among the young rats and isolated blood cytosol to determine oxidative stress-related signals［heme, hydrogen peroxide（H2O2）, catalase（CAT）, NOX1, and NOX2］, cell death-related signals（calcium, CASP1, CASP3）, and aging-related markers［NAD, sirtuin-1（SIRT1）, mammalian target of rapamycin（mTOR）. We compared measurements obtained from BA-treated young rats with those from BA-untreated young and middle-aged rats. We observed that all oxidative stress-related signals in BA-treated young rats mimic those found in middle-aged rats. Moreover, cell death-related signals in BA-treated young rats also mimic those found in middle-aged rats. We hypothesize would suggest that BA contribute to the aging process. We confirmed BA-related aging based on NAD, SIRT1, and mTOR measurements wherein those found in BA-treated young rats mimic those detected in middle-aged rats. This would insinuate that BA-based oral infections have a tendency to contribute to the aging process.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-156 MAP3K8/Cot/Tpl2 シグナル分子はマクロファージの LPS 刺激による分解の後，NF-κB による mRNA の誘導により回復する

○柿元　協子[1]，楠山　譲二[1]，坂東健二郎[2]，大西　智和[1]，松口　徹也[1]

[1]鹿児島大　院医歯　口腔生化
[2]明海大　歯　生化

MAP3K8/Cot/Tpl2 は病原体の感知レセプターである Toll-like receptor（TLR）シグナル下流の MAP3K であり，抗原提示細胞のサイトカイン産生調節や，骨芽細胞における RANKL 発現誘導，破骨細胞分化の際の RANKL のシグナルに重要であることが報告されている．我々は以前，Cot/Tpl2 の KO マウスを使った歯周病誘発モデルにおいて，野生型マウスに比べて骨吸収が抑制されることを報告した．Cot/Tpl2 は，LPS などの刺激により活性化されると，その後分解される．しかし，LPS が大量に存在する歯周病罹患部位で，未分化な破骨細胞中の Cot/Tpl2 が減少したままでは RANKL による分化が抑制されることになる．【目的】LPS 刺激後に減少した Cot/Tpl2 の回復の有無とそのメカニズムの解明【方法】融合すると破骨細胞への分化に傾くことが報告されている，マウスのマクロファージ様細胞株 J774.1 を用いた．LPS で刺激し，WB にて Cot/Tpl2 の量の変化を確認した．また，Real-time RT-PCR で，MAP3K の mRNA の発現を確認した．インヒビターやレポーターアッセイを用い，Cot/Tpl2 の転写を活性化するシグナル分子を検索した．【結果と考察】LPS 刺激後，58 kDa の活性型 Cot/Tpl2 の量が減少したが，6 時間後にはほぼ回復した．LPS 刺激により Cot/Tpl2 の mRNA の発現の増加が認められたが，Cot/Tpl2 以外の MAP3K では，増加が認められないか，わずかな増加にとどまっていた．Cot/Tpl2 の転写の活性化には NF-κB のシグナルが重要であった．これらの結果より LPS 刺激により分解された 58 kDa の Cot/Tpl2 は，同時に転写が活性化してその量を回復し，その後，RANKL などのシグナルを伝達する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## MAP3K8/Cot/Tpl2 signaling molecule is degraded by LPS stimulation, and recovered by induction of mRNA expression through NF-κB signal pathway in macrophages

○Kakimoto K[1]，Kusuyama J[1]，Bandow K[2]，Ohnisi T[1]，Matsuguchi T[1]

[1]Div Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Biochem, Dept Oral Biol and Tissue Engineering, Meikai Univ Sch Dent

MAP3K8/Cot/Tpl2 is signaling molecule which controls cytokine production by antigen presenting cells (APC), RANKL expression in osteoblast, and osteoclast differentiation by RANKL stimulation. We previously reported the periodontitis mouse model using Cot/Tpl2 knockout mice. It showed alveolar bone resorption of KO mice is lower than WT mice. It is reported that LPS stimulation activates 58 kDa Cot/Tpl2 and degrades. But, Cot/Tpl2 signal is need for osteoclast differentiation by RANKL stimulation in periodontitis. Cot/Tpl2 is recovered after degradation. We used macrophage-like cell line, J774.1 which increased osteogenic activity by fusion. LPS stimulation decreased 58 kDa active form of Cot/Tpl2 in 1-2h, but recovered after 6 h from stimulation. Cot/Tpl2 mRNA expression was increased by stimulation with LPS, but another MAP3K mRNA expression was not increased or increased little. The Cot/Tpl2 mRNA expression was induced by NF-κB signal pathway. These results showed that 58 kDa Cot/Tpl2 was recovered by induction of mRNA expression after LPS induced degradation and it might activates the signal transduction by another stimulation factors such as RANKL.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-157 象牙芽細胞機械刺激で誘発される三叉神経節ニューロン内向き電流: 象牙芽細胞-ニューロン共培養による odontoblast hydrodynamic receptor theory の電気生理学的解析

○佐藤　正樹，木村　麻記，小島　佑貴，東川明日香，隠田みゆき，小倉　一宏，望月　浩幸，澁川　義幸，田﨑　雅和

東歯大　生理

序論：象牙質表面に加わる様々な侵害刺激は，象牙細管を満たす象牙細管内液の移動を介して象牙芽細胞の細胞膜を伸展・変形させる．象牙芽細胞への機械刺激は，mechano-sensitive transient receptor potential（TRP）チャネルを活性化する．Mechano-sensitive TRP チャネル活性化により流入した $Ca^{2+}$ は，pannexin-1 チャネルを開口させ，歯髄分布ニューロンに対し ATP を放出する．放出された ATP は三叉神経節（TG）ニューロンのイオンチャネル型 ATP 受容体（$P2X_3$）を活性化させることで象牙芽細胞と TG ニューロンは ATP を伝達物質とする感覚受容機構を有する（odontoblast hydrodynamic receptor theory）ことが明らかとなった．本研究では象牙芽細胞-TG ニューロンの感覚情報連絡の詳細を明らかにするため，象牙芽細胞機械刺激によって記録される誘発性内向き電流を，大型 TG ニューロンで解析した．方法：新生児ラットから象牙芽細胞を急性単離した．TG ニューロンは初代培養を行った．両者から象牙芽細胞－RG ニューロン共培養系を作成した．象牙芽細胞は標準細胞外液を満たしたガラス微小管を用いて直接機械刺激を行い，その際の誘発細胞膜イオン電流を whole-cell patch-clamp 法を用いて記録した．結果：象牙芽細胞を直接機械刺激と，TG ニューロンから誘発性内向き電流が記録された．この誘発性内向き電流は本細胞刺激開始・解除の両方で記録され，象牙芽細胞と TG ニューロンの距離の増加に従いその振幅は減少した．誘発性内向き電流は，細胞直径 25 $\mu$m 以上の大型 TG ニューロンで一過性記録した．考察：直接機械刺激象牙芽細胞より放出された神経伝達物質が，TG ニューロンに発現する受容体を活性化して誘発性内向き電流を発生させることが示された．先行研究より，神経伝達物質は ATP の可能性がある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Evoked inward currents in trigeminal ganglion neurons following mechanical stimulation of odontoblasts in the odontoblast-neuron coculture system

○Sato M，Kimura M，Kojima Y，Higashikawa A，Shimada M，Ogura K，Mochizuki H，Shibukawa Y，Tazaki M

Dept Physiol, Tokyo Dent Coll

Introduction: Various stimuli applied to the dentin surface elicit dentinal fluid movement, which activates ATP release via pannexin-1 channel in response to activation of mechano-sensitive transient receptor potential（TRP）channels by membrane deformation in odontoblast. The released ATP, as neurotransmitter, then activates $P2X_3$ receptors in pulpal-trigeminal ganglion（TG）neurons, to establish intercellular odontoblast-neuron communication driving sensory transduction sequence for dentin（"Odontoblast hydrodynamic receptor theory"）. In the present study, we examined evoked inward currents in large-TG neurons following direct mechanical stimulation to odontoblasts, to investigate detailed electrophysiological properties of odontoblast-TG neurons sensory signal transduction. Materials and Methods: The odontoblast and TG neuron were isolated from neonatal rats, primary cultured, and subjected to odontoblasts-TG neurons co-culture system. Mechanical stimuli were applied by a glass pipette filled standard extracellular solution. Evoked inward-currents in TG neurons were recorded by whole-cell patch-clamp method. Results: When mechanical stimuli were applied to odontoblasts, evoked transient inward current in large TG neurons were recorded. This inward current was decreased with the increasing the distance between odontoblasts and TG neurons.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-158 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた $Ca^{2+}$バイオセンサー恒常発現細胞における培養時の $Ca^{2+}$応答と細胞の動きの同時解析

○森田　貴雄，根津　顕弘，谷村　明彦

北医療大　歯　薬理

【目的】ウイルスベクターはリポフェクション等に比べて遺伝子導入効率が高いため，動物個体での遺伝子発現によく用いられる．特にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは，遺伝子がゲノムに組み込まれるので，外来遺伝子を長期間発現させる事ができる．本研究では，AAV ベクターを使って高感度 $Ca^{2+}$バイオセンサー(YC-Nano50)の恒常発現細胞を作製し，培養下の細胞の動きやアポトーシス時における $Ca^{2+}$応答を解析した．【方法】耳下腺由来 HSY-EA1 細胞に AAVDJ ベクターを導入し，YC-Nano50 恒常発現細胞を作製した．AQUACOSMOS イメージングシステムを用いて，37℃，5% $CO_2$，血清等を含む培養条件下で 10 時間以上の $Ca^{2+}$動態を解析した．スクラッチやスタウロスポリン（2 $\mu$M）添加によって，細胞移動やアポトーシスに伴う $Ca^{2+}$動態の解析を行った．【結果と考察】YC-Nano50 恒常発現細胞の培養条件下での $Ca^{2+}$応答を観察したところ，自発的な細胞内 $Ca^{2+}$濃度の上昇と下降を繰り返すオシレーション様の反応が観察された．細胞移動と $Ca^{2+}$応答を観察するためにスクラッチアッセイを行ったところ，$Ca^{2+}$オシレーションの振幅および頻度が増加した．このオシレーション頻度は容量性 $Ca^{2+}$流入を阻害する $La^{3+}$存在下で減少し，細胞の移動距離も減少した．アポトーシス時の $Ca^{2+}$動態を解析するためにスタウロスポリンを添加すると，10 分以内に $Ca^{2+}$応答が増大し，その後のオシレーションの振幅と頻度も増加した．約半数の細胞で，スタウロスポリンを加えて 4 時間以内に細胞の形態変化が始まり，12 時間後には 80%の細胞の形態が変化した．$La^{3+}$存在下では，オシレーションの頻度は減少し，細胞形態変化の程度が大きくなった．本研究により，今までは見られなかった細胞の動きや形態変化と $Ca^{2+}$動態の関係をリアルタイムで解析することができるようになった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Analyses of long-term $Ca^{2+}$ responses and cell movements in culture conditions in the salivary cells with stably expressing $Ca^{2+}$ biosensor using AAV vectors

○Morita T，Nezu A，Tanimura A

Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

Adeno-associated virus（AAV）vectors provide long-term transgene expression with low immunogenicity. We made the salivary gland-derived cultured cell（HSY-EA1 cells）with stably expressing $Ca^{2+}$ biosensor（YC-Nano50), and measured $Ca^{2+}$ dynamics during cell migration in culture conditions. Spontaneous $Ca^{2+}$ oscillations were observed in culture conditions, and the amplitude and frequency of oscillation increased by scratching. Addition of $La^{3+}$, inhibitor of store-operated $Ca^{2+}$ entry channel, resulted in the decrease of oscillation and the distance of migration as compared with the non-treated cells. Next, YC-Nano50-expressing HSY-EA1 cells were treated with 2 $\mu$M staurosporine for inducing apoptosis. Staurosporine-treated cells showed the increase in $Ca^{2+}$ responses within 10 min. Changes in cell shapes started within 4 h after addition of staurosporine, and about 80% of cells showed the round shape after 12 h. Addition of $La^{3+}$ decreased $Ca^{2+}$ oscillations and increased apoptotic cells. These results showed the real-time analyses of $Ca^{2+}$ dynamics during cell migration and changes of cell shape.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-159 TGF-β 刺激により顎関節組織由来細胞が示す病的機能変化の調節機構を明らかにする研究

○横田　聖司[1]，帖佐　直幸[2]，衣斐　美歩[3]，菊池恵美子[1]，木村　仁迪[1]，客本　斉子[2]，加茂　政晴[2]，佐藤　和朗[1]，石崎　明[2]

[1]岩医大　歯　歯科矯正
[2]岩医大　歯　生化
[3]岩医大　薬　分子細胞薬理

【目的】顎成長期における矯正治療において，咬合の変化に伴う顎関節への影響は大きく，咬合の著しい変化による顎関節症の発症例も少なくない．またこの咬合の変化に伴う顎関節への機械的なストレスは，顎関節の軟組織細胞成分を構成する滑膜細胞などの間葉系細胞からの細胞外基質やサイトカインの分泌に影響することが報告されている．しかし，これらの細胞外基質の性状に伴う線維性強直症による顎関節の運動不全やサイトカイン分泌による炎症性細胞浸潤を伴う顎関節炎発症メカニズムの細胞レベルや分子レベルでの詳細な調査は行われていない．そこで，我々は炎症性細胞浸潤に伴い炎症巣周囲で発現が認められる transforming growth factor-β（TGF-β）が，顎関節の強直性機能障害や炎症性疾患の発症メカニズムにどのように働くかを明らかにしたい．
【方法】マウス顎関節滑膜より採取した初代培養細胞に SV40T 抗原を過剰発現させることにより，顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞株 fibroblast-like synoviocytes（FLS）cell line の樹立を試みた．次に TGF-β 刺激が同細胞の増殖能や筋線維芽細胞への分化に与える影響を調査した．
【結果と考察】FLS 細胞株の樹立に成功した．TGF-β はこの細胞の増殖能力を抑制すると共に筋線維芽細胞への分化を促進した．これらの結果から，TGF-β は顎関節の炎症時に働いて線維形成を促進することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The elucidation of molecular mechanisms underlying the TGF-β-induced pathological changes of synovial cells derived from temporomandibular joint

○Yokota S[1], Chousa N[2], Ibi M[3], Kikuchi E[1], Kimura H[1], Kyakumoto S[2], Kamo M[2], Sato K[1], Ishisaki A[2]

[1]Dept Develop Oral Health Science, Div Ortho, Iwate Med Univ Sch Dent
[2]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ
[3]Div Molecular Cellar Pharmacol, Sch Pharmaceutical, Iwate Med Univ

***Purpose*** It has been generally known that transforming growth factor（TGF）-β is a fibrogenic cytokine synthesized from macrophages recruited into the inflammatory tissues. However, it remains to be clarified that how TGF-β affects fibrous tissue formation by synovial cells derived from temporomandibular joint（TMJ）, which is suffered from fibrous ankylosis due to abnormal occlusion. Therefore, we investigated that how TGF-β affects proliferative activity and the status of myofibroblastic differentiation of synovial cells derived from TMJ.
***Methods*** Firstly, we established mouse synovial cell line. Then, we evaluated proliferative activity of the cells by using an alamarBlue assay. And then, we evaluated the status of myofibroblastic differentiation by using qRT-PCR.
***Results & Conclusion*** TGF-β suppressed the proliferative activity of the synovial cells derived from TMJ, and induced myofibroblastic differentiation. Thus, TGF-β seems to be related to the emergence of fibrous ankylosis of TMJ.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-160　甘味受容体 T1R2/T1R3 に対する味覚修飾作用の解析

○實松　敬介[1]，重村　憲徳[1]，二ノ宮裕三[1,2]

[1]九大　院歯　口腔機能
[2]九大　味覚　嗅覚セ　感覚生理

甘味受容体 T1R2/T1R3 のリガンド特性には顕著な種差がある．植物ギムネマシルベスタに含まれるトリテルペン配糖体・ギムネマ酸はヒトの甘味を抑制するが，マウスには無効である．ミラクルフルーツに含まれるタンパク質・ミラクリンは，ヒトにおいては酸性条件下で甘味誘導効果を有するが，マウスには無効である．これらの事実は，甘味受容体 T1R2/T1R3 の，系統発生や進化の過程における食環境に適応した種特異的なアミノ酸変異に基づくものと推定される．本研究では，T1R2/T1R3 を HEK293 細胞に強制発現させた甘味受容体再構築系を用い，T1R2/T1R3 とギムネマ酸およびミラクリンとの相互作用について解析を行った．ヒト型・マウス型・キメラ体の甘味受容体を発現させ，ギムネマ酸の効果を検索したところ，ギムネマ酸感受性にはヒト T1R3 の膜貫通ドメインが不可欠であることが示唆された．また，分子モデリングによりその部位にギムネマ酸が結合することが推定された．さらに構造活性相関によりギムネマ酸のグルクロノシル基が甘味抑制に重要であることが示唆された．ミラクリンに関しては，ヒト型・マウス型・キメラ体による解析によりミラクリンがヒト T1R2 の N 末端ドメインに作用することが明らかになった．さらに点変異を用いた解析から，酸性条件下におけるヒト T1R2 の構造変化により，ミラクリンの甘味誘導効果が引き起こされることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular mechanisms of modifying effects by gymnemic acids and miraculin on the sweet taste receptor, T1R2/T1R3

○Sanematsu K[1]，Shigemura N[1]，Ninomiya Y[1,2]

[1]Sec Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
[2]Div Sens Phsiol, Res and Develop Ctr for Taste and Odor Sens, Kyushu Univ

Gymnemic acids（GAs）are triterpene glycosides that selectively suppress taste responses to various sweet substances without affecting salty sour and bitter compounds. Miraculin（MCL）is a glycoprotein which induces sweet taste by acidification. These taste modifying effect of GAs and MCL are specific to humans but not to mice. However, little is known about the molecular mechanisms underlying these effects of GAs and MCL. To elucidate interactions between sweet receptor and GAs and MCL, we used the sweet receptor T1R2 ＋ T1R3 assay in transiently transfected HEK293 cells. Using species-specific sensitivities to GAs and MCL, we found that interaction sites for GAs and MCL were the transmembrane domain of hT1R3 and the amino-terminal domain of hT1R2, respectively. Glucuronic acid, the common structure of gymnemic acids, also reduced sensitivity to sweet compounds, suggesting that the glucuronosyl group of GAs is required for sweet-suppressing effect. In addition, our results suggest that the conformational change of hT1R2 by acidification is also required for taste modifying effect of MCL.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-161　食欲調節因子に対するマウス脳幹部 GLP-1 分泌神経細胞の応答特性

○久留　和成，平井　喜幸，前澤　仁志，舩橋　　誠

北大　院歯　口腔生理

Glucagon-like peptide-1（GLP-1）は小腸と脳幹の一部の細胞から分泌される内因性ペプチドであり，小腸においては食後に分泌され，中枢神経系に作用し摂食抑制作用を示すことが知られている．しかし中枢神経系における GLP-1 の分泌機序については未だ明らかにされていない．本研究では，脳幹 GLP-1 分泌神経細胞に対する修飾因子を同定することを目的とし，スライスパッチクランプ法を用いて食欲調節因子に対する GLP-1 分泌細胞の神経応答を解析した．
実験には，GLP-1 分泌細胞のみ特異的に yellow-fluorescent protein（YFP）を発現するトランスジェニックマウス（8 ～16 週齢）を使用した．脳スライス標本（200 μm）を作製後，パッチクランプ法にて YFP 陽性細胞（GLP-1 分泌神経細胞，n = 55）のみから記録を行い，摂食調節に関わるペプチドに対する神経応答の特性を電気生理学的に解析した．薬物としてレプチン，GLP-1，オレキシン，グレリン，およびグルタミン酸とドーパミンを使用し，灌流液（32 ℃）を介した細胞外投与にて刺激を行った．
本研究で使用した食欲調節因子の中で，GLP-1 分泌細胞はレプチン（20 nM）およびグルタミン酸（10 μM）のみに興奮性の神経応答を示したが，それ以外の薬物（GLP-1，オレキシン，ドーパミンおよびグレリン）に対する神経応答は観察されなかった．
これらの結果から，レプチンは脳幹 GLP-1 分泌細胞の活動を更新させることが明らかになり，GLP-1 分泌細胞による摂食抑制機序がレプチンによって修飾されている可能性が示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Neuromodulatory effects of appetite-related factors in GLP-1 releasing neurons of mouse brainstem

○Hisadome K，Hirai Y，Maezawa H，Funahashi M

Dept Oral Physiol, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

Glucagon-like peptide-1（GLP-1）is a gut peptide that is released in response to ingestion of food and causes satiety. GLP-1 is also produced in a small population of cells in the brainstem. However little is known about the function and the property of the GLP-1 releasing neuron. In this study, we attempt to identify the factors, which can modulate the activity of GLP-1 releasing neurons. To identify the GLP-1 releasing neurons in a brainstem slice preparations for patch-clamp recording, we used a transgenic mouse model in which yellow-fluorescent-protein（YFP）is expressed under the control of the GLP-1 promotor. Brainstem slices were obtained from adult transgenic mice（8-16 weeks old）after halothane anaesthesia. Slices were kept at 32℃ in artificial cerebrospinal fluid（ACSF）. Patch-clamp recordings were obtained from 55 YFP-positive cells at 32℃ under visual control. GLP-1 releasing neurons showed excitatory response to leptin（20 nM）and glutamate, but not to other orexigenic and anorexigenic factors（such as GLP-1, orexin, dopamine and ghrelin）. These results suggest that interactions between leptin and GLP-1 induced satiety signaling pathways.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-162　歯の発生過程における血管形成の分子制御機構

○春原　正隆，佐藤　　巌

日本歯大　生命歯　解剖 1

＜目的＞：我々は以前，歯の発生に関与するシグナル伝達分子の経時的発現状況について検討を行ったが，血管形態形成の分子メカニズムに関しては未だ明らかにされていない．今回我々は，歯の発生過程における血管新生関連分子に注目しその発現状況の解析を行い血管新生の分子機構について検討を行った．＜方法＞：我々は，血管新生関連分子に対する抗体を用いて免疫組織化学的に歯胚領域連続切片の染色を行った．さらに，血管新生関連分子のプローブを作製し，in situ ハイブリダイゼーション法を用いて各種遺伝子の経時的発現状況についても解析を行った．＜結果＞：数種類の血管新生関連分子は，歯の発生過程において時期特異的に歯胚周囲の間葉細胞，歯乳頭および血管周囲に発現が確認された．また血管新生関連分子の遺伝子に関しては特に歯胚周囲の間葉細胞および歯乳頭において発現が認められた．＜結論＞：本研究において，歯の発生過程における血管形態形成に関与している可能性のあるシグナル伝達分子の発現が確認された．本研究は，日本学術振興会科研費助成番号 22592052，26462800 によってサポートされております．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Molecular control of angiogenesis in tooth development

○Sunohara M，Sato I

Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

Objective : We have previously investigated the signaling molecules involved in tooth development, but mechanism of vascular morphogenesis remains unclear. Here, we examined the molecular control of angiogenesis signaling during tooth development. Method: We stained serial sections of dental tissues immunohistochemically with the antibody against angiogenesis-related molecules. And also we performed in situ hybridization by using the probes of angiogenesis-related molecules. Result: Some angiogenesis-related molecules were observed in mesenchymal layers, dental papilla and around the blood vessels and also they expressed in a stage-specific manner during tooth development. And then, the localization of transcripts of angiogenesis-related molecules were especially observed in mesenchymal layers and dental papilla in tooth germ. Conclusion: In this report, we detected the molecules might have involved in vascular morphogenesis during tooth development. *This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Numbers 22592052, 26462800.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-163 プラセンタ（胎盤製剤）によるヒト歯肉線維芽細胞のⅠ型コラーゲンと炎症性サイトカイン産生に及ぼす基礎医学的研究

○益野　一哉[1]，今村　泰弘[2]，本田　義知[3]，王　　宝禮[1]

[1]大阪歯大　歯科医学教育開発
[2]松本歯大　歯科薬理
[3]大阪歯大　中歯研

【目的】プラセンタ（胎盤製剤）は，基礎代謝向上，創傷治癒促進，疲労回復，抗炎症作用，自律神経調節，免疫強化，活性酸素除去などの薬理効果を持つことがすでに報告され，歯科領域においても，歯周疾患改善に及ぼす臨床研究が多数なされている）．しかし，これらの研究は臨床的な知見の取得に終始しており，プラセンタが歯周病に対する薬理作用は解明されて来なかった．そこで本研究では，プラセンタが，ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）のⅠ型コラーゲンと炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を *in vitro* にて検討し，プラセンタが歯周病に及ぼす作用機序の解明の一端を試みた．【材料と方法】豚由来プラセンタエキス純末（P-placental extraction）と *Porphyromonas gingivalis*（*P.g.*）由来の LPS を用い．HGF は，インフォームド・コンセント時に文書を用いて説明し書面にて同意を得，慢性歯周炎治療手術時に採取した．細胞増殖は MTT アッセイで，Ⅰ型コラーゲンと IL-6 および IL-8 の産生測定は ELISA 法にて評価した．【結果及び考察】プランセンタエキス純末が HGF のⅠ型コラーゲン産生を増強させると共に，LPS 誘導性 IL-6 と IL-8 産生を抑制させた．現在のところ，プラセンタエキス純末に含まれる成分を完全に把握出来ていないが，プラセンタ内に含まれる成長因子やビタミン類などが HGF のコラーゲン産生を向上させたと推察される．また，プラセンタエキス純末が LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生を抑制する機序にも AMPs が関与した可能性が考えられる．【結論】プランセンタエキス純末が HGF のⅠ型コラーゲン産生を増強し，LPS 誘導性炎症性サイトカイン（IL-6 と IL-8）産生を抑制することを *in vitro* において実証した．これまでの臨床研究を裏付ける可能性もある．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Effect of placenta on collagen type-1 and inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts

○Masuno K[1]，Imamura Y[2]，Honda Y[3]，Wang P[1]

[1]Dept Innovation in Dent Edu, Osaka Dent Univ
[2]Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ
[3]Inst Dent Res, Osaka Dent Univ

Placental extract, which contains various bioactive agents, is thought to be a prospective medicine for systematic and oral diseases. However, in-depth information regarding its mechanisms with respect to treating periodontal diseases is not available, thereby hindering its reliable application in dentistry. Here, we demonstrated that P-placental extraction, isolated from porcine tissue, increased collagen type-1 production and hindered pro-inflammatory cytokine secretion from primary human gingival fibroblasts (HGFs) in vitro. HGFs were isolated from a 65-year-old patient who had undergone surgery due to chronic periodontitis. The cells were exposed to media with or without 20-2000 ug/mL P-placental extraction for 24 h. No cytotoxic effect of P-placental extraction was observed up to 200 ug/mL; cell viability was attenuated at the dose of 2000 ug/mL. When P-placental extraction was used at the non-cytotoxic concentration of 200 ug/mL, it significantly enhanced collagen type-1 production by HGFs within 24 h. Secretion of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 and IL-8 by HGFs treated with lipopolysaccharide (LPS) decreased when P-placental extraction was present in the medium. The results suggest that the mechanism underlying the therapeutic effect of placenta against periodontal disease is partially due to modulation of the cellular function of HGFs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-164 ユージノールにより誘導される口腔正常細胞の代謝プロファイルの変化

○坂上　宏[1]，田中　庄二[2]，村上　幸生[2]，片山　直[2]，天野　修[3]，横瀬　敏志[4]

[1]明海大　歯　薬理
[2]明海大　歯　総合臨床
[3]明海大　歯　解剖
[4]明海大　歯　保存治療

【目的】ユージノールは，鎮痛作用および抗炎症作用を有することから歯科では仮封剤として使用されている．しかし，細胞傷害性が高いことから，その安全性が見直されつつある．我々は，ユージノールが，ヒト口腔正常細胞およびヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して，同程度の細胞傷害効果を与え，ヌクレオソーム単位の DNA の断片化やカスパーゼの活性化を伴わない細胞死を誘導すること（高ら，In Vivo 27, 85-96, 2013），口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 において ATP の利用（AMP/ATP 比）を低下させ，ポリアミンを増加させること（高ら，In Vivo 27, 233-244, 2013）を報告した．今回，ユージノールのヒト口腔正常細胞に対する傷害性誘導機構を明らかにするため，メタボローム解析を駆使して，ユージノールの細胞内代謝物の変動に与える影響を検討した．【方法】学内倫理委員会のガイドラインにより調製されたヒト歯肉線維芽細胞，歯髄細胞，歯根膜線維芽細胞は，DMEM+10% FBS 中で培養した．生細胞数は，MTT 法で，細胞内微細構造は透過型電子顕微鏡で，細胞内代謝産物はメタノール抽出後，CE-TOF-MS で解析した．【結果】2 mM のユージノールの添加は，30 分後より非可逆的な細胞死が誘導され，細胞内微細構造の変性が観察された．TCA 回路の前半部分の代謝産物の濃度が急激に低下したが，解糖系代謝物，アミノ酸，ATP の利用の変動は軽微であった．【考察】初期過程における TCA サイクルの低下がユージノール誘発性細胞死の原因である可能性が示唆された．ATP の利用は，アポトーシスを誘導する系では上昇するので（坂上ら，Metaboromics 10, 270-279, 2014），ユージノールの添加は，アポトーシス以外の細胞死を誘導する可能性が確認された．ユージノールの細胞傷害性には注意深いモニタリングが必要である．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Changes of metabolic profiles in normal oral cells induced by eugenol

○Sakagami H[1]，Tanaka S[2]，Murakami Y[2]，Katayama T[2]，Amano O[3]，Yokose S[4]

[1]Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div General Clin Dent, Meikai Univ Sch Dent
[3]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent
[4]Div End Operative Dent, Meikai Univ

Eugenol, tha has analgesic and anti-inflammatory activities, is used as temporaly sealig material in the dentistry. However, its highl cytotoxicity made us to re-examine its safty. We have previously reported that eugenol showed comparable cytotoxicity against both human oral squamous cell carcinoma cell lines and normal oral cells, inducing non-apoptotic cell death, while it reduced the ATP utlization（AMP/ATP ratio）and increased polyamine levels in HSC-2 oral carcinoma cells. We investigated here how eugenol affects the metabolic profiling in normal oral cells. Human gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblast and pulp cells（prepared under the guideline of intramural ethic committee）were cultured in DMEM+10% FBS. Viable cell number was determined by MTT method, intracellular fine structure by TEM, and intracellular metabolites by CE-TOF-MS. Eugenol（2 mM）induced irreversible cell death and cellular damage within 30 min. Eugenol induced significant reduction in the metabolites of TCA cycle, but not that of glycolysis and amino acids, and the ATP utilization. The decline of TCA cycle seemed to be one of the targets of eugenol. Considering the increased ATP utlization during apoptosis, the present study confirmed the induction of non-apoptosis by eugenol in normal cells. Careful monitoring of the cytotoxicity of eugenol is necessary.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-165 骨吸収におけるエンドソーム/リソソーム小胞輸送に関与するタンパク質の同定とその機能解析

○岩竹　真弓，岡元　邦彰，筑波　隆幸

長崎大　院医歯薬　歯科薬理

破骨細胞は波状縁と呼ばれる発達した細胞膜を形成し，リソソームが細胞膜と融合してプロトンポンプによる酸とタンパク質分解酵素であるカテプシン群の分泌によって骨を分解する．破骨細胞の分化に伴ってリソソーム/エンドソームが形質膜とその近傍に運ばれることが知られているが，メンブレントラフィック機構の分子的機序は不明である．

本研究では破骨細胞の成熟化とともに上昇する遺伝子の中から，リソソーム/エンドソーム動態に関与する遺伝子を同定し解析を行った．その遺伝子群の中から 1 次構造にエンドソーム輸送に重要な役割を果たすリン脂質 PI3P に結合し，エンドソームに局在するモチーフ FYVE ドメインをもつ Plekhf1 に着目し，siRNA による解析を進めた．

その結果，Plekhf1 をノックダウンした破骨細胞はコントロール細胞と比較して，巨細胞化が亢進し，吸収能が増大した．巨細胞化の亢進は vitronectin コート上でも観察された．共焦点顕微鏡によりリソソームおよび初期エンドソームのマーカータンパク質である Lamp1，EEA1 の細胞内局在を調べた結果，ノックダウンした破骨細胞ではリソソームはコントロール細胞とは異なる局在を示し，初期エンドソームのドットの大きさは減少していた．またタンパク質の発現量は Lamp1，EEA1 ともに上昇する一方，メンブレントラフィックにおいて重要な制御因子である Rab5，7，11 タンパク質については発現の低下が認められた．

以上の結果から，Plekhf1 は破骨細胞のメンブレントラフィック機構に密接に関わっており，破骨細胞形成や骨吸収機能を負に制御し，エンドソーム融合において初期の段階での調節を行っている遺伝子であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Identification and analysis of a protein regulating vesicle trafficking of endosome/lysosomes in osteoclasts

○Iwatake M，Okamoto K，Tsukuba T

Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Osteoclasts resorb the bone matrix through forming a specialized cell membrane termed as “ruffled border” where they secrete acid produced by V-ATPase and various hydrolases including cathepsins. During osteoclast differentiation, the endosome/lysosome is transported to the plasma membrane facing the bone. However, detailed molecular mechanisms of the membrane traffic in osteoclasts are unclear. In this study, among up-regulated genes during osteoclasts differentiation, we identified Plekhf1, which contains FYVE domain at COOH terminal in the primary structure, since the FYVE domain is known to exclusively bind to the phospholipid PI(3)P, and localized in endosomes. siRNA-mediated knockdown of Plekhf1 induced larger formation in osteoclasts, and activated bone resorption. On vitronectin-coated plates, larger formed osteoclasts were also observed. By using confocal microscopy, Plekhf1 depletion caused abnormal localization of lysosomes and decreased the size of early endosomes in osteoclasts. Moreover, the protein levels of Lamp1 and EEA1 were increased, whereas those of Rab5, -7, and -11 were decreased in Plekhf1 knock-down osteoclasts compared with the control cells. These results suggest that Plekhf1 controls normal localization and protein levels in lysosomes and endosomes in osteoclasts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-166　骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の Ca 依存 ATPase の性質と部分精製

○工藤　智也[1,2]，出山　義昭[3,4]，吉村　善隆[3]，鈴木　邦明[3]，山崎　　裕[1]

[1]北大　院歯　高齢者
[2]二期会歯科クリニック
[3]北大　院歯　細胞分子薬理
[4]ポプラアベニュー歯科クリニック

【目的】骨芽細胞には Ca で活性化される Ca-ATPase が存在し石灰化への関与が考えられるが，報告は少ない．そこで，骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）の Ca-ATPase の性質を調べた．【方法】E1 細胞を培養後，細胞破砕物を作成し，ミクロソーム分画へ調整した．さらにドデシル硫酸ナトリウム（SDS）により可溶化した後，グリセロールの密度勾配遠心分離を行った．【結果と考察】細胞破砕物には Ca, Mg-ATPase（SERCA）の他，pH 9.6（Ca-P1）と pH 10.8（Ca-P2）で活性が高い Ca-ATPase と pH 9.6（Mg-P1）が主で pH 11.1（Mg-P2）にわずかな活性を示す Mg-ATPase 活性が検出された．Mg-P1 の最大活性は Ca-P1,2 の約 4.5 倍であった．これらの活性は SERCA の特異的阻害剤とされる thapsigargin により阻害されたが，P 型 ATPase を阻害する vanadate による阻害は認められなかった．また 2 価金属のキレーターである EDTA 及び EGTA は濃度依存性に両 ATPase 活性を阻害した．ミクロソーム分画では Ca-P1 が顕著に減少し，Ca-P2 の割合が増加した．また azide で処理すると Mg-ATPase のみが阻害された．グリセロール密度勾配遠心後には，Mg-P2 とその約 3 倍の Ca-P2 活性が検出された．以上より Ca-ATPase と Mg-ATPase は異なる酵素であり，SDS 処理により両者を分離することができた．Thapsigargin 存在下での E1 細胞の培養は，アポトーシス誘導作用のために困難であり，Ca-ATPase の石灰化への関与を明らかにすることはできなかった．【結論】E1 細胞の Ca-ATPase が thapsigargin 感受性を示すことが判明し，その性質の検討が可能な程度まで分離を行うことができた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Characterization and partial purification of Ca-dependent ATPase of osteoblastic MC3T3-E1 cell

○Kudo T[1,2]，Deyama Y[3,4]，Yosimura Y[3]，Suzuki K[3]，Yamazaki Y[1]

[1]Dept Oral Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[2]Nikikai Dent Clinic
[3]Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
[4]Poplar Avenue Dent Clinic

［Objectives］Ca-ATPase in osteoblastic MC3T3-E1 cells may relate to mineralization. We tried to purify Ca-ATPase and study its property, as details were remained to be elucidated. ［Materials and methods］Cells were homogenized and separated into microsome by centrifugation. Then they were solubilized by SDS and separated on density gradient of glycerol. ［Results and discussion］Cell homogenate contained high Ca-ATPase activity at pH 9.6（Ca-P1）and 10.8（Ca-P2）, and Mg-ATPase at pH 9.6（Mg-P1）. Low Mg-ATPase activity at pH 11.1（Mg-P2）was also detected. Mg-P1 was 4.5 fold higher than Ca-P1 and Ca-P2. These ATPase activities were inhibited by thapsigargin, but not by vanadate. In microsome, Ca-P1 decreased remarkably, but Ca-P2, Mg-P1 and Mg-P2 remained, and the ratio of Ca-P2 increased. Mg-ATPase but not Ca-ATPase was inhibited by azide. After centrifugation of density gradient of glycerol, Mg-P2 and Ca-P2 which activity is three fold higher than Mg-P2 remained. To investigate the role of Ca-ATPase on mineralization, we tried to culture MC3T3-E1 with thapsigargin, but it was difficult to culture them until mineralization because of apoptosis by thapsigargin. ［Conclusion］We separated Ca-ATPase from Mg-ATPase of MC3T3-E1 cells and studied its property.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-167 カフェストールは，カフェオールより破骨細胞分化阻害効果が弱く，骨芽細胞の成熟を促進する

○福間　　裕，坂井　詠子，西下　一久，岡元　邦彰，筑波　隆幸

長崎大　院医歯薬　歯科薬理

骨の恒常性は，破骨細胞(OCL)によって行われる骨吸収と骨芽細胞(OBL)による骨形成の間の巧妙なバランスによって制御されている．したがって，OCL 機能を抑制し OBL 機能を促進する効果を併せ持つ合成物を開発することは，骨疾患のための新しい治療方法として有効である．以前，我々はコーヒーに含まれるジテルペンであるカフェストールが，OCL に対して，濃度依存的に分化を阻害する事を報告した．今回，コーヒーに含まれる同じジテルペンであるカフェオールに関して OCL に対する効果をカフェストールの効果と比較検討し，更に OBL における効果についても調べた．カフェオールは，第 II 相抗酸化酵素群における mRNA レベルで見ると，抗酸化作用も高く，カフェストールより OCL の分化阻害効果が大きい事が示された．次に，マウスの頭蓋骨由来の OBL を用いて，OBL 成熟におけるカフェストールの効果を検討した．アルカリフォスファターゼ染色を用いたところ，カフェストールの濃度依存的に OBL の成熟を増した．カフェストールによる効果について OCL 及び OBL マーカーの mRNA レベルをリアルタイム PCR 法を用いて検討した．カフェストールは OCL については，RANKL と OPG の発現レベルを抑制していた．一方，OBL については，ALP, Osterix，などの mRNA レベルは，カフェストール処理で，有意に増加した．しかし，Osteopontin と coll typeI の mRNA レベルは，カフェストール処理群とコントロール群で差は無かった．これらの結果は，カフェストールは OCL 分化阻害効果と OBL の分化促進効果を併せ持つ事を意味している．カフェストールは，OCL 及び OBL に細胞毒性がほとんど認められていない事から，骨疾患における新しい予防薬・治療薬になり得る事が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast maturation

○Fukuma Y，Sakai E，Nishishita K，Okamoto K，Tsukuba T

Div Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

Bone homeostasis is regulated by a balance between osteoclast（OCL）-mediated bone resorption and osteoblast（OBL）-mediated bone formation. Thus, developing a compound that simultaneously inhibits OCL function and promotes OBL function would be useful as a new medical therapy for bone diseases. Here, we examined the effects of cafestol, a coffee diterpene, on the differentiation of OCLs and OBLs. Cafestol prevented OCL formation in a dose-dependent manner and suppressed the bone-resorbing activity of OCLs. Interestingly, the viability of OCLs treated with 10-50 $\mu$M cafestol was significantly higher than that of untreated cells. At the molecular level, cafestol markedly decreased RANKL-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase（Erk）and inhibitor of nuclear factor kappa B alpha（IkappaBalpha）. Compared to kahweol, another coffee-specific diterpene, the inhibitory effects of cafestol were milder on OCL differentiation, and cafestol and kahweol showed different characteristics in induction of the phase II antioxidant enzymes and sensitivities in nuclear factor-erythroid 2-related factor 2（Nrf2）-deficient BMMs. In addition to inhibiting OCLs, cafestol enhanced the differentiation of osteoblastic cells by increasing the mRNA levels of differentiation markers. Thus, cafestol inhibits OCL differentiation and promotes OBL differentiation, suggesting that cafestol may be a novel agent for bone diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-168 リン酸ナトリウムは bisphosphonate による骨芽細胞障害を増強する

○田島　雅道，坂上　　宏

明海大　歯　薬理

【目的】 Bisphosphonate（BP）を投与されている患者が，口腔外科的治療後に顎骨壊死を発症する機序は明らかでなく，有効な治療法も確立されていない．そこで BP による骨芽細胞障害を増強する因子の検索を行い，リン酸ナトリウムがその障害性に関与していることを見出し，その作用機序の解析を行った．【方法】 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて，BP の細胞障害作用を増強する物質を調べた．細胞増殖活性の測定は WST-8 を用い，アポトーシスの評価は CellEvent caspase 3/7 により行った．また，ミトコンドリア膜電位の変化は JC-1 の蛍光測定で行い，細胞内活性酸素（ROS）測定は CM-$H_2$-DCFDA を用いて，励起光の反復照射によって生成される ROS 量の経時的変化から，その応答性を評価した．【結果】 BP は MC3T3-E1 の細胞増殖を濃度依存的に阻害した．この BP による細胞障害は，ミトコンドリアの膜電位上昇と ROS 生成応答の抑制が見られたが，caspase 3 は活性化された．BP の細胞障害に対して pyrophosphate や triphosphate は抑制作用を示したが，$\beta$-glycerophosphate は増強を示した．Sodium phosphate が濃度依存的に BP の細胞障害を増強したことから，リン酸トランスポーター阻害作用を有する phosphonoformate の作用を調べたところ，抑制作用が確認された．【考察】 BP の骨芽細胞障害は，リン酸の取り込みによって増強されている可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Phosphate enhances the bisphosphonate-induced cytotoxicity of osteoblastic cells

○Tajima M，Sakagami H

Div Pharmacol, Dept Diagn Therapeutic Sci, Meikai Univ Sch Dent

Extracting teeth of patients treated with bisphosphonates（BPs）occasionally induces the necrosis of jaw, but the cause of disease is still unclear. We found that sodium phosphate enhances the cytotoxicity of osteoblast induced by BPs. In the present study, we investigated the enhancing mechanism of sodium phosphate. MC3T3-E1 cells were used as osteoblatic cells. The proliferation of cells was assayed by WST-8. Apoptosis was evaluated by CellEvent caspase 3/7. Membrane potential of mitochondria was observed using the fluorescence image of JC-1. The alteration of intracellular reactive oxygen species（ROS）was evaluated by the fluorescence image of CM-$H_2$-DCFDA. BPs dose-dependently inhibited the growth of MC3T3-E1. BPs increased the membrane potential of mitochondria, and suppressed the productive response of intracellular ROS. On the other hand, caspase 3 was activated and cell death was induced. The addition of sodium phosphate or beta-glycerophosphate enhanced the BPs-induced damage of MC3T3-E1 cells. But pyrophosphate or triphosphate suppressed the cell damage. Phosphonoformate, an inhibitor of sodium-dependent inorganic transporter, suppressed the BPs-induced cytotoxicity. These results suggest that the phosphate transport may enhance the BPs-induced osteoblastic damage.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-169 Shogaol および gingerol はナトリウムチャネル $Na_v1.8$ を阻害して口内炎疼痛を抑制する

○人見　涼露，小野堅太郎，山口喜一郎，稲永　清敏

九歯大　生理

ガン治療患者に発症した口内炎疼痛に対して漢方薬の半夏瀉心湯の含漱が有効であることが最近報告された．しかし，その鎮痛メカニズムは不明である．本研究では，まず代表的疼痛関連チャネルに対する半夏瀉心湯含有成分の作用についてイオンチャネルアッセイを用いてスクリーニングし，次に最近我々が開発した覚醒下ラットに対する疼痛評価法を用いて，口内炎モデルラットに発生した口腔粘膜痛に対する半夏瀉心湯成分の鎮痛作用を評価した．半夏瀉心湯に含まれる20 以上の化合物について $Na_v1.8$ に対する作用をイオンチャネルアッセイにより調べたところ，半夏瀉心湯構成生薬の一つである乾姜に含まれる shogaol および gingerol が強いアンタゴニスト作用を示すことが判った．酢酸誘発口内炎モデルラットの機械的逃避閾値の低下（機械的アロディニア）は，半夏瀉心湯を 5 分間口内炎部位に塗布することで抑制された．しかし，乾姜成分または[6]-shogaol および[6]-gingerol の混合薬物を同様に塗布したところ，逃避閾値に有意な変化は認められなかった．そこで，半夏瀉心湯の他の生薬成分であり，組織内浸透作用を持つサポニンを多く含む高麗人参を各薬物に加えたところ，コントロールと比較して有意な機械逃避閾値の上昇が認められた．また，人参により口内炎部位の薬物浸透性が増強した．以上の結果から，半夏瀉心湯の口内炎誘発機械的アロディニアの抑制には，乾姜含有成分による $Na_v1.8$ の抑制が関与しており，人参中のサポニン成分がその薬効を増強することが考えられる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Inhibition of oral ulcer-induced pain by shogaol and gingerol through sodium channel $Na_v1.8$ blockage

○Hitomi S，Ono K，Yamaguchi K，Inenaga K

Div Physiol, Kyushu Dent Univ

Recently, some clinical studies have demonstrated that the Japanese herbal medicine Hangeshashinto alleviates oral mucositis-induced pain in patients with chemo-radiotherapy. Hangeshashinto contains seven herbal extracts, but the pharmacological mechanism underlying analgesic effect has not been studied. In the present study, we investigated effects of selected 21 chemical ingredients in Hangeshashinto on a nociception-related channel, sodium channel $Na_v1.8$ using screening analysis systems and evaluated the analgesic effects of some ingredients on oral ulcer-induced pain in rats. [6]-shogaol and [6]-gingerol contained in an herbal extract processed ginger (PG) showed strong antagonistic effects on $Na_v1.8$. PG and the mixture of [6]-shogaol and [6]-gingerol slightly decreased mechanical pain hypersensitivity induced by oral ulcer in rats. However, by co-application with the other herbal extract ginseng contained abundant saponins, these ingredients significantly suppressed the mechanical pain hypersensitivity. Ginseng accelerated cell membrane permeability of the fluorescence substance FluoroGold in the ulcer region lack of the epithelial barrier. These results suggest that the oral ulcer-induced mechanical pain hypersensitivity is inhibited by antagonistic effect of [6]-shogaol and [6]-gingerol on sodium channel $Na_v1.8$, via ulcer region with drug delivery acceleration due to saponin-containing herbal extracts.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-170　ニコチンによるノルアドレナリントランスポーター発現調節機構の解明

○十川　千春[1,4]，大山　和美[2]，十川　紀夫[3]，小崎　健一[1]

[1]岡山大　院医歯薬　歯科薬理
[2]岡山大　院医歯薬　RI 実験
[3]松本歯大　歯科薬理
[4]岡山大　院医歯薬　歯先端研セ

［目的］ニコチンは，中枢並びに末梢神経系においてノルアドレナリン神経活動を修飾することによりさまざまな薬理作用を発揮している．ニコチンは脳の種々の領域で NA レベルを上昇させることが知られている．しかし，ノルアドレナリン量を調節するノルアドレナリントランスポーター（NET）に対する作用についてはこれまでほとんど研究されていない．本研究ではニコチンによる NET 発現制御および NET 機能就職作用の詳細な機序を明らかにすることを目的とし，NET 遺伝子転写制御におけるニコチンの影響を検討した．［方法］ヒト NET 遺伝子プロモーター領域を含む約 9 kb の NET 遺伝子 5' 領域を挿入したレポーターコンストラクトをヒト神経芽腫由来細胞株（SH-SY5Y および SK-N-AS 細胞）に一過性に導入して転写活性を調べた．また，第 1 イントロンの影響を調べるため，第 1 イントロン欠失ミュータントを作成し，転写活性を調べた．さらに，遺伝子導入後にニコチンを添加し，転写活性への影響を調べた．［結果］NET 遺伝子 5' 領域レポーターコンストラクトそれぞれの転写活性は細胞ごとに異なり，特にイントロン 1 の欠失の影響が SH-SY5Y と SK-N-AS では大きく違っていた．また，ニコチン（1 mM）を作用させた場合，いずれの細胞においても NET 遺伝子転写活性の上昇が見られた．また，SK-N-AS 細胞では，イントロン 1 領域がコアプロモーター領域と関連してニコチンによる NET 転写活性の調節を制御している可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Regulation of noradrenaline transporter gene expression by nicotine

○Sogawa C[1,4]，Ohyama K[2]，Sogawa N[3]，Kozaki K[1]

[1]Dept Dent Pharmacol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[2]RI Res Cent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci
[3]Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ
[4]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci

Nicotine is a potent sympathomimetic stimulant, and is believed to be responsible for the pathogenesis of cardiovascular diseases associated with cigarette smoking. One possible target of nicotine is the reuptake system for catecholamines, such as noradrenaline transporter（NET）. NET is a target of various drugs acting on the central nervous system, including psychostimulants. However, there is little evidence for nicotinic modulation of the uptake system including NET. To clarify the regulated expression of NET by treatment of nicotine, we focused on the structure and function of the 5'-flanking region of NET gene. We made constructs in plasmid carrying luciferase gene for reporter assays in transiently transfected human neuro brastoma cell lines（SH-SY5Y and SK-N-AS）. 5'-Deletion of NET gene constructs determined a core promoter region at 433 nucleotides upstream（-433）of transcription start site（+1）. The deletion of first intron caused an increase in luciferase activity in SH-SY5Y, suggesting the presence of silencer element for transcription. Treatment of nicotine increased a promoter activity of transfected NET in both SH-SY5Y and SK-N-AS. Furthermore, the deletion of first intron enhanced an increase in luciferase activity in only SK-N-AS.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-171　沖縄産オニダルマオコゼの背鰭に由来するレクチンの精製

○加藤　光司[1]，中川　秀幸[1,2]，篠原　光子[1]，大浦　　清[1]

[1]大阪歯大　薬理
[2]四国大　看護　薬理

【目的】背鰭や胸鰭などに毒腺が付随した鋭い刺棘を持つ魚を刺毒魚といい，日本近海には約 150 種が生息すると推定されている．今回，私たちは高級魚であるが背鰭に毒棘を持つ沖縄産オニダルマオコゼ *Synanceia verrucosa* の背鰭タンパク質に由来するレクチンの精製を試み，生物活性を検討した．【方法】沖縄県沿岸で採集したオニダルマオコゼ 3 個体の各背鰭毒嚢より毒液をシリンジで採取し，タンパク質画分とした．タンパク質画分の分画は吸着カラムを用い，回収した画分を native-PAGE で検定した．血球凝集活性はウサギ赤血球により，マイトジェン活性はマウス脾細胞を用いて MTT 法により測定した．【結果及び考察】背鰭タンパク質画分は赤血球凝集活性及びマイトジェン活性を示した．タンパク質画分を Concanavalin A-Sepharose カラムにより分画し，回収した非吸着画分 Con A-1 画分及び吸着画分 Con A-2 画分は共にマイトジェン活性を示した．そこで，回収率の高い Con A-1 画分を Phenyl Sepharose CL-4B カラムにより分画した．非吸着画分の Con A-1-PS-1 画分及び吸着画分 Con A-1-PS-2 画分は共に血球凝集活性を持ち，低濃度からマイトジェン活性を示した．マイトジェン活性は Con A-1-PS-1 画分より Con A-1-PS-2 画分の方が強かった．Con A-1-PS-2 画分による凝集活性はメチル-*α*-D-マンノシド及び D-マンノースにより特異的に阻害された．オニダルマオコゼの背鰭には D-マンノース結合性レクチンが存在すると思われる．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Purification of a novel lectin from the dorsal spines of the stonefish, *Synanceia verrucosa*

○Kato K[1]，Nakagawa H[1,2]，Shinohara M[1]，Ohura K[1]

[1]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ
[2]Dept Nursing Sikoku Univ

A novel lectin was purified from the dorsal spines of the stonefish, *Synanceia verrucosa* using a combination of affinity chromatography techniques. A single band was detected on a native PAGE gel with a relative molecular mass of 45 kDa. The agglutination of rabbit erythrocytes by the 45 kDa lectin was inhibited effectively by methyl *a*-D-mannoside. The 45 kDa lectin stimulated mitogenesis in murine splenocytes. These results suggest that the stonefish, *S. verrucosa* may be a novel source of biologically active substances.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-172 口腔扁平上皮癌細胞に傷害活性を有する新規クマリン誘導体類のデザイン（その2）

○石原真理子[1]，山内　雅司[2]

[1]明海大　歯　化学
[2]明海大　歯　医療情報

【目的】以前，クマリン化合物類の構造とヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞傷害活性に有意な相関関係があることを報告した．その結果をもとに，ヒト口腔癌細胞により高い活性を持つ新規クマリン化合物の分子設計をおこなった．【方法】分子記述子はCONFLEX5ソフトウエアで最安定配座を決定後，MOPAC/PM5法で計算した．新規化合物の分子設計はACD/Structure Design Suiteソフトを用いた．【結果と考察】ACD/Structure Design Suiteを用いてクマリン骨格の7位の置換基変換により想定された対象化合物は781種類にのぼった．そこで以前の実験結果から，クマリン化合物のオクタノール－水分配係数（Log P）は2.4付近に活性があったので，Log P値2.3～2.6が予想される化合物に絞り込み検索をおこない，167種類の化合物を想定した．これらの化合物の分子記述子（生成熱，水和の安定性，HOMOエネルギー，LUMOエネルギー，絶対ハードネス，絶対電気陰性度，反応指数，分子の表面積，体積等）を求め，これらの結果から，細胞傷害活性が期待される新規化合物類のデザインを 行っている．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The designing of the new derivatives of Coumarin having cytotoxic activity to human oral tumor cell（Part 2）

○Ishihara M[1]，Yamauchi M[2]

[1]Div Basic Chem Oral Biol, Tissue Engineering, Meikai Univ Sch Dent
[2]Div Medical Informatics Dept Community Health Sci, Meikai Univ Sch Dent

［Object］I have previously reported the structure of the Coumarin and cytotoxic activity of human oral squamous cancer cell and a leukaemia cell were good correlation. As a result, I made designed molecular of a new Coumarin compounds with a high activity to a human oral tumor cell.［Calculation］The most stable configuration of the Coumarin was calculated by CONFLEX 5 and the MOPAC/PM5 method. Molecular designs of a new compounds were performed by Design Suite software.［Result and discussion］The substituted Coumarin at 7-position which were assumed by Design Suite were 781 compounds. So the octernol-water partition coefficients（Log P）for the cytotoxic active Coumarin were around 2.4 from an experimental result, the examined Coumarins were narrowed down to 167 compounds by calculated values of the Log P and consideration of easiness to synthesize. Now, these chemical descriptors（heat of formation, HOMO energy, LUMO energy, absolute hardness, reaction index, surface area of the molecule and the volume, etc.）have been determined by CONFLEX/PM5 and then have been searched the new compounds are able to expect cytotoxic activities.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-173　覚醒サル腹側運動前野ニューロンの熱刺激に対する応答

○海野　俊平，岩田　幸一

日本大　歯　生理

痛みに関連する脳機能イメージング研究における前頭前野等の活動および一次運動野や前頭前野，運動前野に対する電気刺激や反復経頭蓋磁気刺激法等による痛みの軽減効果は繰り返し報告されており，前頭葉には痛みの受容や鎮痛に関わる領域が複数存在すると考えられる．本研究では，温度感覚および痛覚受容における前頭葉の役割を明らかにするために，2 頭のニホンザルに熱刺激の温度変化を弁別する課題を訓練し，前頭葉より顔面領域に需要やを有するニューロンの課題遂行中の活動を記録した．サルの口髭部に設置した熱刺激用プローブより熱刺激を与えた．課題ではサルがボタンを押すとプローブ温度が 35℃から 45-47℃に上昇する（T1 期間）．ボタンを押し続けると温度がさらに 0.2-0.8℃上昇し（T2 期間），サルがこの温度変化を検出し 3 秒以内にボタンを離せば報酬としてジュースが与えられる．訓練完成後，サル前頭葉より課題遂行中の単一ニューロン活動を記録した．一部のニューロンは T1 と T2 の両方の温度変化に応答したが，多くのニューロンは T1 または T2 のどちらか一方の温度変化にのみ応答した．また T2 期間のニューロン活動の応答潜時は，サルのボタン離しの反応時間と相関していた．脳組織標本の作製を行い，記録部位を同定したところ，熱刺激に応答するニューロンは腹側運動前野に限局して存在していた．これらの結果は腹側運動前野ニューロンの活動が熱刺激弁別課題における微小な温度変化の検出に重要な役割を果たしていることを示唆している．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Neuronal response to thermal stimuli in the monkey ventral premotor cortex

○Unno S，Iwata K

Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ

Involvement of frontal cortices in nociception and analgesia has repeatedly been reported in functional brain imaging and brain stimulation studies. In this study, two monkeys were trained to discriminate thermal stimuli applied to their faces, and single neuronal activities were recorded in the ventral premotor cortex（PMv）during thermal detection task. When the monkey pressed the button, a thermal stimulus（45-47 deg C）was applied（T1 stimulus）to the mustache region. At 4 to 8 seconds after holding the button press, the temperature of the stimulus was slightly increased（0.2-0.8 deg C）（T2 stimulus）. The monkey was rewarded by releasing the button within 3 s after the onset of T2 period. Many neurons responded to either T1 or T2 stimulus, but not both. The latencies in responses to T2 stimuli were correlated to the reaction times of button releasing. These results suggest that PMv neurons play an important role in discriminating slight changes in thermal stimuli.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-174 ビタミンC欠乏動物における様々な濃度のビタミンC水溶液に対する行動学的応答

○安尾　敏明，諏訪部　武，硲　　哲崇

朝日大　歯　口腔生理

ビタミンは，きわめて微量で動物の正常な生理機能を保持する必要不可欠の栄養素であり，食物から取り入れなければならない大切な栄養素である．しかしながら，その必要量は微量であるため，どのように動物はビタミンを摂取しているのかその詳細は不明である．この機序を明らかにするために，我々は，ビタミンC（以下，VC）合成能欠如ラットを用いた行動学的解析を行い，VC欠乏前と比べ欠乏時は2 g/l VC水溶液に対する嗜好率（対蒸留水）が増加することを報告した．しかし，欠乏動物がその欠乏した微量栄養素を摂取する場合，その含有量の違いによって摂取行動を変えるのかについては未だ不明である．そこで，本研究では，VC欠乏時にVC水溶液の濃度の違いによって行動応答が変化するのかどうかを明らかにするために，同様のラットを用いて欠乏前後の様々な濃度（0.1，0.3，1，3，10，30及び100 mM）のVC水溶液に対する嗜好率（対蒸留水）を48時間2瓶法にて計測し，解析した．その結果，1 mM群では，欠乏後の嗜好率はVC摂取に伴い徐々に増加していくが，3 mM群では，欠乏後数日まで増加したが，その後，欠乏前と近い値まで徐々に減少していった．10，30，100 mM群では，いずれも欠乏前の嗜好率は低いが，欠乏後は増加し，VC摂取に伴い，減少していった．0.1及び0.3 mM群では，欠乏後，VC水溶液を摂取するが，大部分のラットが欠乏状態から回復しなかった．また，1日あたりのVC水溶液摂取量は，1及び3 mM群では，欠乏時徐々に増加していくが，10 mM以上の濃度群では減少する結果になった．以上の結果から，欠乏した微量栄養素の含有する濃度の違いによって，選択摂取行動が異なることが明らかとなった．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## The behavioral responses to various concentration of vitamin C solutions in vitamin C deficient rats

○Yasuo T，Suwabe T，Sako N

Dept Oral Physiol, Asahi Univ Sch Dent

Vitamins are essential micronutrients that contribute to a healthy life. They cannot be synthesized in sufficient quantities by an organism and must be obtained from the diet. However, the behavioral mechanisms to ingest sufficient vitamin are not yet clear. Therefore, we conducted some behavioral experiments by using Osteogenic Disorder Shionogi（ODS）/Shi Jcl-od/od（od/od）rats, which are unable to synthesize vitamin C（VC）to get more understanding about these behavioral mechanisms. The preferences for various concentrations of VC solution were evaluated before and after deprivation of VC solution in od/od rats by using two-bottle preference test（48 hours）. When rats were subjected to deprivation of VC solution for 25 days, their preferences for 1, 3, 10, 30 and 100 mM of VC solutions were significantly greater than those before deprivation. Interestingly, the 10 mM, 30 mM and 100 mM rat groups initially rejected the VC solutions, but their preference for these VC solutions were increased when they were deprived VC. On the other hand, the preferences for 0.1 mM and 0.3 mM VC solutions did not show any significant change. These results suggest that VC-deficient rats may have the different behavioral responses to various concentrations of VC solutions.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-175　小学校児童における味覚の現状

○佐伯　周子，井出　良治，高橋　誠之，今井　敏夫

日本歯大　生命歯　生理

【目的】味覚は食習慣の基礎であり学童期の食育に影響する要素と考えられる．今回，我々は小学校児童の味覚の現状を把握することを目的として味覚検査を実施した．なお本調査は，千葉県市川市教育委員会主催「ヘルシースクール推進事業」の一環として行なわれたものである．【方法】平成 25 年秋に 5 年生児童 202 人を対象に行なわれた味覚検査結果を検討した．検査対象は 5 基本味のうち小児に忌避的要素が少ないと考えられる甘味と塩味の 2 種類を選択し，昼食前（11:00-12:00）に全口腔法を用いて検査した．甘味溶液（ショ糖水）と塩味溶液（食塩水）はそれぞれ濃度を 3 段階（甘味は 4.6 mM, 18.3 mM, 36.5 mM；塩味は 3.3 mM, 13.4 mM, 26.7 mM）用意し，薄い濃度から順に，さらに甘味から先に実施した．児童は各濃度の溶液を 10 ml/回口に含み，以下の 4 つから 1 つ選ぶ形で各自判定を行なった；水と同じ，水とちがう，あまい味，食っぱい味．尚，本調査は日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会の承認を得た．【結果】甘味 173 名と塩味 178 名の評価により，過半数（それぞれ 55％と 72％）の児童が 18.3 mM（甘味）と 13.4 mM（塩味）で味を認知した．無回答（塩味 1 名）を除き，評価から除外された児童は 29 名（甘味）と 23 名（塩味）おり，甘味と塩味を認知できなかった児童（それぞれ 12 名と 16 名）の他に，甘味を塩っぱいという錯誤（あるいはその逆）がそれぞれ 16 名と 7 名だった．【考察】小学生の味覚に関する検査データは未だ限られており，本検査の結果は学童期の味覚感度を調べる上で有用な情報を提供する可能性がある．また，評価から除外された児童の半数前後にみられた味の錯誤について方法論的な影響が除外できるか考察を加える．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Whole mouth gustatory test on elementary school-age children

○Saiki C，Ide R，Takahashi M，Imai T

Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo

We examined the sweet and salty taste thresholds by whole mouth gustatory in the fifth-grade（aged 11-12）public elementary schoolchildren（n＝202）of the City of Ichikawa in Chiba Prefecture.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-176　傾斜計を用いた食塊物性測定

○塩澤　光一，奥村　　敏

鶴見大　歯　口腔生理

【目的】嚥下に適する食塊物性は摂取する食品タイプ毎に異なっており，液状食品から固形食品に到る食塊物性を同一装置で簡単に測定する方法は存在しない．そこで今回我々は，簡単な傾斜計を用いることにで，各種食品の食塊物性が測定できるか否かについて検討した．【方法】傾斜計は，傾斜板，角度計および駆動系（傾斜板を 1 度/秒で傾斜させる）から成る．角度の測定は，試料が動き出す角度（SA）と 25 mm 先のラインに到達する角度（AA）を求めた．ケチャップ（K），トウフ（T），米飯（CR），ビスケット（B）を試験食品とした．始めにこれらの食品の SA と AA を求めた．次に，8 名の被験者（男性 4 名，女性 4 名，平均 28.4 歳）にこれらの食品（8 g）を咀嚼させて嚥下直前の食塊を回収し，その SA と A を求めた．本研究は鶴見大学歯学部倫理委員会の承認（1020）を得て行った．また，開示すべき COI は無い．【結果と考察】各試料の咀嚼前と嚥下直前の食塊の SA と AA を比較すると，K では有意な変化は認められなかったが，T と CR は咀嚼前に比べて嚥下直前の食塊では有意に小さな値を示した．これに対し B では SA と AA は嚥下直前には有意に大きな値を示した．AA と SA の差（移動していく食塊の性質を示す）は K では咀嚼前と嚥下直前では有意差は認められなかったが，T，CR および B ではいずれも嚥下直前には有意に大きな値を示した．これらの結果から，傾斜計を用いることによって，比較的簡単に食塊物性を測定できることが示された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Measurement of physical properties of food bolus with incline analysis

○Shiozawa K，Okumura S

Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med

We attempted the newly developed incline analysis for measurement of the properties of several types of food bolus. This system consisted of a sliding bar, gonioed meter, and a motor control system which tilted the sliding bar at an angular velocity of 1 degree/s. We measured the angle which the food sample began to slide down the bar（starting angle; SA）and then when it passed over the ending line（25 mm apart from the starting line, arrival angle; AA ）. Fore foods（ketchup, K; tofu, T; cooked rice, CR, biscuit, B）were used as the test foods. Eight adult subjects（mean age 28.4 y）participated. They were asked to normally masticate each food just before swallowing, and spit the bolus into the cup. There was no significant difference between SA and AA for the K. Both SA and AA for the T and the CR bolus were significantly smaller than those for the T and CR before mastication. In contrast, both SA and AA for the B bolus were significantly lager than those for the B before mastication. These results suggest that the incline analysis can measure the physical property of food bolus.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-177 D-dopachrome tautomerase 遺伝子転写における FOXO1 と PGC1α の関与

○岩田　武男[1]，栗林　恭子[2]，吉本　勝彦[1]

[1]徳島大　院医歯薬　分子薬理
[2]獨協医大　口腔外科

【目的】インスリン抵抗性改善作用を有するアディポカイン D-dopachrome tautomerase（DDT）は肥満者の脂肪細胞で発現が低下することから，DDT の発現調節の破綻と肥満の病態との関連が示唆される．前駆脂肪細胞における DDT 遺伝子の転写活性は AMP-activated protein kinase（AMPK）の活性化により上昇する．そこで AMPK シグナルの下流の転写因子である FOXO1 と PGC1α の DDT 転写への関与を検討した．
【方法】FOXO1 の常時活性型変異体（FOXO1-CA）および PGC1α を発現させたヒト前駆脂肪細胞株 SGBS 細胞での DDT 発現量をリアルタイム RT-PCR により検討した．またルシフェラーゼアッセイにより FOXO1-CA と PGC1α の強発現が DDT 転写活性に及ぼす影響を調べた．さらに ChIP アッセイにより DDT プロモータ領域の FOXO1 結合部位の同定を試みた．
【結果】FOXO1-CA と PGC1α の共発現は SGBS 細胞での DDT mRNA 発現を上昇させた．FOXO1-CA あるいは PGC1α を過剰発現させた細胞では DDT 転写活性の上昇が認められた．さらに，FOXO1-CA と PGC1α の共発現は相乗的な効果を示した．ChIP アッセイにより DDT 遺伝子の転写開始点より上流 2,900 bp の間に，少なくとも 2 箇所の FOXO1 結合領域が認められた．
【結論】FOXO1 と PGC1α は前駆脂肪細胞での DDT 発現を促進する転写調節因子と考えられた．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Involvement of FOXO1 and PGC1-alpha in transcription of D-dopachrome tautomerase gene

○Iwata T[1]，Kuribayashi K[2]，Yoshimoto K[1]

[1]Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci
[2]Dept Oral Max Surgery, Sch Med, Dokkyo Med Univ

D-dopachrome tautomerase（DDT）is an adipokine that improves insulin resistance in obesity. Its expression is lower in adipocytes of obese patients, suggesting that disruption of the transcriptional regulation may be a cause of insulin resistance in obesity. We reported that activation of AMP-activated protein kinase（AMPK）enhanced transcription of DDT gene in SGBS cells, a human preadipocyte cell line. In this study, we investigated whether FOXO1 and PGC1-alpha, downstream genes of AMPK signaling, are involved in DDT gene transcription.
We investigated effects of overexpression of constitutive active form of FOXO1（FOXO1-CA）and/or PGC1-alpha on DDT mRNA expression in SGBS cells and transcriptional activity of DDT gene by luciferase assay. Furthermore, we attempted to identify the FOXO1 recognition site（s）in DDT promoter by ChIP assay.
Overexpression of FOXO1-CA and PGC1-alpha increased DDT mRNA levels in SGBS cells. Either transfection of FOXO1-CA or PGC1-alpha enhanced transcriptional activity of DDT gene and the combined transfection showed the synergistic effects. At least two FOXO1-binding sites were identified among 2,900 bp upstream from the initiation codon of DDT gene by ChIP assay. We concluded that FOXO1 and PGC1-alpha act as transcriptional factors for DDT gene expression in preadipocytes.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## P2-178 哺乳類細胞における効率的なルシフェラーゼ遺伝子発現のためのコドン最適化と生物発光イメージング: 歯学研究への応用

○鈴木　崇弘[1]，江頭　美喜[2]，河合　達志[2,3]，金森　孝雄[1,3]，井上　　敏[4]

[1]愛院大　歯　生化，[2]愛院大　歯　歯科理工，[3]愛院大　歯　未来口腔医療研究センター，[4]JNC（株）横浜研

我々はこれまでに，生細胞におけるタンパク質の分泌動態を可視化する「ビデオレート生物発光イメージング法」を開発し，膵β細胞株における周期性インスリン分泌の定量的な可視化と，遊走がん細胞先導端からのMMP-2の極性分泌を報告した．現在，骨形成関連タンパク質の分泌動態と歯科材料の細胞毒性解析などに応用し，研究を進めている．ルシフェラーゼの微弱な発光酵素反応を検出する生物発光イメージング法では，哺乳類細胞で外因性のルシフェラーゼ遺伝子を高発現させることが望まれる．最近では，哺乳類細胞で導入遺伝子を効率的に発現させるために，遺伝子のコドン最適化がソフトウェアを使用した複数の方法で行われている．今回我々は，ヒトで使用頻度が高いコドンのみを選択する，簡便なコドン最適化法（preferred human codon-optimized method; Preferred法）により，各種ルシフェラーゼの高発現が可能であることを報告する．ガウシアルシフェラーゼを含む4種のルシフェラーゼと2種の発光タンパク質について，Preferred法でヒト最適化遺伝子を人工合成し，CHO-K1細胞に発現させたところ，すべてが野生型遺伝子よりも高い発光活性を示した．特に，分泌タンパク質の生物発光イメージングに有用なガウシアルシフェラーゼについては，各種ヒトがん細胞株，正常ヒト歯肉線維芽細胞およびMC3T3-E1マウス骨芽細胞株において，Preferred法によるヒト最適化遺伝子（pGLuc）が汎用のヒト化遺伝子より高い発光活性を与えた．また，Preferred法でコドン最適化したオプロフォーラスルシフェラーゼの変異19 kDaタンパク質（nanoKAZ）遺伝子を用いて，細胞質および分泌経路に発現させたnanoKAZタンパク質を生物発光イメージング法により可視化できた．Preferred法は，哺乳類細胞においてルシフェラーゼを含む様々なタンパク質の遺伝子発現を効率的に行う上で，簡便で有用なコドン最適化法であると考えられた．**【利益相反】**利益相反状態にあります．

## Codon optimization of luciferase genes for efficient protein expression in mammalian cells and bioluminescence imaging: its application for dentistry research

○Suzuki T[1]，Egashira M[2]，Kawai T[2,3]，Kanamori T[1,3]，Inouye S[4]

[1]Dept Biochem, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent，[2]Dept Dent Mater Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent，[3]Center Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ，[4]JNC Yokohama Res Center

Bioluminescence imaging is a method for visualizing the weak luminescence signals derived from the luciferase reaction, and this method requires efficient expression of luciferase. For highly efficient protein expression of heterologous genes in mammalian cells, the codon-optimized genes have been designed using several software applications. We here report a simple method for codon-optimization by choosing only codons preferentially used in human genes, and refer it to “preferred human codon-optimization method”. The preferred codon-optimized genes of four luciferases and two photoproteins were chemically synthesized and transiently expressed in CHO-K1 cells. All preferred codon-optimized genes showed higher luminescence activity than the corresponding wild-type genes. *Gaussia* luciferase（GLase）is useful for visualizing protein secretion. We transfected a preferred codon-optimized gene of GLase（pGLuc）into several human cancer cells, normal human gingival fibroblasts, and MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. As a result, we observed that pGLuc was more efficiently expressed than a general codon-optimized GLase gene. Further, we successfully visualized a mutated 19 kDa protein of *Oplophorus* luciferase expressed with nanoKAZ, a preferred codon-optimized gene, both in cytosol and in the secretory pathway. In conclusion, our simple codon-optimized method is considered to be useful for the expression of various proteins in mammalian cells.
***Conflict of Interest*:** The authors declare conflicts of interest with this manuscript.

## S-1　ヒト星状神経節における TRPV1 および TRPV2 の分布

○藤井　勇記，佐藤　　匡，清水　良央，市川　博之

東北大　院歯　口腔器官構造

星状神経節は交感神経節後ニューロンの集団である下頚神経節と第一胸神経節が癒合して形成される．これらのニューロンを支配する節前ニューロンは，上部胸髄に存在し，節後線維は主に頚部や上胸部を支配し，血管の収縮や心拍数・心収縮力の増加・気管支平滑筋の弛緩などを行っている．また，局所麻酔薬などを浸透させる星状神経節ブロックにより，交感神経の機能を一時的に抑制し，頭頸部の痛みを緩和することが可能であることが知られている．このことから，星状神経節における交感性ニューロンは頭頚部における痛覚の伝達に関与することが示唆されている．

transient receptor potential（TRP）ion channel の一つである TRPV1 が発見され，一次感覚神経細胞に特異的に存在することが報告されている．この TRPV1 はカプサイシンレセプターであるとともにプロトンや 43℃以上の熱刺激に対しても反応するセンサーである．一方，TRPV2 は，52℃以上の熱刺激や機械的な刺激に対するセンサーとして働いている．本研究では，東北大学歯学部における解剖実習に用いられたご遺体からヒト星状神経節と胸髄を採取し，TRPV1 及び TRPV2 の分布を明らかにした．

星状神経節では，多くの交感神経節後ニューロンが TRPV1（25.3%）及び TRPV2（16.2%）を含んでいた．これらのニューロンは小型よりも大型のものが多かった．また，TRPV2 陽性線維が節後ニューロンと取り囲んでいるのも観察された．それらのニューロンの細胞体には，TRPV2 の発現が認められるものもあった．胸髄側角においては，多くの交感神経節前ニューロンが TRPV2 を含んでいた．

以上の結果から，ヒト星状神経節及び胸髄には，TRPV1 や TRPV2 を含む神経回路が存在することが明らかとなった．これらのセンサーは，交感性ニューロンの活性に関与し，頭頚部における痛覚の伝達に関与するかもしれない．

**【会員外共同研究者】**国分壮一氏・小川主税氏・工藤快氏・後藤宏樹氏（東北大）

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Distribution of TRPV1 and TRPV2 in the human stellate ganglion and spinal cord

○Fujii Y，Sato T，Shimizu Y，Ichikawa H

Div Oral Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Immunohistochemistry for the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1（TRPV1）and 2（TRPV2）was performed on the stellate ganglion and spinal cord in human cadavers. In the stellate ganglion, 25.3% and 16.2% of sympathetic neurons contained TRPV1- and TRPV2-immunoreactivity, respectively. The cell size analysis also demonstrated that proportion of TRPV1- or TRPV2-immunoreactive（-IR）neurons among large sympathetic neurons（TRPV1, 30.7%; TRPV2, 27.0%）was higher than among small sympathetic neurons（TRPV1, 22.0%; TRPV2, 13.6%）. The present study also demonstrated that 10.0% of sympathetic neurons in the stellate ganglion had pericellular TRPV2-IR nerve fibers. Fourteen percent of large neurons and 7.8% of small neurons were surrounded by TRPV2-IR nerve fibers. TRPV2-immunoreactivity was also detected in about 40% of neuronal cell bodies with pericellular TRPV2-IR nerve fibers. In the lateral horn of the human thoracic spinal cord, TRPV2-immunoreactivity was expressed by some neurons and many varicose fibers surrounding TRPV2-immunonegative neurons. TRPV2-IR pericellular fibers in the stellate ganglion may originate from the lateral horn of the spinal cord. There appears to be TRPV1- or TRPV2-IR sympathetic pathway in the human stellate ganglion and spinal cord.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-2 骨芽細胞特異的副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）トランスジェニックマウスにおける歯胚および歯槽骨の組織化学的検索

○山崎　七愛[1]，山本知真也[2]，長谷川智香[2]，本郷　裕美[2]，原口　真衣[2]，織田　公光[3]，小守　壽文[4]，網塚　憲生[2]

[1]北大　院歯
[2]北大　院歯　硬組織発生
[3]新潟大　院医歯　口腔生化
[4]長崎大　院医歯薬　口腔生化

【目的】 副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)は胎生期における上皮間葉相互作用に重要な役割を担うことから，歯胚の発生では，上皮系細胞から分泌されたPTHrPが周囲の骨組織に作用することが指摘されてきた．そこで，今回我々は骨芽細胞特異的にPTHrPを過剰発現させたマウスの下顎骨の臼歯歯胚と歯槽骨を組織化学的に検索した．【方法】 マウス骨芽細胞特異的な1型コラーゲンのプロモーターの下流にPTHrP cDNAを組み込んだvectorを構築しPTHrPトランスジェニック（Tg）マウスを作製した．胎生18日齢のPTHrP Tgマウス胎仔の下顎骨をパラホルムアルデヒドで浸積固定し4.13% EDTAで脱灰後，通法にてパラフィン包埋後，組織非特異型アルカリフォスファターゼ(TNALP)，ピロリン酸合成酵素(ENPP1)，酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)，骨細胞初期マーカーであるE11組織化学を行った．【結果】 PTHrP Tgマウスでは，臼歯歯胚の大きさ・形状が変わらないことから，PTHrP過剰産生は臼歯歯胚の発生に大きく影響を及ぼさないと推測された．歯胚周囲の歯槽骨は骨梁があまり形成されておらず，代わりに，多数のTNALP陽性線維性組織が観察された．ごく僅かに形成された骨梁のまわりには多数のTRAP陽性破骨細胞を認めた．また，骨梁の基質は幼弱な組織像を示し，その内部に埋め込まれた骨細胞は，非常に弱いE11陽性を呈する一方，ENPP1強陽性を示した．【考察】 骨芽細胞から過剰産生されたPTHrPは，歯胚形成には大きな影響を及ぼさなかったが，autocrine/paracrine的に歯槽骨の骨芽細胞・骨細胞に影響を及ぼすと考えられた．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Histochemical assessment of tooth germ and alveolar bone in transgenic mice over-expressing parathyroid hormone-related peptide in osteoblasts

○Yamazaki N[1]，Yamamoto T[2]，Hasegawa T[2]，Hongo H[2]，Haraguchi M[2]，Oda K[3]，Komori T[4]，Amizuka N[2]

[1]Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[2]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med
[3]Div Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[4]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci

［Purpose］This study aims to elucidate the biological function of parathyroid hormone-related peptide（PTHrP）in developing tooth germs and osteoblasts/osteocytes in alveolar bone, by examining transgenic（Tg）mice over-expressing PTHrP in osteoblasts.［Materials and Methods］Tg mice over-expressing PTHrP were generated by inserting the PTHrP cDNA downstream type I collagen promoter specific to osteoblasts. Mandibles of E18 fetuses embedded in paraffin were histochemically examined for tissue nonspecific alkaline phosphatase（TNALP）, tartrate-resistant acid phosphatase（TRAP）, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1（ENPP1）, and E11, a hallmark for early stage of osteocytes.［Results and discussion］PTHrP Tg mice showed no obvious histological abnormality on the teeth germs of molars. There was a few trabecules in the region of alveolar bone. But, instead, many TNALP-positive preosteoblastic cells occupied this area, accompanied with a large number of TRAP-reactive osteoclasts. Osteocytes embedded in immature bone of the trabecules showed markedly-reduced immunoreactivity for E11, but revealed an intense reactivity of ENPP1. It seems likely that over-expressed PTHrP in osteoblasts would affect the osteoblasts and osteocytes in the alveolar bone, rather than tooth germs.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-3 唾液マーカーとストレスの関係

○秦　　史子[1]，葛城　啓彰[2]

[1]日歯新潟，[2]日歯新潟　微生物

【緒言】唾液中には多くのタンパク，ホルモン等が含まれ全身の健康状態と深い関係があると言われている．唾液分泌量に関してはサクソンテストやガムテストなど簡便に評価できる方法が確立されているが，唾液成分の質的評価とストレスとの関係についてはまだ一定の見解が得られていないのが現状である．そこで今回，幾つかの有用と思われる唾液マーカーについて多角的に検討を行った．【対象と方法】研究の意図を説明し同意を得た健常者(学生ボランテイア)30 名を対象とし，これらの被験者より 1 か月おきに唾液を採取した．ガムテストにより唾液分泌量を測定後，インピーダンス測定法により唾液中細菌数，酵素分析法により唾液アミラーゼ活性，白金電極法により唾液酸化還元電位，ELISA 法により唾液タンパク濃度および亜鉛濃度を測定し多角的に検討した．唾液採取時にバイタルサインを測定すると共にパルスオキシメーターで SpO2 を測定しストレスマーカーの指標の 1 つとした．本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部倫理審査委員会の許（ECNG-R-6）を得て行った．統計処理は Kyplot(カイエンス，東京)により行った．【結果】健常者でも唾液分泌量の低下を示すものが認められ唾液分泌量と酸化還元電位の間には有意な相関が認められた．唾液分泌量と唾液中細菌数，アミラーゼ活性，タンパク濃度に関しては有意な相関は認められなかった．以上の事から唾液分泌量以外にも全身ストレスマーカーとして唾液の酸化還元電位が有用であることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Saliva components as a possibility of systemic stress marker

○Hata F[1]，Katsuragi H[2]

[1]Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata，[2]Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata

**Objective:** There were a lot of proteins and physiological active substances in saliva, and they reflected the general condition. The quantity of saliva will be easily, checked by Saxon test or gum test however the quality of saliva is difficult to analyse. Then we attempt to study multiple analysis of saliva as a useful systemic stress marker. **Method:** We used 30 healthy young volunteers aged 18-25, 15 males, 15 females, and gave them the explanation of the purpose of this research and informed consent. We checked the amount of saliva(gum test), amylase activity, protein and Zn2+ concentration(ELISA), bacterial numbers in saliva(impedance determination), oxidation-reduction potential(OPR, platinum electrode method). This research was supported by the ethical committee of Nippon Dental University school of Life Dentistry at Niigata（ECNG-6). **Results:** Some healthy young volunteers showed the lower amount of saliva and there was a significant relationship between the quantity of saliva and OPR. Otherwise there was not significant relationship between the amount of saliva and amylase activity, protein, Zn2+ concentration, bacterial numbers in saliva. These results suggested that OPR in saliva have a potential as a systemic stress marker.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-4　歯胚発生過程における RELM-β/FIZZ2 局在

○高濱　　暁[1]，細矢　明宏[2]，中村　浩彰[2]

[1]松本歯大
[2]松本歯大　口腔解剖Ⅱ

【目的】Resistin-like molecule-β/found in inflammatory zone 2（RELM-β/FIZZ2）は消化管や肺胞上皮で局在が認められる分泌タンパク質で，糖代謝や炎症に関与すると考えられている．本研究では，歯の発生過程における RELM-β/FIZZ2 の局在を明らかにする目的で，免疫組織化学的に観察を行った．【材料および方法】胎生（E）15 日～生後（P）28 日齢 Lewis 系ラット下顎第一臼歯を 4%パラホルムアルデヒドにて固定後，通法に従いパラフィン切片を作製し，RELM-β/FIZZ2 の免疫局在を観察した．【結果と考察】蕾状期（E15）歯胚において，歯槽骨周囲で陽性反応が認められたが，歯胚内部に特異的な反応は認められなかった．帽状期（E17）および鐘状期（E20）では，一部の内エナメル上皮で弱い陽性反応が観察されたが，他のエナメル器，歯乳頭および歯小嚢は陰性であった．歯根形成初期（P7）になると Hertwig 上皮鞘の細胞が陽性反応を示し，歯乳頭および根尖部象牙質との間に RELM-β/FIZZ2 陽性の基質が認められた．この陽性反応は，P28 で歯根表面にセメント質が形成されると歯根上部で消失したが，Hertwig 上皮鞘近傍では局在が持続していた．以上の結果から，RELM-β/FIZZ2 は Hertwig 上皮鞘の細胞が歯乳頭側へ分泌し，歯根の伸張ならびにセメント質形成を調節していることが示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Immunohistochemical localization of RELM-beta/FIZZ2 during tooth development

○Takahama A[1]，Hosoya A[2]，Nakamura H[2]

[1]Matsumoto Dent Univ
[2]Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ

Resistin-like molecule-beta/found in inflammatory zone 2（RELM-beta/FIZZ2）is a secretory protein that is localized in epithelium of gastrointestinal tract and lung alveolus. Previous reports have suggested that this protein regulates glucose metabolism and inflammation. In the present study, to analyze the involvement of RELM-beta/FIZZ2 in tooth development, we examined the immunohistochemical localization of RELM-beta/FIZZ2 in rat tooth germs. Rat mandibles were collected at embryonic days（E）15-20 and postnatal days（P）7-28. These samples were embedded in paraffin, and sectioned. Immunohistochemical stainings for RELM-beta/FIZZ2 was carried out. RELM-beta/FIZZ2 localization was hardly detected at the bud（E15）stage. At the cap（E17）and bell（E20）stages, this protein was detectable in the inner enamel epithelium, but other enamel organ, dental papillae, and dental follicle did not show the reactivity. During the root formation stage（P7-28）, cells in Hertwig's epithelial root sheath（HERS）localized RELM-beta/FIZZ2. Intense immunoreactivity was also seen in the matrix of dental papillae and root dentin facing the HERS. These results suggest that RELM-beta/FIZZ2 is mainly localized in the matrix between HERS and dental papillae, and might regulate root elongation and cementum formation.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-5 マウスの歯胚における *Hey1* および *Hey2* 遺伝子の発現パターン解析

○木部　琴乃[1]，中富　満城[2]，片岡　真司[2]，豊野　　孝[2]，瀬田　祐司[2]

[1]九歯大
[2]九歯大　解剖

【目的】将来的な歯の再生の実現の為には歯の正常発生過程の解明が不可欠である．本研究で着目する Hairy 関連転写因子群の *Hey1* および *Hey2* 遺伝子は，四肢，心臓，脈管等の形成に重要な役割を果たす事が知られている．しかし歯胚発生における機能については未解明である為，本研究では歯胚における両遺伝子の発現パターンを詳細に解析した．【方法】野生型マウスの胎仔および新生仔の頭部を 4% PFA にて固定後，脱水しパラフィンに包埋した．前頭断または矢状断にて 4 $\mu$m の組織切片を作成し，*in situ* hybridization 法により *Hey1* と *Hey2* の mRNA の発現を検出した．また臼歯歯胚より total RNA を抽出し，*Hey1* と *Hey2* の RT-PCR 解析を行った．【結果】臼歯歯胚形成過程において上皮肥厚期および蕾状期には両遺伝子の発現は認められなかった．*Hey1* は鐘状期後期の内エナメル上皮と象牙芽細胞下層に強い発現が観察され，歯根形成期にかけて歯髄全体に発現が拡大した．一方 *Hey2* は帽状期の内エナメル上皮の一部に強い発現が検出され，鐘状期には内エナメル上皮のほぼ全体に発現が拡大した．基質分泌期以降は発現が急激に低下した．RT-PCR により臼歯歯胚における両遺伝子の発現が確認された．切歯歯胚において *Hey1* は象牙芽細胞下層に強く発現し，*Hey2* は形成端（apical bud）に限局して発現していた．【考察】*Hey2* は臼歯と切歯の双方で内エナメル上皮に特異的な発現を示した事から，*Hey2* はエナメル芽細胞の分化に関与すると推察される．一方 *Hey1* は細胞分化期のエナメル芽細胞に加えて間葉由来の象牙芽細胞下層で強い発現が認められた．以上より歯胚発生過程における *Hey1* と *Hey2* の時期特異的・領域特異的発現パターンが認められ，両遺伝子が歯胚形成に異なる機能を果たす可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Spatiotemporal expression patterns of *Hey1* and *Hey2* during mouse tooth development

○Kibe K[1]，Nakatomi M[2]，Kataoka S[2]，Toyono T[2]，Seta Y[2]

[1]Sch Dent, Kyushu Dent Univ
[2]Div Anat, Kyushu Dent Univ

It is important to elucidate the entire mechanism of normal tooth development to realize tooth regeneration in the future. In this study, we focused on *Hey1* and *Hey2* genes, which encode Hairy-related transcription factors and are known to be involved in heart and limb development. As their roles in tooth development have not been reported, we studied their detailed gene expression patterns during odontogenesis by *in situ* hybridization and RT-PCR analyses using pre- and post-natal wild-type mice. In the epithelial thickening and bud stages of molar germs, both genes were not expressed. *Hey1* transcripts were detected in the differentiating ameloblasts and the dental pulp cells in the pulp horn region in the late-bell stage. *Hey1* expression widely spread over the pulp in the root formation stage. By contrast, *Hey2* was expressed only in the enamel epithelium from the cap stage to the late bell stage. *Hey2* expression became barely detectable in post-natal molar germs. RT-PCR confirmed these observations. In incisors, *Hey1* was expressed in the sub-odontoblastic layer while *Hey2* transcripts were recognized within the apical bud only. Our data suggest that *Hey1* and *Hey2* may play different roles during tooth development.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-6 *c-fos* 遺伝子欠損マウスにおける骨芽細胞・骨細胞の微細構造学的検索

○阿部　未来[1]，本郷　裕美[2]，山本知真也[2]，長谷川智香[2]，網塚　憲生[2]

[1]北大　院歯
[2]北大　院歯　硬組織発生

**【目的】** 骨芽細胞は破骨細胞とのカップリングにより骨形成が調節されると推測される．一方，*c-fos* 遺伝子欠損（*c-fos*$^{-/-}$）マウスは破骨細胞が存在しないため，骨芽細胞とのカップリングは成立しない．我々は，カップリングが欠如する環境における骨芽細胞・骨細胞の微細構造と細胞機能を明らかにする目的で，*c-fos*$^{-/-}$ マウスの大腿骨・脛骨を組織化学・微細構造学的に解析した．

**【材料と方法】** 生後 12 週齢の野生型マウスと *c-fos*$^{-/-}$マウスをアルデヒド固定し，大腿骨・脛骨をパラフィンまたはエポキシ樹脂包埋を行った．解析項目として，アルカリフォスファターゼ（ALP），酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP），FGF23，sclerostin の組織化学，および，透過型電子顕微鏡観察を行った．

**【結果と考察】** 野生型マウスの大腿骨では，骨芽細胞は ALP 強陽性を示しており，豊かな細胞体内部に多数の粗面小胞体やゴルジ体を有することから，活発な骨基質合成を行っていると考えられた．一方，*c-fos*$^{-/-}$マウスでは，ALP 弱陽性を示す骨芽細胞しか認められなかった．このような骨芽細胞では，粗面小胞体はあまり発達しておらず，僅かな小胞とゴルジ体のみが観察された．また，*c-fos*$^{-/-}$マウスの骨細胞は，野生型マウスと比較して，FGF23 ならびに sclerostin 強陽性を示すほか，細胞内部には水解小体を有していた．多くの骨細胞は不規則な形状の骨小腔内に局在し，骨小腔壁との間隙には，高電子密度の構造物や多数のコラーゲン線維を認めた．また，これら骨芽細胞と骨細胞の骨細管による連結性は低下していた．以上から，*c-fos*$^{-/-}$マウスでは，骨芽細胞と骨細胞は機能的なグループを形成しておらず，活性型骨芽細胞が存在しない可能性，また，同時に，骨細胞による骨小腔周囲の骨基質改変の可能性が示唆された．

**【利益相反】** 利益相反状態にはありません．

## Ultrastructural assessment on osteoblasts and osteocytes in *c-fos* deficient mice

○Abe M[1]，Hongo H[2]，Yamamoto T[2]，Hasegawa T[2]，Amizuka N[2]

[1]Sch Dent Med, Hokkaido Univ
[2]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med

**Introduction** Osteoblastic activity including bone formation are believed to be coupled with osteoclastic bone resorption. *c-fos* deficient（*c-fos*$^{-/-}$）mice have no osteoclasts and consequently lack cell coupling with osteoblasts. In this study, we have attempted to demonstrate the ultrastructural features of osteoblasts and osteocytes in *c-fos*$^{-/-}$ mice.

**Materials and Methods** Twelve weeks-old wild-type and *c-fos*$^{-/-}$ mice were fixed with paraformaldehyde solution. Paraffin sections of wild-type and *c-fos*$^{-/-}$ femora and tibiae were examined for histochemistry of ALP, TRAP, FGF23 and sclerostin. Ultrathin sections of epoxy resin-embedded specimens were examined under transmission electron microscopy.

**Results and Discussion** Wild-type mice showed mature osteoblasts with abundant rER and Golgi apparatus throughout the plump cell bodies, while *c-fos*$^{-/-}$ osteoblasts reveals poorly-developed rER, but contained several vesicles, Golgi apparatus and lysosomes. Many *c-fos*$^{-/-}$ osteocytes were surrounded by the irregular-shaped lacunar walls, which often showed electron dense organic materials and dispersed collagen fibrils. Furthermore, FGF23 and sclerostin were intensely synthesized in *c-fos*$^{-/-}$ osteocytes. Unlike wild-type mice, canalicular connectivity between osteoblasts and osteocytes appeared to be disrupted in *c-fos*$^{-/-}$ mice. Summarizing, it seems likely that, in *c-fos*$^{-/-}$ mice, osteoblasts are not bone synthesizing cell-types, and osteocytes less connected with osteoblasts remodel the surrounding bone matrix.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-7 *Porphyromonas gingivalis* はヒトマスト細胞から IL-31 産生を誘導する

○高瀬　彩[1]，多田　浩之[1]，西岡　貴志[2]，松下　健二[3]，高田春比古[1]

[1]東北大　院歯　口腔微生物
[2]東北大　院歯　口診
[3]長寿セ　口腔疾患

【緒言】マスト細胞や Th2 細胞が産生する interleukin-31（IL-31）は，IL-31 受容体を発現する上皮細胞に作用して，ケモカイン産生を介して気管支炎や腸炎を惹起する．慢性歯周炎においてマスト細胞は歯周組織に集積するが，歯周炎におけるマスト細胞の役割は明らかにされていない．そこで，慢性歯周炎の病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* によるマスト細胞からの IL-31 産生誘導について検討した．【方法】ヒトマスト細胞株 HMC-1 を IMDM 培地で継代培養した．Tryptic soy broth にて嫌気培養した *P. gingivalis* W83 ならびに ATCC 33277 野生型株および KDP136 ジンジパイン変異株（長崎大，中山教授より恵与），*P. gingivalis* 由来 fimbriae および合成リポペプチド（小川博士より恵与）ならびに *P. gingivalis* LPS（InvivoGen）を供試した．また，*P. gingivalis* をジンジパイン阻害剤である KYT-1 および KYT-36 で前処理後，同細胞を刺激した．HMC-1 細胞からの IL-31 産生は ELISA 法にて測定した．【結果】HMC-1 細胞を *P. gingivalis* で 48 時間刺激すると，明確な IL-31 産生が認められた．一方，*P. gingivalis* の fimbriae，リポペプチドならびに LPS による IL-31 産生は認められなかった．*P. gingivalis* による IL-31 産生は，同菌を KYT-1 と KYT-36 で前処理すると抑制され，KDP136 株による IL-31 産生は野生型株に比べて著しく低かった．【考察】*P. gingivalis* によるジンジパインを介したマスト細胞からの IL-31 産生が，慢性歯周炎の病態形成に関与する可能性が示唆された．

**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## *Porphyromonas gingivalis*-induced production of IL-31 by human mast cells

○Takase A[1]，Tada H[1]，Nishioka T[2]，Matsushita K[3]，Takada H[1]

[1]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[2]Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent
[3]Dept Oral Dis Res, NCGG

**Objective** Interleukin-31（IL-31）, a gp130/IL-6 cytokine family member, is produced mainly by mast cells or activated $CD4^+$ T cells. To address possible roles of IL-31 in chronic periodontitis, we examined the effect of *P. gingivalis* on the induction of IL-31 in human mast cells. **Methods** Human mast cell line, HMC-1 cells were cultured in IMDM. *P. gingivalis* W83, ATCC 33277, and KDP136（a gingipains-null mutant, provided by Dr. K. Nakayama）were cultured anaerobically in tryptic soy broth. As *P. gingivalis* preparations, fimbriae, synthetic lipopeptide PGTP2-RL（provided by Dr. T. Ogawa）, and LPS（InvivoGen）were used. Cells were stimulated with *P. gingivalis* W83, KDP136, or ATCC 33277（a parent strain of KDP136）. The IL-31 level in the culture supernatants was measured by ELISA. **Results** The IL-31 production by HMC-1 cells was significantly induced by the stimulation with *P. gingivalis* W83. The IL-31 productions were not observed by the stimulation with fimbriae, PGTP2-RL, and LPS from *P. gingivalis*. The production of IL-31 was significantly reduced by the stimulation with *P. gingivalis* pretreated with KYT-1 plus KYT-36（gingipains inhibitors）or with *P. gingivalis* KDP136. **Conclusion** These results suggest that IL-31 production from mast cells might be involved in the pathogenesis of periodontal diseases.

***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-8　ヒト唾液腺細胞は ATP 刺激により IL-6 を産生する

○根本　恭利[1,2]，黒石　智誠[2]，菅原　俊二[2]

[1]東北大　歯　6 年
[2]東北大　院歯　口腔分子制御

【目的】細胞外 ATP は P2 受容体（P2R）を介して様々な細胞を活性化する．P2R はイオンチャネル型受容体である P2XR および GTP 共役受容体である P2YR に大別される．ATP による P2R の活性化はサイトカイン産生やアポトーシスを誘導し，シェーグレン症候群に伴う唾液腺傷害に関与することも示唆されている．これまでに我々は，シェーグレン症候群由来唾液腺において Th17 細胞の浸潤が認められることを報告した．そこで本研究では，ATP 刺激によるヒト唾液腺細胞の炎症性サイトカイン産生，特にヒト Th17 細胞分化誘導に必須である IL-6 の産生能を解析し，シェーグレン症候群病因論における ATP-P2R システムの関与を検討した．
【結果と考察】ヒト唾液腺細胞株である HSG 細胞（鶴見大学斎藤一郎教授より分与）では P2X4-6 および P2Y2，4，6，11-14 の mRNA 発現が認められた．細胞外 ATP は ectonucleotidase により分解され，そのシグナルが調節される．HSG 細胞では CD39（ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1）mRNA 発現は認められなかったが，CD73（ecto-5'-nucleotidase）mRNA 発現は認められた．ATP 刺激 HSG 細胞では，刺激濃度および刺激時間に依存した培養上清中 IL-6 濃度の上昇と IL-6 mRNA 発現量の増加が認められた．また，ADP 刺激においても IL-6 産生誘導が認められたが，AMP 刺激では認められなかった．イオンチャネル型である P2XR は細胞外 $Ca^{2+}$ をキレートすることによりその活性化が抑制される．ATP による IL-6 産生誘導に P2XR もしくは P2YR のいずれが関与しているかを検討するため，EGTA 存在下で ATP 刺激培養を行った．その結果，1 mM EGTA 存在下では，ATP 刺激 HSG 細胞による IL-6 産生が部分的に抑制された．以上の結果から，ATP は P2XR および P2YR の両方を介して，HSG 細胞における IL-6 産生を誘導することが示唆された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## Extracellular ATP induces IL-6 production in human salivary gland cells

○Nemoto T[1,2]，Kuroishi T[2]，Sugawara S[2]

[1]Tohoku Univ Sch Dent
[2]Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent

Extracellular ATP（eATP）stimulates various cells via P2 purinergic receptors（P2R）. P2XRs are ligand-gated ion channels and P2YRs are G protein-coupled receptors. ATP-P2Rs axis induces cytokine production and apoptosis, which involved with salivary gland dysfunctions associated with Sjogren's syndrome. We have already reported Th17 cells infiltration into the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. IL-6 is indispensable for human Th17 induction. In this study, we investigated IL-6 production of HSG cells, human salivary gland ductal cell line, induced by eATP.
RT-PCR revealed mRNA expressions of P2X4-6, P2Y2, 4, 6, 11-14 and CD73（ecto-5'-nucleotidase）but not CD39（ectonucleoside triphosphate diphosphohydrorase 1）in HGS cells. eATP induced IL-6 productions and mRNA expressions in HSG cells with dose and time dependent manners. ADP, but not AMP, also induced IL-6 production in HSG cells. Extracellular $Ca_{2+}$ chelation inhibits activation of P2XRs. To analyze whether P2XRs or P2YRs contribute IL-6 production induced by ATP, HSG cells were stimulated with ATP in the presence of EGTA. IL-6 production was partially inhibited in the presence of 1 mM EGTA. These results suggest that eATP induces IL-6 production in HSG cells via both P2XRs and P2YRs.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-9 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分 Mfa5 の輸送機序に関する研究

○飯島　由羅，長谷川義明，永野　恵司，吉田　康夫，吉村　文信

愛院大　歯　微生物

【目的】*Porphyromonas gingivalis* は Mfa1 タンパク質のポリマーからなる Mfa1 線毛を菌体表面に発現している．Mfa3, Mfa4 および Mfa5 はアクセサリータンパク質として微量に存在しているが，これらがどのように線毛に組込まれるのかは，十分に解明されていない．Mfa5 には，タンパク質分泌装置 Type IX secretion system（T9SS）が認識するとされている C-terminal domain（CTD）配列が認められる．そこで本研究では，Mfa5 の輸送における T9SS の役割を明らかにするために，T9SS をコードする遺伝子の一つである *porU* 欠損株を作製し，Mfa5 の細胞内局在性を検討した．
【方法】*P. gingivalis* ATCC 33277（野生株）および *mfa4* 変異株から，*porU* 変異株を作製した．各菌株を培養後，培養上清と菌体に分離した．菌体は破砕後，可溶性（細胞質）および膜画分に分画した．Mfa5 の検出は，ウェスタンブロット法にて行った．
【結果と考察】野生株および 33277 株由来 *porU* 変異株では，いずれも Mfa5 は培養上清には検出されず，菌体内に保持されていた．しかし，野生株では膜画分および可溶性画分に局在したのに対し，*porU* 変異株では，可溶性画分にのみ検出された．*mfa4* 変異株では，Mfa5 は菌体内に保持されず，培養上清に遊離することがわかっている．しかし，*mfa4 porU* 変異株では，培養上清には検出されず，菌体内に留まっていた．以上の結果から，Mfa5 は，T9SS により細胞外に輸送されることが考えられた．Mfa5 にコードされる CTD 配列と PorU との関連性については現在解析中である．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## A study on a transport mechanism of the accessory protein Mfa5 in Mfa1 fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*

○Iijima Y，Hasegawa Y，Nagano K，Yoshida Y，Yoshimura F

Dept Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent

*Porphyromonas gingivalis* expresses Mfa1 fimbriae, which are composed of polymers of Mfa1 on the cell surface. Mfa5 is incorporated into fimbriae as one of the minor accessory proteins. Based on the amino-acid sequence analysis, Mfa5 was predicted to have a C-terminal domain（CTD）, which has been reported to utilize the type IX secretion system（T9SS）for translocation across the outer membrane. To determine the contribution of T9SS on the transport of Mfa5, *P. gingivalis* mutants deficient in the T9SS-encoding gene *porU* were constructed from ATCC 33277 and *mfa4* mutant. The whole cell lysate, culture supernatant proteins, envelope and soluble fractions were prepared. Then western blot analysis using anti-Mfa5 antiserum was performed. Mfa5 was detected in the whole cell lysate, envelope and soluble fractions from 33277, but not in envelope fractions from *porU* mutants. Deficiency in *porU* from the *mfa4* mutant, in which Mfa5 was secreted into culture supernatant, resulted in an accumulation of Mfa5 in the cells. Taken together, Mfa5 appears to be secreted via T9SS to the outside of the cell. Studies are under way to define the relationship between the CTD and PorU.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

## S-10　破骨細胞の分化を誘導する小分子化合物の探索

○西川　実沙[1]，柿原　嘉人[1]，秋葉　陽介[2]，江草　　宏[3]，佐伯万騎男[1]

[1]新潟大　院医歯　歯科薬理
[2]新潟大　院医歯　生体補綴
[3]東北大　院歯　分子　再生補綴

【目的】破骨細胞による骨吸収は，骨組織の機能と形態の調節に重要である．われわれはこれまでにマウス単球系細胞株 RAW264.7 細胞に破骨細胞分化のマスターレギュレーターである転写因子 NFAT のレポーターベクターを恒常的に発現させた細胞株を用いて，破骨細胞の分化を誘導する小分子化合物の探索を行ってきた．今回新たにケンパウロンが破骨細胞分化を著明に亢進することを見出した．
【方法】マウス骨髄細胞由来マクロファージ系細胞および RAW264.7 細胞を RANKL で分化誘導し，TRAP 染色を行い，破骨細胞への分化を確認した．レポーターベクター導入 RAW264.7 細胞の NFAT 活性の測定は Luciferase assay により行った．
【結果と考察】レポーターベクター導入 RAW264.7 細胞を用いて，小分子化合物（Lopac 1280, Sigma）のスクリーニングを行ったところ，RANKL 誘導性の NFAT 活性を増強させる小分子化合物が多数見つかった. 候補化合物の中から, TRAP 染色で破骨細胞分化を亢進するものをスクリーニングしたところ，GSK-3 beta 阻害薬のケンパウロンが濃度依存的に NFAT 活性および破骨細胞分化を著明に亢進することを見出した．他の GSK-3 beta 阻害薬の SB415286 および CHIR99021 も破骨細胞分化を亢進したことから，ケンパウロンは GSK-3 beta を阻害することで NFAT を活性化し，破骨細胞分化を増強することが示された．
**【利益相反】**利益相反状態にはありません．

## NFAT activity-based screening for identifying osteoclastogenesis-related small compounds

○Saikawa M[1]，Kakihara Y[1]，Akiba Y[2]，Egusa H[3]，Saeki M[1]

[1]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[2]Div Bio-Prosthodontic, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci
[3]Div Oromaxillofacial Regeneration, Tohoku Univ Grad Sch Dent

**Objectives**: To establish a high-throughput screening system for identifying osteoclastogenesis-related compounds using a cell-based sensor, and to identify novel chemical entities regulating signaling pathways in osteoclasts. **Methods**: RAW264.7 cells were transfected with the NFAT response element/luciferase reporter vector and selected using hygromycin. Small compound library was applied to the screening. pNFAT/Luc-RAW264.7 cells were cultured in osteoclast induction medium in 96-well plates. After 24 hours of RANKL stimulation, the luciferase activity of each well was measured using a microplate reader. **Results**: Library screening identified several activator candidates in osteoclasts. One of the activator candidates was the kenpaullone. An increased osteoclast formation of bone marrow-derived OCP was observed when kenpaullone was treated. **Conclusion**: We used a chemical biology strategy to identify novel modulator compounds for NFAT activity in osteoclasts. The pNFAT/Luc-RAW264.7 system could be useful for identifying novel compounds associated with osteoclastogenesis, as in the present study it identified kenpaullone as a novel activator for NFAT activity in osteoclasts.
***Conflict of Interest*:** The authors declare no competing interests.

# The 57th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology

September 11 – September 13, 2015

The Nippon Dental University
School of Life Dentistry
at Niigata, JAPAN

JAOB JAPANESE ASSOCIATION FOR ORAL BIOLOGY since 1958

## Special lecture accorded by the LOTTE Foundation

SL

Osamu Shimomura

Professor Emeritus at Marine Biological Laboratory in Woods Hole

## Main symposium

MS-1

The outlook for dentistry in Australia: the past, the present and the future

Grant Townsend

Sch Dent, Univ Adelaide, Australia

MS-2

Transfer of scientific knowledge into the dental curriculum

Charles Shuler

Fac Dent Univ British Columbia, Canada

MS-3

Dentistry the UK

Paul Coulthard

Sch Dent, The Univ Manchester, the UK

MS-4

The future dentistry in Japan

Akira Hamura

The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, Japan

## Symposium of Science Council of Japan

CS-1

Development of dental medicine based on diversity of dental basic sciences: the message of the Science Council of Japan

Yamaguchi A

Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

CS-2

Project for raising cutting-edge scientists in basal dental sciences

Hirata M

Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

CS-3

As a basic life scientist

Ichijo H

Lab Cell Signaling, Grad Sch Pharma Sci, Univ Tokyo

CS-4

Finding of novel lymphocyte; Type 2 innate lymphoid cell

Moro K[1,2,3]

[1]Lab Immune Cell Systems, RIKEN Center for Integrative Med Sci, [2]Div Immunobiol, Dept Med Life Sci, Grad Sch Med Life Sci, Yokohama City Univ, [3]Precursory Res for Embryonic Sci Technol (PRESTO), Jpn Sci Technol Agency

CS-5

The elucidation of regulatory mechanisms of bone remodeling

Nakashima T

Dept Cell Signal, Grad Sch Med Dent Sci, Tokyo Med Dent Univ
CS-6
Paradigm shift — from the viewpoint of developmental biology
Ohazama A
Dept Oral Anat, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci

## Symposium of JAOB

KS-1
Regulatory mechanisms of vertebrate developmental body plan revealed by live-imaging and mathematical analyses
Iimura T[1,2,3]
[1]Ehime Univ PROS, Bio-Imaging, [2]Ehime Univ ADRES, Analytical Bio-Med, Ehime Univ Hosp, [3]Translational Res Center and Artificial Joint Integrated Center
KS-2
Intravital multiphoton microscopy visualizing an 'invisible hand' controlling immune and bone cell dynamics in vivo
Ishii M[1,2]
[1]Dept Immunol Cell Biol, Grad Sch Med Frontier Biosci, Osaka Univ, [2]JST, CREST
KS-3
Visualization of intracellular signal transduction by fluorescent biosensors and their clinical application
Ohba Y
Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med
KS-4
Deciphering cardiovascular development during embryogenesis by fluorescence imaging
Fukui H, Yokota Y, Nakajima H, Chiba A, Wakayama Y, Ando K, Fukuhara S, Mochizuki N
Dept Cell Biol, Natl Cerebr & Cardiovasc Ctr Res Inst

## KBDSSA and JAOB joint symposium at the Meeting

JKS-1
Role of Runx2/Cbf$\beta$ complex in skeletal tissues
Park N-R, Lim K-E and Choi J-Y
Dept Biochem Cell Biol, Kyungpook Natl Univ Sch Med
JKS-2
Contribution of the $Scx^{+}/Sox9^{+}$ cell population to the establishment of the junction between tendons/ligaments and cartilage
Shukunami C
Dept Mol Biol Biochem, Basic Life Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ
JKS-3
Calcium signaling for osteoclast differentiation
Kim H J, Lee Z H, and Kim H-H
Dept Cell Dev Biol, Seoul Natl Univ Sch Dent
JKS-4
Regulation of osteoclast differentiation and function by Wnt signals
Kobayashi Y[1], Uehara S[2], Udagawa N[2], Takahashi N[1]
[1]Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Oral Biochem, Matsumoto Dent Univ

## JAOB/Rising members award winner

Y-1

Cortico-muscular coherence during isometric tongue protrusion in humans: an MEG study

Maezawa H

Dept Oral Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent

Y-2

Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF-κB via an interaction with Smad4

Hirata-Tsuchiya S[1,2], Fukushima H[3], Katagiri T[4], Ohte S[4], Shin M[4], Nagano K[5], Aoki K[5], Morotomi T[2], Sugiyama G[1], Nakatomi C[1], Kokabu S[1], Doi T[6], Takeuchi H[1], Ohya K[5], Terashita M[2], Hirata M[7], Kitamura C[2] and Jimi E[1]

[1]Dept Health Improvement, Kyushu Dent Univ, [2]Dept Oral Function, Kyushu Dent Univ, [3]Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll, [4]DivPathophysiol, Res Center Genomic Med, Saitama Med Univ, [5]Sec Pharmacol, Dept Bio-Matrix, Grad Sch, Tokyo Med Dent Univ, [6]Technol Deve Team for BioSignal Program, Subteam for BioSignal Integration, RIKEN BioResource Center, [7]Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

Y-3

Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice

Saito K

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

Y-4

Osteocytes produce interferon-β as a negative regulator of osteoclastogenesis.

Hayashida C

Dept Oral Anat, Meikai Univ Sch Dent

## Luncheon seminar

LS-1

Author workshop for young researchers supported by Elsevier: How to make a scientific paper including image processing and give an impressive presentation

Ohshima H[1,2]

[1]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]EIC of J Oral Biosci

LS-2

Guidance to museum of medicine and dentistry

Nishimaki A

Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Museum of Medicine and Dentistry

## Satellite symposium 1

SS1-1

Dentin evolution and tooth evolution

Tabata M J.

Sec Biostructural Sci, Grad Sch Med & Dent, Tokyo Med Dent Univ

SS1-2

Variation and evolution of dentin in lower vertebrates

Sasagawa I

Adv Res Center, Nippon Dent Univ at Niigata

SS1-3

Petrodentine（hypermineralized dentin）in lungfish

Oka S[1], Ishiyama M[2], Sasagawa I[3]
[1]The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, Dept Biol, [2]The Nippon Dent Univ Sch Life at Niigata, Junior Coll, [3]The Nippon Dent Univ Sch Life at Niigata, Adv Res Center Anat
SS1-4
Dentin formation and formation mechanism of incremental lines in crocodilian, reptile
Mishima H
Dept Med Hygiene, Dent Hygiene Course, Kochi Gakuen Coll
SS1-5
Evolutional changes in skeletal tissues in vertebrates
Yamaguchi A
Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll

## Satellite symposium 2

SS2-1
The origin of dental enamel
Kawasaki K
Dept Anthropol, Penn State Univ
SS2-2
Molecular evolution of dental enamel in tetrapods
Shintani S
Dept Pediatr Dent, Tokyo Dent Coll
SS2-3
Molecular biological analysis of amelogenin genes in sarcopterygii
Mikami M
Dept Microbiol, The Nippon Dent Univ Sch Dent at Niigata
SS2-4
Cloning and sequencing of a SCPP5-like gene expressed in the tooth germ and scales of the gar（Holostei）
Ishiyama M
Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata
SS2-5
The temporospatial expression patterns of enamel protein genes and Dmp1 in garpike tooth buds
Nakatomi M
Div Anat, Kyushu Dent Univ
SS2-6
Immunohistochemical analyses for SCPP5 protein on the jaw teeth and ganoid scales of gars, Lepisoteus oculatus, a bony fish
Sasagawa I
Adv Res Center, Nippon Dent Univ at Niigata

## Satellite symposium 3

SS3-1
The role of VAMP4 to maintain the ribbon structure of the Golgi apparatus
Shitara A[1], Shibui T[2], Okayama M[3], Arakawa T[4], Mizoguchi I[3], Sakakura Y[2], Takuma T[4]
[1]IMTS, OPCB, NIDCR, NIH, [2]Div Anat, [3]Div Orthodont, [4]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

SS3-2
Selective transport of proteins into secretory granules of salivary acinar cells
Fujita-Yoshigaki J, Yokoyama M, Katsumata-Kato O
Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
SS3-3
Regulation of EGFR intracellular trafficking by ROCO family kinase LRRK1
Hanafusa H[1], Kedashiro S[2], Matsumoto K[1]
[1]Div Biol Sci, Grad Sch Sci, Nagoya Univ, [2]Div Path Sig, Dept Biochem Mol Biol Kobe Univ
SS3-4
Lysosome-associated membrane proteins（LAMPs）regulate intracellular positioning of mitochondria
Yokoyama M
Dept Biochem, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med & Dent
SS3-5
New functions of lysosome biogenesis in bone cells
Tsukuba T
Dept Dent Pharmacol, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ

## Satellite symposium 4

SS4-1
Development of artificial saliva using whey
Ishikawa Y[1], Pieczonka T[1], Bragiel A[1], Yabuuchi S[2], Takeuchi Y[2], Yanagisawa S[3], Fukuta K[4], Kim J[4], Kim D[4], Yoshioka M[3]
Dept [1]Med Pharm, [2]CommunityMed & Welfare, [3]Oral Health Sci & Soc Welfare, Tokushima Univ Grad Sch, [4]APRO Life Sci In. Inc.
SS4-2
The neurophysiological changes in forced expression of salivary gland-derived BDNF transgenic mice and the application of saliva test in evaluation of human psychiatric disorder
To M[1], Saruta J[1], Sugimoto M[1,2], Kondo Y[1,3], Saito I[4], Tsukinoki K[1]
[1]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, [2]Inst Adv Biosci, Keio Univ, [3]Dept Pathol, Tokai Univ Sch Med, [4]Dept Pathol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
SS4-3
A study of human salivary peptides: From peptidomics to physiological analysis
Saitoh E[1], Kaneko A[2], Hatamoto K[2], Sega T[1], Kato T[3], Taniguchi M[2]
[1]Grad Sch Technol, Niigata Inst Technol, [2]Grad Sch Sci & Technol, Niigata Univ, [3]Dept Chem, Tokyo Dent Coll
SS4-4
Analysis of epithelial transport by the ex vivo mouse submandibular gland perfusion technique in genetically modified mice ～the relationship between membrane proteins and water secretion ～
Nakamoto T[1], Kondo Y[2], Mukaibo T[2], Kidokoro M[2], Imamura A[2], Munemasa T[2], Masaki C[2], Hosokawa R[2]
[1]Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Oral Reconstruct and Rehabil, Kyushu Dent Univ
SS4-5
Differences in regulation of parasympathetic vasodilation in the major salivary glands in the rat
Sato T, Ishii H
Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

SS4-6
Endogenous peroxidase activities in the properties of variable mammalian salivary glands
Moriguchi K[1], Utsumi M[1], Jogahara T[2], Oda S[2], Honda M[1]
[1]Dept Oral Anat, Aichi-Gakuin Univ, Sch Dent, [2]Dept Zool, Okayama Univ, Fac Sci
SS4-7
Amylase exocytosis and $Ca^{2+}$, which is the unsolved problem continuing from the 1st Daekisen Danwakai.
Tojyo Y
Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

## Satellite symposium 5

SS5-1
3D-CLEM by combining confocal laser-scanning microscope with FIB-SEM in the central nervous system
Sonomura T
Anat II, Kanazawa Med Univ
SS5-2
Three dimensional ultrastructure analysis for the influence of mechanical stress in periodontal ligament
Hirashima S[1,2], Ohta K[1], Kanazawa T[1], Togo A[1,3], Kusukawa J[2], Nakamura K[1]
[1]Dept Anat, Kurume Univ Sch Med, [2]Dent & Oral Med Center, Kurume Univ Sch Med, [3]EM Lab, Cent Res Unit of Kurume Univ Sch Med
SS5-3
Three-dimensional analysis of the bone using the orthogonal arranged FIB-SEM
Hashimoto M[1], Nagaoka N[2], Hara T[3], Kamioka H[1]
[1]Dept. Orthodont Okayama Univ Grad Sch Med Dent, [2]Lab Electron Microscopy, Okayama Univ Grad Sch Med Dent, [3]NIMS
SS5-4
Ultrastructural assessment of the osteocytic networks by using FIB-SEM
Hasegawa T
Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
SS5-5
Ultrastructural morphological evaluation of non-demineralized human dentin using FIB/SEM tomography
Miura J[1], Shimizu M[1], Enomoto S[2], Arai S[2]
[1]Div Interdisci Dent Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Ecotopia research center, Nagoya Univ
SS5-6
3D observation of the titanium / cell interface
Nagaoka N[1], Yoshihara K[2]
[1]ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Center Innov Clinic Med, Okayama Univ Hosp

## Satellite symposium 6

SS6-1
Overview: Bone cell biology from the view point of histochemistry, ultrastructure and bio-imaging
Amizuka N, Hasegawa T, Tsuboi K, Hongo H, Yamamoto T
Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
SS6-2
Morphological assessment on bone tissue using SIM, FIB-SEM, atomic force microscopy and isotope

microscopy
Hasegawa T, Tsuboi K, Hongo H, Yamamoto T, Amizuka N
Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med
SS6-3
Role of chemokine-mediated signal revealed by fluorescence cell imaging and bone histomorphometry
Lee J[1], Iimura T[1, 2, 3]
[1]Adv Res Support Center, Ehime Univ, [2]Proteoscience Center, Ehime Univ, [3]Translational Res Center, and Artificial Joint Integrated Center
SS6-4
Intravital bone imaging dissecting the 'real' mode of actions of anti-bone resorptive drugs
Ishii M
Dept Immunol Cell Biol, Grad Sch Med Frontier Biosci, Osaka Univ, JST, CREST
SS6-5
Visualization of bone quality by FTIR and Raman spectroscopy
Kimura-Suda H[1, 2], Ito T[2], Kanehira Y[2], Hidaka K[2], Kanazawa K[2], Ueno H[2]
[1]Dept Appl Chem Biosci, Chitose Inst Sci Tech Fac Sci Tech, [2]Chitose Inst Sci Tech Grad Sch Photonics Sci

## Satellite symposium 7

SS7-1
Functional analysis of dental pulp stem cells and their application to regenerative therapy
Hata M
Dept Removable Prosthodont, Aichi Gakuin Univ
SS7-2
Origin of dental mesenchymal cells and property of these cells including supporting capacity of hematopoietic cells
Yamazaki H
Dept Stem Cells and Developmental Biol, Inst Med Sci, Mie Univ Grad Sch Med
SS7-3
Mineralization capacities of the dental pulp and gingiva derived mesenchymal stem cells
Kawashima N, Okiji T
Tokyo Med Dent Univ (TMDU), Grad Sch Med Dent Sci, Div Oral Health Sci, Dept Pulp Biol Endodont
SS7-4
Dental pulp-derived stem cells and translational research
Yamaza T
Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci

## Satellite symposium 8

SS8-1
Cell transplantation after inferior alveolar nerve resection in rats
Honda M[1,2], Toriumi T[2], Oka A[2], Shinoda M[3], Iwata K[3], Isokawa K[2]
[1]Dept Oral Anat Aichi Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Anat Nihon Univ Sch Dent, [3]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent
SS8-2
Infraorbital nerve injury increases expression of alpha-2/delta-1 subunit in the rat trigeminal ganglion

Sato T, Ichikawa H
Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent
SS8-3
Alveolar nerve injury changes topographical organization in rat insular cortex
Kobayashi M
Dept Phramacol, Nihon Univ Sch Dent
SS8-4
Involvement of astroglial glutamate-glutamine shuttle in modulation of the jawopening reflex in rats with neuropathic pain due to chronic constrictive injury of the infraorbital nerve
Kitagawa J
Dept Oral Physiol, Sch Dent, Matsumoto Dent Univ
SS8-5
Development of new neuroregenerative therapy based on the novel protein complex inducing anti-inflammatory/tissue-regenerating M2 macrophages
Yamamoto A
Dept Head and Neck and Sensory Organ Med, Nagoya Univ Grad Sch Med

## Satellite symposium 9

SS9-1
The mechanisms of glandular secretions for proper lubrication
Kurose M[1], Hatta A[1,2], Okamoto K[1], Meng ID[3], Yamamura K[1]
[1]Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent, [2] General Dent and Clinic Education Unit, Niigata Univ Hosp, [3]Div Physiol, New England Univ
SS9-2
Lessons from singing birds, physiology and dentistry
Okumura T
Lab Neuroethol, Fac Comprehensive Informatics, Shizuoka Inst Sci Engineering
SS9-3
Tongue-cancer pain relief at early stage in rats
Furukawa A[1], Shinoda M[2], Kubo A[2], Honda K[1,2], Iwata K[2]
[1]Dept Oral and Maxillofacial Surg, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent
SS9-4
Endocannabinoid-inducing self-amplification of sweet taste sensitivity and the possible existence of T1R3-independent sweet transduction pathway
Iwata S[1], Yoshida R[1], Shigemura N[1], Ninomiya Y[1,2]
[1]Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch Dent, [2]R&D Center for Taste and Odor Sensing
SS9-5
The modulation of oral sensory transmission during swallowing
Sakai S, Tsuji K, Magara J, Tsujimura T, Inoue M
Dept Dysphagia Rehab, Niigata Univ Grad Sch Med Dent

## Satellite symposium 10

SS10
Analytical method and its interpretation of variation in tooth morphology
Kondo S[1], Manabe Y[2]
[1]Dept Anat, Sch Dent at Matusdo, Nihon Univ, [2]Dept Oral Anat Dent Anthropol, Grad Sch Biomed Sci,

Nagasaki Univ
SS10-1
Size and variation of the third molar in the South Pacific populations
Matsuno M, Kondo S
Dept Anat I, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo
SS10-2
Dental size variation observed in deciduous and permanent dentitions among prehistoric and modern Japanese
Kitagawa Y, Manabe Y, Oyamada J
Dept Oral Anat Dent Anthropol, Grad Sch Biomed Sci, Nagasaki Univ
SS10-3
Morphological covariation between enamel-dentine junction and outer enamel surface
Morita W
Dept Oral Functional Anat, Grad Sch Dent Med, Hokkaido Univ
SS10-4
Non-invasive imaging of internal tooth structure in humans: applications in dental education
Kato A[1], Ziegler A[2]
[1]Dept Oral Anat, Sch Dent, Aichi Gakuin Univ, [2]Inst Zool, Univ Bonn

## Satellite symposium 11

SS11-1
Dynamics of vessel related factors of muscle and mesenchymal tissue in the development of masseter muscle
Sunohara M, Sato I
Dept Anat, Sch Dent, The Nippon Dent Univ
SS11-2
Formation of the muscle-bone attachment in the craniofacial region
Yamamoto M
Dept Anat, Tokyo Dent Coll
SS11-3
The change of the form and characteristics of the tongue muscle adjacent to the tongue cancer.
Sakiyama K[1], Takizawa S[2], Bando Y[1], Sakashita H[1,2], Amano O[1]
[1]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div Oral SurgeryII, Meikai Univ Sch Dent
SS11-4
Stratified myoblast sheets obtained by creating hybrid of oral mucosal epithelial sheets
Higa K[1], Yamane S[2], Umezawa T[2], Serikawa M[2], Shimazaki J[2], Abe S[2]
[1]Dept. Ophthalmol/Cornea Center, Ichikawa General Hosp, Tokyo Dent Coll, [2]Dept Anat, Tokyo Dent Coll

## Satellite symposium 12

SS12-1
Overview: Think about DSPP study through morphological and functional perspectives
Yamakoshi Y
Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
SS12-2
Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in porcine pulp and dentin～Gene expression and function～

Yamamoto R
Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ
SS12-3
Functional significance of Dspp in the process of odontoblast differentiation
Saito K[1], Nakatomi M[2], Ida-Yonemochi H[1], Ohshima H[1]
[1]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Anat, Dept Oral Health Improvement, Kyushu Dent Univ
SS12-4
Induction method and mechanism for odontoblastic differentiation of stem cells
Ozeki N[1], Mogi M[2], Nakata K[1]
[1]Dept Endod, Sch Dent, Aichi Gakuin Univ, [2]Dept Med Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ
SS12-5
The usefulness of the modified recombinant DPP proteins in the hard tissue regeneration
Suzuki S[1], Kobuke S[1], Haruyama N[2], Shiba H[1]
[1]Dept Biol Endo, Integr Health Sci, Inst Biomed Health Sci, Hiroshima Univ, [2]Sec Ortho Dento Orthope, Fac Dent Sci, Kyushu Univ

## Satellite symposium 13

SS13-1
Culturing 'uncultivable' oral bacteria
Vartoukian Sonia R
Barts and The London Sch Med Dent, Queen MaryUniv London, UK
SS13-2
A molecular epidemiology study exploring oral microbiome structure associated with human health
Takeshita T, Yamashita Y
Sec Preventive and Public Health Dent, Div Oral Health, Growth and Development, Kyushu Univ Fac Dent Sci
SS13-3
Molecular biological control method for oral biofilm at early stage
Mashima I[1,2], Miyakawa H[2], Nakazawa F[2]
[1]Postdoctoral Fellow of JSPS, [2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido

## Satellite symposium 14

SS14-1
Tooth replacement phenomenon in the teleost fish, especially concerned with the Zahnreihen theory proposed by Edmund on the dentition, dental system, in lower vertebrates
Wakita M
Honorary member of JAOB
SS14-2
Reexamine the tooth morphology of Cope-Osborn Tritubercular Theory
Kozawa Y
Dept Comparative Anat
SS14-3
New aspect of tooth morphogenesis using imaging system
Harada H, Kumakami-Sakano M, Otsu K, Fujiwara N
Div Developmental Biol Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ

SS14-4
Current opinion in odontology
Han-Sung Jung
Dept Oral Biol, Yonsei Univ

## Satellite symposium 15

SS15-1
New hypotheses in formation and disintegration of Hertwig's epithelial root sheath
Fujiwara F, Kumakami-Sakano M, Otsu K, Harada H
Div Deve Biol and Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ
SS15-2
Microvascular structure of peri-implant tissue
Matsuo M
Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ
SS15-3
Anatomy of the blood vessel structure related to the dental implant treatment
Miwa Y, Sato I
Dept Anat, Sch Life Dent at Tokyo, Nippon Dent Univ
SS15-4
Lymphatic vessel of the periodontal tissue
Ando Y, Fujimura A
Dept Anat, Div Func Morphol, Iwate Med Univ
SS15-5
Periodontal tissue regeneration by cooperation of distinct mesenchymal stem cells
Chosa N, Ishisaki A
Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ

## Satellite symposium 16

SS16-1
Analysis of mutant DCC-inducible apoptosis on oral squamous cell carcinoma
Kiyoshima T, Wada H
Lab Oral Pathol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ
SS16-2
Apoptotic cell clearance by cancer cells in oral squamous cell carcinoma
Yamazaki M
Dept Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med & Dent
SS16-3
Histopathological malignancy grade, tumor angiogenesis, antiangiogenic gene therapy targeting VEGF, and epithelial-mesenchymal transition（EMT）in oral cancer
Okada Y[1,2], Kanri Y[1], Ono J[2], Ishiguro H[1], Moride M[1], Hasegawa H[1]
[1]Dept Pathol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Histopathol Pathogenic Mechanisms, Grad Sch Life Dent at Niigata, The Nippon Dent Univ
SS16-4
The need for basic research on the treatment strategy of oral cancer
Tanuma J, Kaneko H, Nakao J, Ehara M, Nagayama M
Dept Oral Pathol, Asahi Univ Sch Dent

## ■ Oral Presentation

| | |
|---|---|
| O1-B1 | A possible role of leptomeninges for transduction of systemic inflammatory signals to microglia in response to lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*<br>○Liu Y, Wu Z, Nakanishi H (Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| O1-B2 | Critical roles of cathepsin B in AD-like phenotypes following chronic systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*<br>○Ni J, Wu Z, Nakanishi H (Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| O1-B3 | Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression<br>○Ikoma T[1,2], Ozawa S[1,2], Suzuki K[1], Iwabuchi H[1], Yang X[2,3], Miyamoto C[2,3], Maehata Y[2,3], Hata R[2,3] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ, [2]Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ, [3]Dept Oral Sci, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ) |
| O1-B4 | Opioidergic effects on synaptic transmission in rat insular cortex<br>○Yokota E[1], Koshikawa N[2], Kobayashi M[2] ([1]Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent) |
| O1-B5 | Effects of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist on bone metabolism<br>○Moribayashi A[1], Kayashima H[1], Saeki M[3], Yatani H[1], Egusa H[1,2] ([1]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-B6 | Mechanism of action of a novel bisphosphonate that increases bone mass in OVX rats<br>○Takizawa A[1,2], Chiba M[2,4], Ota T[2], Yasuda M[1,2], Suzuki K[3], Shinoda H[4], Igarashi K[1] ([1]Div Oral Dysfunction Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, [4]Ctr for Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O1-B7 | Injury of cholinesterase by the myeloperoxidase, hydrogen peroxide and chloride system in vitro<br>○Onishi M[1], Odajima T[2] ([1]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido, [2]Sapporo Research Institute Basic Medicine Pedagogy) |
| O1-B8 | Cloning of NK-related molecules in marmoset<br>○Ogasawara K (Dept Immunobiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O1-B9 | Characterization of sublingual dendritic cell after antigen painting<br>○Ohno T, Kang S, Azuma M (Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-B10 | Induction of regulatory T cells by oral dendritic cells<br>○Tanaka Y[1,2], Fukumoto S[1], Sugawara S[2] ([1]Div Pediat Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O1-B11 | Stimulation of FcεRI induces THP-1 expression in a Rat mast cell-like cell line, RBL2H3<br>○Ohashi A, Naito M, Takahashi T (Dept Anat, Nihon Univ Sch Dent) |
| O1-C1 | Behavior of microglia and astrocyte in trigeminal motor nucleus following masseteric nerve injury in the rat<br>○Ogura H[1,2], Honma S[1,3], Wakisaka S[1], Kogo M[2] ([1]Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]First Dept Oral Maxillofacial Surgery, Osaka Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Oral Health Sci, Fac Nursing and Health Care, Baika Women's Univ) |
| O1-C2 | Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures<br>○Yajima T[1], Sato T[2], Ichikawa H[2] ([1]Div Operative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O1-C3 | Degeneration and macrophage infiltration of labial mucosal epithelium in xerostomia patients<br>○Yoshimoto R[1], Aijima R[2], Yoshizumi J[3], Kitsuki T[3], Danjo A[4], Yamashita Y[4], Kido M[5] ([1]Dept Periodontol, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Dept Anat Physiol, Saga Med Sch, [3]Dept Oral Maxillofacial Surg, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, [4]Dept Oral Maxillofacial Surg, Saga Med Sch, [5]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ) |
| O1-C4 | Altered osteocyte network and preferential alignment of biological apatite c-axis around loaded implants in rabbits<br>○Sasaki M[1], Kuroshima S[1], Nakano T[2], Sawase T[1] ([1]Dept Appl Prosthdont, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Div Mater and Manu Sci, Grad Sch Eng, Osaka Univ) |
| O1-C5 | Nitrate-reducing activity variations in oral *Rothia* spp.<br>○Mashimo C, Nambu T (Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ) |
| O1-C6 | Genome sequencing of *Rothia mucilaginosa* NUM-Rm6536, a strain with high transformation efficiency<br>○Nambu T, Mashimo C (Dept Bacteriol, Osaka Dent Univ) |
| O1-C7 | The effects of fructanase on the competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*<br>○Suzuki Y[1,2], Arai T[2,3], Ogura N[1], Kondoh T[1], Senpuku H[2] ([1]Dept Maxillofacial Surgery, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, [2]Dept Bacteriol 1, Natl Inst Infect Dis, [3]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| O1-C8 | Novel peptidase from *Porphyromonas gingivalis* exerting acyloligopeptidyl peptidase activity<br>○Nemoto T, Ohara-Nemoto Y (Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| O1-C9 | Effect of curcumin on invasion of human gingival epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* outermembrane vesicles<br>○Izui S, Nagata H, Amano A (Dept Prev Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| O1-C10 | C55 bacteriocin produced by ETB-positive *Staphylococcus aureus* strains is a key factor for competition with ETB-negative *S. aureus* strains<br>○Kawada-Matsuo M[1], Sugai M[2], Komatsuzawa H[1] ([1]Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Bacteriol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |

| | |
|---|---|
| O1-D1 | Galectin-9 negatively regulates osteoclast differentiation through control of MafB expression<br>○Kyumoto Y[1], Uehara N[1], Kukita A[2], Kukita T[1] ([1]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Microbiol, Fac Med, Saga Univ) |
| O1-D2 | A functional collaboration between Foxc1 and Ihh-Gli2 is critical for endochondral ossification<br>○Hata K[1], Yoshida M[1,2], Nakamura E[1], Takahata Y[1], Murakami T[1], Iseki S[3], Yamamoto-Takano T[2], Nishimura R[1] ([1]Dept Biochem, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Orthodont Dentofacial Orthopedics, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Mol Craniofacial Embryol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Dent) |
| O1-D3 | H3K9MTase G9a is required for proper tooth formation<br>○Kamiunten T[1], Ideno H[2], Nakamura Y[1], Nakashima K[2], Shimada A[2], Nifuji A[2] ([1]Dept Orthodont, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| O1-D4 | Histological alterations of bone matrix surrounding osteocytes in mice with PTH administration and in lactating mice fed with calcium insufficient diet<br>○Hongo H[1], Sasaki M[2], Saito M[3], Udagawa N[4], Amizuka N[1] ([1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Dept Appl Pros, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [3]Bruker AXS K K, [4]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ) |
| O1-D5 | Ultrastructural assessment for biological function of vascular endothelial cells at chondro-osseous junction<br>○Tsuchiya E[1,2], Hongo H[1], Yamamoto T[1], Hasegawa T[1], Amizuka N[1] ([1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Oral Diagnosis Med, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| O1-D6 | Histochemical examination on bone cells in obese type 2 diabetic SDT fatty rats<br>○Tsuboi K, Hongo H, Hasegawa T, Amizuka N (Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| O1-D7 | Immunohistochemical analysis of ossification of pterygoid in embryonic mice<br>○Kitamura K, Yamamoto M, Umezawa T, Serikawa M, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent) |
| O1-D8 | Isolation and characterization of dental epithelial cells derived from amelogenesis imperfecta rat as an *in vitro* disease model<br>○Arya Adiningrat[1], Tanimura A[2], Miyoshi K[2], Horiguchi T[2], Noma T[2] ([1]Grad Sch Oral Sci, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci, [2]Dept Mol Biol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci) |
| O1-D9 | Glycation of dentinal collagen with human aging<br>○Shimizu M, Miura J (Div Interdisci Dent, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| O1-D10 | Malformation of the apical region on molars in mice irradiated to the head<br>○Ide Y[1], Nakahara T[1], Nasu M[2], Ishikawa H[3] ([1]Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [2]Res Cent for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [3]Dept NDU Life Sci, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| O1-D11 | Why we do not have a hypothesis for the tooth root morphogenesis<br>○Kozawa Y (Comp Anat Odont) |
| O1-D12 | Functional significance of sodium-dependent glucose transporters in the process of ameloblast differentiation<br>○Ida-Yonemochi H, Ohshima H (Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-E1 | Possible mechanism of positive pressure-induced cell proliferation in oral squamous cell carcinoma<br>○Yoshimoto S[1], Morita H[3], Nakamura S[2], Hirata M[1] ([1]Lab Mol Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Sec Oral and Maxillac Oncol, Div Maxillac Diag Surg Sci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [3]Sect General Dent, Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll) |
| O1-E2 | The 3'-UTR of TPD family mRNA is post-transcriptional regulation on its gene expression<br>○Motohashi H, Mukudai Y (Dept Oral Surgery, Sch Dent, Showa Univ) |
| O1-E3 | Fabrication of bone graft materials using iPS cells<br>○Yamamoto H[1], Kayashima H[1], Yatani H[1], Egusa H[1,2] ([1]Dept Fixed, Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O1-E4 | AMPA receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons is involved in dry tongue pain<br>○Nakaya Y[1], Tsuboi Y[2], Shinoda M[2], Iwata K[2] ([1]Dept Oral Diagnostic, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| O1-E5 | Induction of osteogenic differentiation stimulated by vibration<br>○Ota T, Chiba M, Hayashi H (Div Oral Physiol, Tohoku Univ, Grad Sch Dent) |
| O1-E6 | Elucidating the role of the dominant expression TRPM7 in tooth and its calcification<br>○Ogata K[1,2], Oka K[2], Fukushima H[1], Okamoto F[1], Nagashima K[1], Ozaki M[2], Okabe K[1] ([1]Sec Cellular Physiol, Fukuoka Dent Coll, [2]Sec Pediatric Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll) |
| O1-E7 | Roles of transcriptional factor Mohawk in PDL<br>○Koda N[1,2], Moriyama K[2] ([1]Dept Systems BioMed, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Maxillofacial Orthognathics, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-E8 | Development and distributional pattern of the elastic fiber system in the periodontal tissue of rats<br>○Inoue K[1], Hara Y[2], Sato T[2] ([1]Res Cent Elec Micros Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Dept Anat and Hist. Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| O1-E9 | Analyses of the ameloblast differentiation mechanism by Sox21<br>○Saito K, Fukumoto S (Div Pediatric Dent, Tohoku Univ) |
| O1-E10 | Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho-YAP signaling<br>○Otsu K, Fujiwara N, Harada H (Dept Anat, Div Dev Biol Regen Med, Iwate Med Univ) |
| O1-E11 | Mechanisms maintaining quiescent stem cells in the incisor apical bud and the incisor and molar dental pulp in mice<br>○Ishikawa Y[1], Nakatomi M[2], Ohshima H[3] ([1]Div Oral Sci Health Promotion, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Anat, Dept Oral Health Improvement, Kyushu Dent Univ, [3]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |

| | |
|---|---|
| O1-E12 | Elimination-effect of outer enamel epithelium and stellate reticulum on tooth germ development<br>○Tabata MJ, Sugiura M (Sec Biostructural Sci, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-F1 | Invasive/metastatic properties and tumor-stromal microenvironments of human oral squamous cell carcinoma cells in a xenograft mouse model<br>○Shirako Y[1], Sato K[1], Taya Y[1], Aoba T[1], Shimazu Y[2], Soeno Y[1] ([1]Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent, [2]Dept Life Food Sci, Azabu Univ Sch Life Environmental Sci) |
| O1-F2 | Expression and functional analyses of DKK3 in oral head and neck squamous cell carcinoma (OSCC)<br>○Katase N (Dept Mol Dev Biol Kawasaki Med Sch) |
| O1-F3 | Mechanisms of tumor suppression by chemokine CXCL14: Synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells on the suppression of metastasis on the lung<br>○Yang X[1], Miyamoto C[1,2], Izukuri K[1,2], Kato Y[3], Hata R[1,2] ([1]Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Biol Kanagawa Dent Univ, [3]Dept Oral Fxn Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent) |
| O1-F4 | Elucidation of mechanisms on anticancer drug delivery system using bubble immunoliposomes<br>○Hirabayashi F[1,2], Iwanaga K[2], Okinaga T[1], Ariyoshi W[1], Nishihara T[1] ([1]Div Infect Mol Biol, Dept Health Promotion, Kyushu Dent Univ, [2]Div Oral and Maxillacial Surgery, Dept Sci Physical Functions, Kyushu Dent Univ) |
| O1-F5 | What is the role of molecular chaperone R2TP complex in oral squamous cell carcinoma? -applying lessons from yeast to human cancer research-<br>○Kakihara Y[1], Yamazaki M[2], Saeki M[1] ([1]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Oral Pathol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-F6 | Does acidic extracellular pH function to promote EMT as the microenvironment factor?<br>○Suzuki A, Maeda T, Yuzawa S, Kato Y (Dept Oral Fnx Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent) |
| O1-F7 | Curdlan regulates osteoclast formation by autophagic/lysosomal degradation of syk protein<br>○Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T (Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ) |
| O1-F8 | Remodeling-based and mini-modeling-based bone formation induced by PTH administration with different intervals<br>○Yamamoto T[1], Hasegawa T[1], Hongo H[1], Haraguchi M[1], Oda K[2], Amizuka N[1] ([1]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Div Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-F9 | Elucidation of anabolic effects in bone by intermittent PTH administration<br>○Hirose K, Sato S, Oya K, Noda Y, Sharyo M, Toyosawa S (Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Med Dent) |
| O1-F10 | A spatiotemporal role of NF-$\kappa$B in endochondral ossification and bone growth<br>○Nakatomi C, Urata M, Matsubara T, Kokabu S, Jimi E (Div Mol Signaling and Biochem, Kyushu Dent Univ) |
| O1-F11 | Localization of septoclasts in Meckel's cartilage of mice and their three-dimensional morphology<br>○Sakashita H[1,2], Bando Y[1], Taira F[1,2], Sakiyama K[1], Amano O[1] ([1]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div Oral Surg II, Meikai Univ Sch Dent) |
| O1-F12 | Induction of growth arrest and morphological alteration in septoclasts by deficiency and excess of retinoic acids<br>○Bando Y, Sakashita H, Sakiyama K, Amano O (Div Anat, Meikai Univ Sch Dent) |
| O1-G1 | IL-1alpha inducing activity of *Streptococcus sanguinis*<br>○Saeki A[1], Hasebe A[1], Nakazawa F[2], Shibata K[1] ([1]Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| O1-G2 | Masticatory mucosa-associated B7-H1 protects excess immune-related tissue damage<br>○Kang SW, Ohno T, Nagai S, Azuma M (Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-G3 | Investigation of colony spreading related factors in *Flavobacterium johnsoniae*<br>○Imamura K[1], Kondo Y[1], Sato K[2], Narita Y[3], Fujiwara T[1], Nakayama K[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [3]Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll) |
| O1-G4 | Molecular evolutionary analysis on inactive sialidase of *Streptococcus agalactiae*<br>○Yamaguchi M[1], Nakata M[1], Hirose Y[1,2], Goto K[1], Sumitomo T[1], Kawabata S[1] ([1]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Urol, Nagoya Univ Grad Sch Med) |
| O1-G5 | The effect of cyclic dipeptide on the oral biofilm formation at early stage<br>○Mashima I[1,2], Miyakawa H[2], Nakazawa F[2] ([1]Research Fellow JSPS, [2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| O1-G6 | Intracellular growth of *Salmonella* Typhimurium is inhibited by autophagic regulation of PLC-related catalytically inactive protein<br>○Harada-Hada K, Kanematsu T (Dept Mol Cell Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| O1-G7 | Effects of hypercapnia on respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles<br>○Tachikawa S[1], Nakayama K[1], Mochizuki A[1], Nakamura S[1], Kiyomoto M[1], Iijima T[2], Inoue T[1] ([1]Dept Oral Physi, Showa Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Perioperative Med Div Anesthesiol, Showa Univ Sch Dent) |
| O1-G8 | The effects of citalopram on masseter muscle activities in mice<br>○Nogawa Y[1,2], Motizuki A[1], Kato T[3], Katayama K[4], Abe Y[4], Nakamura S[1], Nakayama K[1], Wakabayashi N[2], Baba K[4], Inoue T[1] ([1]Dept Oral Physi, Showa Univ Grad Sch Dent, [2]Removable Partial Prosth, Tokyo Med Dent Univ, Grad Sch Med Dent Sci, [3]Dept Oral Anat Neurobio, Osaka Univ Grad Sch Dent, [4]Dept Prosth, Showa Univ Sch Dent) |
| O1-G9 | Direct projection from lateral habenula to trigeminalmesencephalic nucleus neurons in rats<br>○Ohara H[1,2], Sato F[1], Kato T[1], Yamashiro T[2], Yoshida A[1] ([1]Dept Oral Anat Neurobiol, Grad Sch Dent, Osaka Univ, [2]Dept Orthodont Dentofacial Orthopedics, Grad Sch Dent, Osaka Univ) |

| | |
|---|---|
| O1-G10 | Neural circuits connecting visceral sense and feeding behavior<br>○Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A, Goto T (Dept Oral Anat Cell Biol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O1-G11 | The roles of the thalamus and cerebral cortex in descending pain modulation<br>○Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Goto T (Dept Oral Anat Cell Biol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O2-C1 | The role of cAMP sensor Epac1 in skeletal muscle hypertrophy induced by beta2-adrenoceptor stimulation<br>○Ohnuki Y[1], Umeki D[2], Ito A[2], Okumura S[1] ([1]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med, [2]Dept Orthod, Tsurumi Univ Sch Dent Med) |
| O2-C2 | Comparison for the sensitivity to inhibitors of alkaline phosphatase activity derived from tumor and non-tumor cells<br>○Kawamura R[1,3], Deyama Y[2,4], Yoshimura Y[2], Suzuki K[2], Yamazaki Y[1] ([1]Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [2]Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [3]Matsuzaki Dent Clinic, [4]Poplar Avenue Dent Clinic) |
| O2-C3 | The effect of 3-deazaneplanocin A on gene expression in oral squamous cell carcinoma cells<br>○Hatta M[1], Naganuma K[2], Arita S[1,3], Ishii T[1,4], Ohkubo T[1], Yamazaki J[1] ([1]Dept Physiol Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll, [2]Dept Oral Maxillac Surg, Fukuoka Dent Coll, [3]Dept Odontol, Fukuoka Dent Coll, [4]Dept Oral Growth Develop, Fukuoka Dent Coll) |
| O2-C4 | Hydroxyapatite affects contact osteogenesis after immediately placed titanium implantation in mice<br>○Watanabe T, Saito K, Ohshima H (Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| O2-C5 | Annexin A5 null mice show hyper tooth attrition and excess bony outgrowth of the jaws<br>○Shimada A[1], Komatsu K[1], Arai Y[2], Ohnuki Y[3], Nakashima K[1], Yamashita T[4], Okumura S[3], Nifuji A[1] ([1]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Nihon Univ Sch Dent, [3]Dept Physiol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [4]Div Hard Tissue Res, Inst for Oral Sci Matsumoto Dent Univ) |
| O2-C6 | Semaphorin 3A promotes dendrite elongation in association with downregulation of cdk6 and inhibition of tyrosine 705 phosphorylation of STAT3 in osteocytes<br>○Niimura M[1,2], Sato T[1], Hayashi N[1], Okubo M[1], Enoki Y[1], Kokabu S[3], Yoda T[1] ([1]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Saitama Med Univ, [2]Niimura Dent Clinic, [3]Div Mol Signaling and Biochem, Dept Health Improvement, Kyushu Dent Univ) |
| O2-D1 | Bone response to static compressive stress at bone-implant interface: A study of critical static compressive stress<br>○Ikumi N, Suzawa T, Yoshimura K, Kamijo R (Dept Oral Biochem, Showa Univ) |
| O2-D2 | Biological apatite crystallographic orientation of peri-implant bone in beagle<br>○Odaka K, Matsunaga S, Hirouchi H, Kasahara M, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent) |
| O2-D3 | The biological function of acid-electrolyzed functional water<br>○Asano M (Dept Pathol, Nihon Univ Sch Dent) |
| O2-D4 | The development of chronic inflammation in oral diseases<br>○Murakami T, Takahata Y, Hata K, Nishimura R (Dept Mol Cell Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| O2-D5 | Omega-3 fatty acids downregulated inflammasome activity in periodontopathic bacteria invasion in macrophages<br>○Okinaga T, Ariyoshi W, Nishihara T (Div Infect Micro Biol, Kyushu Dent Univ) |
| O2-D6 | The nitrogen-containing bisphosphonate up-regulated the release of caspase-1 via Smad3 activation<br>○Tamai R, Kobayashi M, Kiyoura Y (Dept Oral Med Sci, Ohu Univ Sch Dent) |
| O2-E1 | A novel protein PPP1r18 is involved in actin ring formation of osteoclasts<br>○Matsubara T[1], Kinbara M[2], Maeda T[2], Yoshizawa M[2], Nakatomi C[1], Kokabu S[1], Jimi E[1], Yamamoto-Takano T[2] ([1]Dept Mol Signal Biochem, Kyushu Dent Univ, [2]Div Orthodo Dentofacial Orthopedics, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| O2-E2 | Bone resorption suppresses sclerostin expression in osteocytes and promotes Wnt/$\beta$-catenin signaling<br>○Koide M[1], Kobayashi Y[1], Yamashita T[1], Uehara S[2], Iimura T[3], Nakamura M[2], Takahashi N[1], Udagawa N[1,2] ([1]Inst Oral Sci, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ, [3]Div Bio-Imaging, Proteo-Science Center, Ehime Univ) |
| O2-E3 | BMP2 regulates expression of a Wnt antagonist FRZB, a putative therapeutic target for osteoarthritis, through Msx2 and Osterix<br>○Yagi H, Takahata Y, Murakami T, Hata K, Nishimura R (Dept Mol Cell Biochem, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| O2-E4 | A novel regulatory factor in osteoclastogenesis DCL-1/CD302 and the role of its binding to CCN2<br>○Aoyama E[1], Hoshijima M[1], Hattori T[2], Kubota S[1,2], Takigawa M[1] ([1]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci) |
| O2-E5 | CCN2 regulates osteoclastogenesis through the osteocyte functions<br>○Nishida T[1], Kubota S[1,2], Hattori T[1], Takigawa M[2] ([1]Dept Biochem Mol Dent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci) |
| O2-E6 | Role of interaction between CCN2 and Rab14 GTPase in vesicle trafficking in chondrocytes—Novel intracellular function of CCN2—<br>○Hoshijima M[1], Hattori T[3], Aoyama E[2], Nishida T[3], Kubota S[3], Kamioka H[1], Takigawa M[2] ([1]Dept Orthod, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [3]Dept Biochem Mol Dent Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pham Sci) |
| O2-F1 | Mechanisms for enhancement of osteoblastogenesis and suppression of osteoclastogenesis by phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha<br>○Hamamura K, Togari A (Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| O2-F2 | PP2A C$\alpha$ is an important factor for osteoblast and adipocyte differentiation<br>○Okamura H, Teramachi J, Haneji T (Dept Histol Oral Histol Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci) |

| | |
|---|---|
| **O2-F3** | Involvement of YAP/TAZ transcription co-activator with stimulated osteoblast formation by mechanical tensile stress in cranial sutures<br>○Ikegame M[1,2], Yamamoto T[1] ([1]Dept Oral Morph, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]ARCOCS, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci) |
| **O2-F4** | Long-term oral administration of osteocalcin triggers insulin resistance in male mice<br>○Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M (Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **O2-F5** | Energy metabolism regulated by PRIP<br>○Kanematsu T (Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| **O2-F6** | STAT3 integrates cooperative Ras and TGF-beta signals that induce Snail expression<br>○Saitoh M (Div Biological Chem Grad Sch Med Univ Yamanashi) |
| **O2-G1** | Lymphatic differentiation from venous endothelial cells in the craniofacial region of embryonic mice<br>○Taya Y, Soeno Y, Shirako Y, Aoba T, Sato K (Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **O2-G2** | The role of *Ofd1* in palatal development<br>○Watanabe M[1,2], Kawasaki M[1], Takagi R[2], Maeda T[1], Ohazama A[1] ([1]Div Oral Anat, Dept Oral Biosci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Oral Maxillofacial Surg, Dept Health Sci, Course for Oral Sci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent) |
| **O2-G3** | Expression of MRFs during development of pharyngeal muscle in mouse fetus<br>○Kishi A, Saito H, Usami A (Div Oral Anat, Ohu Univ Sch Dent) |
| **O2-G4** | Dental pulp cells-derived spheroids differentiated into functional neuronal cells under three-dimensional culture conditions<br>○Xiao L[1], Saiki C[2], Ide R[2] ([1]Dept Pharm, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [2]Dept Phys, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **O2-G5** | Temperature-controlled repeated thermal stimulation induces neuronal differentiation in PC12 cells<br>○Kudo T[1], Kanetaka H[2] ([1]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Liaison Cent for Innovative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **O2-G6** | The role of lysophospholipid acyltransferases in neuronal differentiation<br>○Tabe S[1,2], Hikiji H[3], Ariyoshi W[1], Okinaga T[1], Nishihara T[1] ([1]Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, [2]Div Oral Maxillac Surg, Kyushu Dent Univ, [3]Dept Oral Func Management, Kyushu Dent Univ) |

# ■ Poster Presentation

| | |
|---|---|
| **P1-1** | Morphological and molecular characterization of microfold cells in nasopharynx-associated lymphoid tissue<br>○Mutoh M[1], Kimura S[2], Yoshizawa S[1], Iwanaga T[2], Iida J[1] ([1]Dept Ortho, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Lab Histo Cyto, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent) |
| **P1-2** | Degeneration and macrophage infiltration of labial mucosal epithelium in xerostomia patients<br>○Yoshimoto R[1], Aijima R[2], Yoshizumi J[3], Kitsuki T[3], Danjo A[4], Yamashita Y[4], Kido M[5] ([1]Dept Periodontol, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Dept Anat Physiol, Saga Med Sch, [3]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ, [4]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Saga Med Sch, [5]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P1-3** | The distribution of number of nuclei of odontoclasts in human deciduous teeth with endodontic treatments<br>○Yagihara S[1], Domon T[2], Yawaka Y[1] ([1]Dept Dent for Children and Disabled Persons, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent, [2]Dept Oral Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Med Dent) |
| **P1-4** | Altered osteocyte network and preferential alignment of biological apatite c-axis around loaded implants in rabbits<br>○Sasaki M[1], Kuroshima S[1], Nakano T[2], Sawase T[1] ([1]Dept Appl Prosth, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Div Mater and Manu Sci, Grad Sch Eng, Osaka Univ) |
| **P1-5** | Osteoinductivity of iPS cell constructs using Simvastatin<br>○Okawa H[1,2], Kosaka Y[1], Niibe K[1], Yatani H[2], Egusa H[1,2] ([1]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-6** | Morphometric analysis of tibia and mandible in osteoporotic mouse models caused by ovariectomy and senescence-accelerated mice<br>○Morita S, Odaka K, Kasahara M, Matsunaga S, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll) |
| **P1-7** | Lectin-like ox-LDL receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state<br>○Ito J, Hayashida C, Ohyama Y, Sato T, Hakeda Y (Div Oral Anat Meikai Univ Sch Dent) |
| **P1-8** | Behavior of microglia and astrocyte in trigeminal motor nucleus following masseteric nerve injury in the rat<br>○Ogura H[1,2], Honma S[1,3], Wakisaka S[1], Kogo M[2] ([1]Dept Oral Anat Dev Biol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]First Dept Oral Maxillofacial Surgery, Osaka Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Oral Health Sci, Fac Nursing Health Care, Baika Women's Univ) |
| **P1-9** | Distribution of transient receptor potential melastatin-8-containing nerve fibers in rat oral and craniofacial structures<br>○Yajima T[1], Sato T[2], Ichikawa H[2] ([1]Div Operative Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral and Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-10** | Constitutive activation of p46JNK2 is indispensable to induce the C/EBPdelta expression in the initial stage of adipogenic differentiation<br>○Kusuyama J[1,2], Bandow K[3], Ohnishi T[2], Semba I[1], Matsuguchi T[2] ([1]Dept Oral Pathol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [3]Dept Oral Biol Tissue Eng, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P1-11** | Roles of FKBP12 and BMP typeII receptors in BMP signaling by mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)<br>○Machiya A[1,2], Fujimoto M[1,2], Suda N[2], Katagiri T[1] ([1]Div Pathophysiol, Res Center for Genomic Med, Saitama Med Univ, [2]Div Orthod, Dep Human Development and Fostering, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P1-12** | Zolerdronic acid suppresses TGF-$\beta$-induced fibrogenesis by HGFs through the down-regulation of its receptor expression and inhibition of Smad-dependent signaling<br>○Komatsu Y[1,2], Ibi M[3], Chousa N[2], Kyakumoto S[2], Kamo M[2], Sugiyama Y[1], Ishisaki A[2] ([1]Div Oral Surgery, Dept Oral and Maxillofacial Surg, Iwate Med Univ, [2]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ, [3]Div Mol and Cell Pharmacol Sch Pharmaceutical Sci, Iwate Med Univ) |
| **P1-13** | Birt-Hogg-Dube (BHD) complex play critical roles in energy state dependent mTOR activition by triggering the b-TRCP- and CK1a-Dependent Degradation of FNIP2<br>○Nagashima K[1,2], Fukushima H[1], Okamoto F[1], Ogata K[1], Nagaoka Y[1,2], Okabe K[1] ([1]Sec Cell Physiol, Dept Physiological Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll, [2]Sec Oral Surgery, Dept Oral Maxillofacial Surg, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-14** | Action of TGF-beta 1 in root-surrounding tissues of porcine milk teeth<br>○Shimazaki E[1], Karakida T[2], Oida S[2], Asada Y[1], Yamakoshi Y[2] ([1]Dept Pediatr Dent, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| **P1-15** | TGF-beta 1 in porcine pulp and dentin<br>○Niwa T[1], Yamamoto R[2], Yamakawa S[3], Nagano T[1], Ooida S[2], Gomi K[1], Yamakoshi Y[2] ([1]Dept Perio, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [3]Dept Endo, Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| **P1-16** | Remineralization strategy for enamel subsurface lesions after bleaching therapy —Evaluation using saliva infiltration model—<br>○Iizuka J[1], Taniguchi M[2], Takagaki Y[3], Mukai Y[1] ([1]Dept Cario Rest, Kanagawa Dent Univ, [2]Dept Radiol Sci, Kanagawa Dent Univ, [3]Div Mol Cell Biol Miner Tissues, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ) |
| **P1-17** | Interleukin-1beta-induced Atg5 regulates the proliferation of mouse embryonic stem cell-derived odontoblastic cells by the Wnt5 signaling pathway<br>○Hiyama T[1], Ozeki N[1], Yamaguchi H[1], Kawai R[1], Mogi M[2], Nakata K[1] ([1]Dept Endo, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Medicinal Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ) |
| **P1-18** | Characterization of iPS cells derived from cleidocranial dysplasia syndrome and basal cell nevus syndrome primary oral tissue fibroblast<br>○Onodera S[1], Saito A[1], Shino-Ochiai H[1], Ohtaka M[4], Ooki A[2], Hasegawa D[3], Shibahara T[3], Sueishi K[2], Nakanishi M[4], Azuma T[1] ([1]Dept Biochem, Tokyo Dent Coll, [2]Dept Oral Orthodont, Tokyo Dent Coll, [3]Dept Oral Surgery, Tokyo Dent Coll, [4]AIST) |
| **P1-19** | Cdc42 expressed in neural crest cells are essential during palatal development<br>○Oshima M[1,2], Yamada A[1], Suzuki D[1], Maki K[2], Kamijo R[1] ([1]Dept Oral Biochem, Showa Univ Sch Dent, [2]Dept Ortho, Showa Univ Sch Dent) |
| **P1-20** | Evaluation of dentin particles combined with stem cells as a bone substitute<br>○Okuno K[1,2], Kawaki H[2], Tanaka M[1], Oguri K[1], Kawano S[1], Kamiya M[2,3], Takayama E[2], Yoshida T[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Endodont, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin) |

| | |
|---|---|
| **P1-21** | CCN4/WISP-1 up-regulates the TGF-b3-induced chondrogenesis<br>○Yoshioka Y, Ono M, Kuboki T (Dept Oral Rehabil, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci) |
| **P1-22** | Physiological behavior of human bone marrow stem cell activities on the hydrophilic titanium disks<br>○Shintani K[1,2], Kawaki H[2], Kamiya M[2,3], Takayama E[2], Doi Y[4], Hotta M[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Operative Dent, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, [4]Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P1-23** | High throughput gene analysis of mouse osteoblastic cells on magnetic fields<br>○Fukuzawa R, Ozawa S, Kojima N, Takebe J (Dept Removable Prosthodont, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P1-24** | Fabrication of bone graft materials using iPS cells<br>○Yamamoto H[1], Kayashima H[1], Yatani H[1], Egusa H[1,2] ([1]Dept Fixed, Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-25** | Evaluation of bone regeneration by carbonate apatite as a bone substitute<br>○Takahashi J[1,2], Kawaki H[2], Kondo Y[1], Kamiya M[2,3], Takayama E[2], Doi Y[4], Tanabe T[1], Nagahara K[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Implantol, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin, [4]Dept Dent Mater Sci, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P1-26** | Hyaluronic acid inhibits TNF-alpha-induced MMP13 expression in human chondrocyte<br>○Furuta J[1,2], Okinaga T[1], Ariyoshi W[1], Nishihara T[1] ([1]Div Infect and Mol Biol, Kyushu Dent Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral-Maxillac Surg, Kyushu Dent Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-27** | Possible mechanism of positive pressure-induced cell proliferation in oral squamous cell carcinoma<br>○Yoshimoto S[1], Morita H[3], Nakamura S[2], Hirata M[1] ([1]Lab Mol Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Sec Oral and Maxillfac Oncol, Div Maxillac Diag Surg Sci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [3]Sect General Dent, Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-28** | The 3'-UTR of TPD family mRNA is post-transcriptional regulation on its gene expression<br>○Motohashi H, Mukudai Y (Dept Oral Surg, Sch Dent, Showa Univ) |
| **P1-29** | Transition of antitumor immunity depending on the developed malignancies of implanted mouse oral squamous cell carcinoma cells<br>○Sumi S[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Ito H[1,2], Adachi M[1,2], Inagaki T[1,2], Muramatsu Y[1], Sumitomo S[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin) |
| **P1-30** | Induction of c-c motif chemokine 2 (Ccl2) in mesenchymal cells (10T1/2) by humoral transmission of mouse oral squamous cell carcinoma cells (Sq1979).<br>○Ito H[1,2], Adachi M[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Inagaki T[1,2], Sumi S[1,2], Muramatsu Y[1], Sumitomo S[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin) |
| **P1-31** | Modulatory effects of progressive phenotypes of mouse OSCC cells on cytokine-producing capability of host spleen cells<br>○Inagaki T[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Ito H[1,2], Sumi S[1,2], Adachi M[1,2], Sumitomo S[1], Muramatsu Y[1], Kondoh N[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin) |
| **P1-32** | Elucidating the role of the dominant expression TRPM7 in tooth and its calcification<br>○Ogata K[1,2], Oka K[2], Fukushima H[1], Okamoto F[1], Nagashima K[1], Ozaki M[2], Okabe K[1] ([1]Sec Cell Physiol, Dept Physiological Sci Mol Biol, Fukuoka Dent Coll, [2]Sec Pediatr Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-33** | Expression of store-operated $Ca^{2+}$ entry (SOCE) ($Ca^{2+}$ release-activated $Ca^{2+}$ (CRAC) channels) in rat odontoblasts<br>○Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Tazaki M, Shibukawa Y (Dept Physiol, Tokyo Dent Coll) |
| **P1-34** | Involvement of CXCR4 in mechanical sensitivity of periodontal tissue in periodontitis-mice<br>○Nagashima H[1], Shinoda M[2], Sugano N[1], Sato S[1], Iwata K[2] ([1]Dept Periodont, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-35** | Salivary dysfunction in diabetic KK-Ay mouse model<br>○Munemasa T[1], Mukaibo T[1], Kondo Y[1], Kusuda Y[1], Miyagi Y[1], Masaki C[1], Hosokawa R[1], Nakamoto T[1,2] ([1]Dept Oral Reconstruction and Rehabilitation, Kyushu Dent Univ, [2]Dept Prosthodont, Matsumoto Dent Univ) |
| **P1-36** | Induction of osteogenic differentiation stimulated by vibration<br>○Ota T, Chiba M, Hayashi H (Div Oral Physiol, Tohoku Univ, Grad Sch Dent) |
| **P1-37** | p38 phosphorylation in trigeminal ganglion neuron contributes tongue heat hypersensitivity induced by TNBS application<br>○Maruno M[1,2], Ito R[1,2], Shinoda M[2], Iwata K[2] ([1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-38** | Metabotropic glutamate receptor signaling is involved in cancer pain and cancer growth<br>○Honda K, Shinoda M, Iwata K (Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-39** | Involvement of activated satellite cells in masseter muscle pain spread following temporomandibular joint inflammation<br>○Ito R[1,2], Maruno M[1,2], Shinoda M[2], Iwata K[2] ([1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-40** | Synaptic connections between locus coeruleus and trigeminal mesencephalic nucleus neurons<br>○Yin D, Saito M, Sato H, Kawano T, Toyoda H, Kang Y (Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-41** | Enhanced SOCE in layer 3 pyramidal cells in the barrel cortex of PRIP-1/2 double KO mice<br>○Kawano T[1], Toyoda H[1], Saito M[1], Sato H[1], Yin D[1], Kanematsu T[2], Hirata M[3], Kang Y[1] ([1]Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Div Integrated Med Sci Dept Dent, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci, [3]Lab Mol Cell Biochem, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |

| | |
|---|---|
| **P1-42** | Serotonergic modulation of glutamate-evoked responses in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons<br>○Dantsuji M[1,2], Nakamura S[2], Nakayama K[2], Mochizuki A[2], Kiyomoto M[2], Ozeki M[1], Inoue T[2] ([1]Dept Oral Implant Dent, Showa Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent) |
| **P1-43** | Histaminergic presynaptic inhibition of synaptic inputs from the mesencephalic trigeminal nucleus to masseter motoneurons via H1 receptors<br>○Gemba C[1,2], Nakayama K[2], Mochizuki A[2], Nakamura S[2], Inoue M[1], Inoue T[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Showa Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent) |
| **P1-44** | The alteration of reflex excitability during quiet sleep in rats in postoperative recovery period<br>○Odai R[1], Adachi K[2], Watanabe S[1], Sakagami H[2] ([1]Dept Oral Pediatric, Meikai Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P1-45** | AMPA receptor phosphorylation in Vc nociceptive neurons is involved in dry tongue pain<br>○Nakaya Y[1], Tsuboi Y[2], Shinoda M[2], Iwata K[2] ([1]Dept Oral Diagnostic, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-46** | Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in Vc-C1 neurons projecting lateral and medial thalamic nuclei<br>○Saito H[1,2], Katagiri A[2], Iwata K[2] ([1]Dept Complete Denture Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dent Physiol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-47** | A new method for the study of velopharyngeal function using digital barometer<br>○Hasegawa M[1,2], Yamada Y[3], Kurose M[2], Fujii N[1], Yamamura K[2] ([1]General Dent Clinic Edu Unit, Niigata Univ Med Dent Hosp, [2]Div Oral Physiol, Niigata Univ Grad Med Dent Sci, [3]Tokyo Dent Coll) |
| **P1-48** | Influence of the aging on ability for control of voluntary lip-closing force using the visual feedback<br>○Hijiya K[1], Yamada K[1], Masuda Y[2] ([1]Dept Hard Tissue Res, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Oral Maxillofacial Biol, Grad Sch Oral Med, Matsumoto Dent Univ) |
| **P1-49** | Mechanism underlying oral ulcer-induced pain in 5-fluorouracil-received rat model<br>○Yamaguchi K[1,2], Ono K[1], Hitomi S[1], Harano N[2], Sago T[2], Watanabe S[2], Inenaga K[1] ([1]Dept Physiol, Kyushu Dent Univ, [2]Dept Dent Anesthesiol, Kyushu Dent Univ) |
| **P1-50** | A new rat model for oral ulcer pain following orthodontic wire appliance<br>○Ito M[1], Ono K[2], Hitomi S[2], Yamaguchi K[2], Kawamoto T[1], Inenaga K[2] ([1]Kyushu Dent Univ, Div Oracial Functions Ortho, [2]Div Physiol Kyushu Dent Univ) |
| **P1-51** | The self-amplification of sweet taste responses via cannabinoid receptor in taste cells<br>○Iwata S, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y (Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P1-52** | Hertwig's epithelial sheath cells through epithelial mesenchymal transition (EMT) interact with periodontal ligament development<br>○Itaya S[1], Oka K[1], Tatsuoka M[1], Fujiwara N[2], Harada H[2], Ozaki M[1] ([1]Sec Pediatric Dent, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll, [2]Div Development Biol and Regenerative Med, Dept Anat, Iwate Med Univ) |
| **P1-53** | Effect of the deletion of TRPV4 on the barrier of gingival epithelia<br>○Kitsuki T[1], Aijima R[1,3], Hatakeyama J[1,4], Ohsaki Y[1], Zhang J[1], Kido M[1] ([1]Dept Mol Cell Bio Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Maxillofacial Surgery Fac Dent Sci Kyushu Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Oral and Maxillofacial Surgery, Fac Med, Saga Univ, [4]Dept Odontol, Fac Dent, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-54** | Comparison of osteoblast differentiation on the zirconia and titanium disc<br>○Saito M[1], Karakida T[1], Yamamoto R[1], Nagano T[2], Yamakoshi Y[1], Gomi K[2], Oida S[1] ([1]Dept Biochem Mol Biol, Sch Dent Med Tsurumi Univ, [2]Dept Periodontol, Sch Dent Med Tsurumi Univ) |
| **P1-55** | Regenerative neural cells using human adipose stem cells derived from buccal fat pad for promising source of cell transplantation therapy<br>○Takahashi H[1,2], Ishikawa H[2], Tanaka A[1,3] ([1]Dept OMS, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept NDU Life Sci, Tokyo, Nippon Dent Univ, [3]Div Cell Reg Trans, Advan Res Cent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata) |
| **P1-56** | PKP1, a novel Wnt signaling regulator, is critical for tooth development<br>○Miyazaki K, Yoshizaki K, Arai C, Han X, Funada K, Takahashi I (Sect Orthod Dentofacial Orthop, Div Oral Health, Growth Dev, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch) |
| **P1-57** | A basement membrane protein Nephronectin is involved in dental epithelial stem cell differentiation and proliferation<br>○Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Han X, Funada K, Takahashi I (Sect Orthod Dentofatial Orthop, Div Oral Health, Growth Dev, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch) |
| **P1-58** | Expression of epithelial to mesenchymal transition molecules in mice palatal wound repair process<br>○Aijima R[1,2], Kitsuki T[3], Yoshimoto R[3], Ohsaki Y[3], Zhang JQ[3], Danjo A[2], Yamashita Y[2], Kido M[3] ([1]Div Histo Neuroanatomy, Fac Med, Saga Univ, [2]Dept Oral Maxillac, Fac Medicine, Saga Univ, [3]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ Grad Sch Dent Sci) |
| **P1-59** | H3K9MTase G9a is required for proper tooth formation<br>○Kamiunten T[1], Ideno H[2], Nakamura Y[1], Nakashima K[2], Shimada A[2], Nifuji A[2] ([1]Dept Orthodont, Sch Dent Med, Tsurumi Univ, [2]Dept Pharmacol, Sch Dent Med, Tsurumi Univ) |
| **P1-60** | Stem cell properties of CD146-positive (CD146$^+$) dental pulp stem cells (DPSCs) for generated dentin/pulp-like structures<br>○Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui T (Dept Pharmacol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P1-61** | Can irreversible inflamed dental pulp-derived dental pulp stem cells be suitable for dental pulp regeneration?<br>○Sonoda S[1,2], Yamaza T[2], Kukita T[2] ([1]Dept Periodontol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Mol Anat and Cell Biol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P1-62** | The effects of intermittent PTH on alveolar bone<br>○Takebe H, Irie K (Dept Histol, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P1-63** | Histological alterations of bone matrix surrounding osteocytes in mice with PTH administration and in lactating mice fed with calcium insufficient diet<br>○Hongo H[1], Sasaki M[2], Saito M[3], Udagawa N[4], Amizuka N[1] ([1]Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Dept Appl Pros, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [3]Bruker AXS K K, [4]Dept Biochem, Matsumoto Dent Univ) |

| | |
|---|---|
| **P1-64** | Histochemical examination on bone cells in obese type 2 diabetic SDT fatty rats<br>○Tsuboi K, Hongo H, Hasegawa T, Amizuka N (Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| **P1-65** | Galectin-9 negatively regulates osteoclast differentiation through control of MafB expression<br>○Kyumoto Y[1], Uehara N[1], Kukita A[2], Kukita T[1] ([1]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Microbiol, Fac Med, Saga Univ) |
| **P1-66** | Analysis for effect of IL-18 on mechanical stress-induced osteoclastogenesis and bone resorption<br>○Ochi Y, Kitaura H, Kimura K, Ishida M, Kishikawa A, Yamamoto T (Dept Ortho, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-67** | Ultrastructural assessment for biological function of vascular endothelial cells at chondro-osseous junction<br>○Tsuchiya E[1,2], Hongo H[1], Yamamoto T[1], Hasegawa T[1], Amizuka N[1] ([1]Dept Dev Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Oral Diagnosis Med, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| **P1-68** | Chronological observation of the autogenous cortical bone graft<br>○Nakahara K[1], Igarashi K[2], Tsujimura M[3] ([1]Adv Res Center, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Life Sci Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [3]Dept Histol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata) |
| **P1-69** | Distribution patterns of tight junction associated proteins, occludin and claudins in the oral mucosal epithelium of mice<br>○Shiotsu N[1,2], Ikegame M[2], Torii Y[1], Yamamoto T[2] ([1]Okayama Univ Hosp, Comprehensive Dent Clinic, [2]Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Dept Oral Morphol) |
| **P1-70** | Selective immune regulation by novel targets against oral candidiasis<br>○Tasaki S[1,2], Cho T[1], Nagao J[1], Narita Y[1], Hashimoto M[1], Kozima H[2], Tanaka Y[1] ([1]Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll, [2]Sec Dent for the Disability, Dept Oral Growth and Development, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-71** | Masticatory mucosa-associated B7-H1 protects excess immune-related tissue damage<br>○Kang SW, Ohno T, Nagai S, Azuma M (Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P1-72** | The identification and characterization of a novel immune signaling molecule involved in allergic response<br>○Hashimoto M[1], Nagao J[1], Tasaki S[1], Narita Y[1], Cho T[1], Yuasa K[2], Tanaka Y[1] ([1]Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll, [2]Sec Image Diagno, Dept Diagno Gene Care, Fukuoka Dent Coll) |
| **P1-73** | The effect of cyclic dipeptide on the oral biofilm formation at early stage<br>○Mashima I[1,2], Miyakawa H[2], Nakazawa F[2] ([1]Research Fellow JSPS, [2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P1-74** | Molecular evolutionary analysis on inactive sialidase of *Streptococcus agalactiae*<br>○Yamaguchi M[1], Nakata M[1], Hirose Y[1,2], Goto K[1], Sumitomo T[1], Kawabata S[1] ([1]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Urol, Nagoya Univ Grad Sch Med) |
| **P1-75** | The study of antimicrobial effect against *S. aureus* by glycyrrhetinic acid derivatives from licorice<br>○Oyama K[1,2], Matsuo M[2], Komatsuzawa H[2] ([1]Dept Oral Surg, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent) |
| **P1-76** | Characterization of 60-kDa fimbria from *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407<br>○Koyata Y, Sasaki H, Watanabe K, Hamada N (Dept Microbiol, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ) |
| **P1-77** | Group A streptococcal cysteine protease cleaves desmosomal proteins and contributes to development of skin lesion<br>○Mori Y[1,2], Sumitomo T[1], Yamaguchi M[1], Nakata M[1], Terao Y[3], Kawabata S[1] ([1]Dept Oral and Mol Microbiol, Grad Sch Dent, Osaka Univ, [2]Div Spec Care Dent, Dent Hosp, Osaka Univ, [3]Niigata Univ, Grad Sch Med Dent Sci, Div Microbiol Infect Dis) |
| **P1-78** | Proteolytic activation of influenza A virus by *Porphyromonas gingivalis* gingipain<br>○Kamio N[1], Imai K[1], Nakayama K[2], Ochiai K[1] ([1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P1-79** | Possibility of influence and the transition inductivity of hemin on the growth and bioactivity of *P. gingivalis* in clinical manifestations<br>○Ohya M[1,2], Tamura M[2,3], Cueno M[2], Ochiai K[2,3] ([1]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent, [2]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, [3]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-80** | OmpA-like protein derived from *Tannerella forsythia* mediates adherence to host cells<br>○Horie T[1,2], Inomata M[1], Izumigawa M[1], Hasegawa Y[3], Inaba H[1], Into T[1], Kitai N[2], Murakami Y[1] ([1]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Orthod, Asahi Univ Sch Dent, [3]Dept Oral Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P1-81** | Characterization of dipeptidyl-peptidase 4 from *Tannerella forsythia*<br>○Nakasato M[1], Shimoyama Y[2], Ohara-Nemoto Y[3], Nemoto T[3], Takahashi S[1], Ishikawa T[2], Sasaki M[2], Yaegashi T[1], Kimura S[2] ([1]Div Periodont, Iwate Med Univ Sch Dent, [2]Div Mol Microbiol, Iwate Med Univ, [3]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P1-82** | IL-1alpha inducing activity of *Streptococcus sanguinis*<br>○Saeki A[1], Hasebe A[1], Nakazawa F[2], Shibata K[1] ([1]Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [2]Dept Oral Microbiol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P1-83** | Streptococcal hydrogen peroxide controls the inflammatory response and macrophage activation<br>○Matsushima H[1,2], Kataoka H[2], Okahashi N[3], Inoue M[1], Kuwata H[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Showa Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Micro, Showa Univ Grad Sch Dent, [3]Center Oral Frontier Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-84** | The relationship between vacuolation induced by CAMP factor of *Streptococcus pyogenes* and uptake of calcium ion in RAW264.7 cells<br>○Kurosawa M[1,2], Oda M[1], Domon H[1], Saitoh I[2], Hayasaki H[2], Terao Y[1] ([1]Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Pediatric Dent, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P1-85** | Investigation of colony spreading related factors in *Flavobacterium johnsoniae*<br>○Imamura K[1], Kondo Y[1], Sato K[2], Narita Y[3], Fujiwara T[1], Nakayama K[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [3]Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll) |

| | |
|---|---|
| **P1-86** | Construction and characterization of a BCG thyX deletion strain<br>○Arimura Y[1], Nakayama M[2], Senoo M[1], Tagawa J[3], Nakayama K[4], Iida S[1], Ohara N[2,5] ([1]Dept Oral Maxillofacial Reconstruct Surg, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [3]Orthodont, Okayama Univ Hosp, [4]Div Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [5]ARCOCS Okayama Univ Dent Sch) |
| **P1-87** | The influence of cyclic-di-GMP produced in BCG<br>○Senoo M[1], Nakayama M[2], Arimura Y[1], Iida S[1,3], Ohara N[2,3] ([1]Dept Oral Maxillofacial Reconst Surg, Okayama Univ Grad Med Dent Pharm Sci, [2]Dept Oral Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pham Sci, [3]ARCOCS Okayama Univ Dent Sch) |
| **P1-88** | Induction of odontoblast like cells by using honeycomb $\beta$-TCP<br>○Yoshida S[1], Tsujigiwa H[2], Takabatake K[1], Kawai H[1], Nakano K[1], Tamamura R[3], Kawakami T[4], Nagatsuka H[1] ([1]Dept Oral Pathol and Med, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Lab Histopathol, Dept Life Sci, Fac Sci, Okayama Univ Sci, [3]Dept Histol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, [4]Hard Tissue Pathol Unit, Matsumoto Dent Univ, Inst for Oral Sci) |
| **P1-89** | DNA methylation of extracellular matrix-related genes stimulated with LPS for prolonged periods<br>○Takai R[1], Uehara O[2], Harada F[1], Utsunomiya M[1], Chujo T[1], Yoshida K[1], Sato J[1], Nishimura M[1], Chiba I[2], Abiko Y[1] ([1]Div Oral Med Pathol Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, [2]Div Dis Cont Mol Epidemiol Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent) |
| **P1-90** | Study of relation chimeric gene expression to tumor proliferative potential in salivary adenoid cystic carcinoma<br>○Ono J[1], Okada Y[1,2] ([1]Histopathol Pathogenic Mech, Nippon Dent Univ Grad Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Pathol, Nippon Dent Univ, Sch Life Dent at Niigata) |
| **P1-91** | Morphological and molecular biological abnormality of cranial base synchondrosis and temporomandibular joint condyle in cartilage calcification insufficient rat<br>○Kuzushima K[1], Takeuchi A[1], Nagayama M[2], Tanaka M[3], Watanabe M[4], Amano H[5], Tanuma J[2], Kitai N[1] ([1]Dept Ortho, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Pathol, Asahi Univ Sch Dent, [3]Dept Food Nutrition, Jr Coll Div, The Univ Aizu, [4]Inst Animal Experimentation, St Marianna Univ Grad Sch Med, [5]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ) |
| **P1-92** | Human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oral lichen planus (OLP) and cell proliferation ability of the epithelium of HPV-16 infected OLP<br>○Kato S[1,2], Isomura M[1], Sato N[1], Kawai R[1], Honda Y[1], Jinno M[1], Yoshida W[1,2], Sugita Y[1,2], Kubo K[1,2], Maeda H[1,2] ([1]Dept Oral Pathol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent, [2]Res Inst Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P1-93** | Invasive/metastatic properties and tumor-stromal microenvironments of human oral squamous cell carcinoma cells in a xenograft mouse model<br>○Shirako Y[1], Sato K[1], Taya Y[1], Aoba T[1], Shimazu Y[2], Soeno Y[1] ([1]Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [2]Dept Life Food Sci, Azabu Univ Sch Life Environmental Sci) |
| **P1-94** | Expression and functional analyses of DKK3 in oral head and neck squamous cell carcinoma (OSCC)<br>○Katase N (Dept Mol Dev Biol Kawasaki Med Sch) |
| **P1-95** | Relationship between galectin-1 expression and tumor immunity at gingival squamous cell carcinoma<br>○Noda Y, Satou S, Hirose K, Toyosawa S (Dept Oral Pathol, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P1-96** | Role of Notch in cell-differentiation of pleomorphic adenomas<br>○Takamine K[1], Nakano K[2], Ochiai T[1], Sugita Y[3], Kubo K[3], Maeda H[3], Hasegawa H[1], Kawakami T[1] ([1]Hard Tissue Pathol Unit, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Oral Med, [2]Dept Oral Pathol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [3]Dept Oral Pathol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P1-97** | Odontogenic infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates pathological progression of NASH through activation of hepatic stellate cells by macrophages<br>○Nagasaki A, Furusho H, Miyauchi M, Takata T (Dept Oral Maxillaci Pathobiol, Hiroshima Univ Grad Sch Biomed Health Sci) |
| **P1-98** | Mechanisms of tumor suppression by chemokine CXCL14: Synergistic effects of chemokine CXCL14 and NKT cells on the suppression of metastasis on the lung<br>○Yang X[1], Miyamoto C[1,2], Izukuri K[1,2], Kato Y[3], Hata R[1,2] ([1]Oral Health Sci Res Center, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Biol Kanagawa Dent Univ, [3]Dept Oral Fxn Mol Biol, Ohu Univ Sch Dent) |
| **P1-99** | Production and purification of human recombinant amelogenin in mammalian cells<br>○Takahashi A[1], Morita T[2], Kurasige Y[1], Murata K[1], Saitoh M[1], Tanimura A[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido, [2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P1-100** | Shh/Ptch and EGF/ErbB are cooperatively regurated branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands<br>○Mizukoshi K, Koyama N, Hayashi T, Kashimata M (Dept Dent Pharmacol, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P1-101** | Role of a5 integrin subunit in branching morphogenesis fetal mouse submandibular glands<br>○Akai T[1], Mizukoshi K[2], Koyama N[2], Hayashi T[2], Sumitomo S[1], Kashimata M[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Dent Pharmachol, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P1-102** | Diazepam enhances expression of PAC1-R, StAR and CYP11A1 in rat salivary glands<br>○Tsukagoshi E[1], Kawaguchi M[2], Yoshikawa M[1,3], Shinomiya T[1], Okubo M[1], Kasahara M[1] ([1]Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll, [2]Tokyo Dent Coll, [3]Dept Clin Pharmacol, Tokai Univ Sch Med) |
| **P1-103** | Effects of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist on bone metabolism<br>○Moribayashi A[1], Kayashima H[1], Saeki M[3], Yatani H[1], Egusa H[1,2] ([1]Dept Fixed Prosthodont, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Div Mol Regen Prosthodont, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P1-104** | Involvement of $\alpha_{1B}$-adrenergic receptor signaling in bone formation<br>○Tanaka K, Hirai T, Togari A (Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P1-105** | Mechanism of action of a novel bisphosphonate that increases bone mass in OVX rats<br>○Takizawa A[1,2], Chiba M[2,4], Ota T[2], Yasuda M[1,2], Suzuki K[3], Shinoda H[4], Igarashi K[1] ([1]Div Oral Dysfunction Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, [4]Ctr for Environ Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |

| | |
|---|---|
| **P1-106** | In vivo imaging analyses for the diurnal variation of microglial process accumulation following microinjection of ATP and *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)<br>○Takayama F[1,2], Hayashi Y[1], Wu Z[1], Nakanishi H[1] ([1]Dept Aging Sci and Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]JSPS Research Fellowship for Young Scientist (DC2)) |
| **P1-107** | Repeated forced water administration stress on female mice behavior disorders associated with GABAergic dysfunction<br>○Tsukahara T, Masuhara M, Sato T (Dept Appl Pharm, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P1-108** | Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumour suppression<br>○Ikoma T[1,2], Ozawa S[1,2], Suzuki K[1], Iwabuchi H[1], Yang X[2,3], Miyamoto C[2,3], Maehata Y[2,3], Hata R[2,3] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surgery, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ, [2]Oral Health Sci Res Center, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ, [3]Dept Oral Sci, Grad Sch Dent Kanagawa Dent Univ) |
| **P1-109** | Mechanism of the spontaneous calcium responses in the vitamin D-induced differentiation of dental epithelial cells<br>○Murata K[1], Kurashige Y[1], Morita T[2], Takahashi A[1], Saitoh M[1], Tanimura A[2] ([1]Dept Pediatric Dent, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido, [2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P1-110** | Growth inhibition of *Candida albicans* by combination bubble liposomes and amphotericin B together with ultrasonication<br>○Yamamoto M[1], Okinaga T[1], Iwanaga K[2], Ariyoshi W[1], Nishihara T[1] ([1]Div Infect Mol Biol, Kyushu Dent Univ, [2]Div Oral Maxillofacial Surg, Kyushu Dent Univ) |
| **P1-111** | Opioidergic effects on synaptic transmission in rat insular cortex<br>○Yokota E[1], Koshikawa N[2], Kobayashi M[2] ([1]Dept Anesthesiol, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P1-112** | A possible role of leptomeninges for transduction of systemic inflammatory signals to microglia in response to lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*<br>○Liu Y, Wu Z, Nakanishi H (Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P1-113** | Critical roles of cathepsin B in AD-like phenotypes following chronic systemic treatment with lipopolyssacharide from *Porphyromonas gingivalis*<br>○Ni J, Wu Z, Nakanishi H (Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P1-114** | Gene expression analyses in microglia related in antidepressant-like effect of sodium butyrate<br>○Yamawaki Y, Kanematsu T (Dept Cell Mol Pharmacol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| **P2-1** | Correlation between timing of cytogenesis and cellular distribution in the nucleus of the solitary tract and parabrachial nucleus in rat<br>○Suwabe T, Yasuo T, Sako N (Dept Oral Physiol, Sch Dent, Asahi Univ) |
| **P2-2** | Microvascular architecture of the lion filiform papillae<br>○Takemura A, Toda I, Uemura M, Kawashima W (Dept Anat, Osaka Dent Univ) |
| **P2-3** | Histochemical study on aging of the lips<br>○Nara M, Kitamura K, Yamauchi M, Yamamoto M, Abe S (Dept Anat, Tokyo Dent Coll Grad Sch Dent) |
| **P2-4** | Ultrastructure of the parotid and submandibular glands in the short tailed opossum (Monodelphis domestica)<br>○Kono T[1], Suzuki K[2], Tamamura R[1], Kanno T[1], Sakae T[1], Okada H[1] ([1]Dept Hist Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, [2]Dept Biol Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-5** | Expression of MEPE in mouse cartilage<br>○Fujikawa K, Morita T, Tamaki T, Shibata S (Dept Maxillofacial Anat, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-6** | Hyaluronan precipitates odontoblastic differentiation via CD44 in dental pulp stem cells<br>○Umemura N, Sakagami H (Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-7** | Microtubule-associated protein tau (Mapt) is a useful marker protein for terminally differentiated odontoblasts in mice<br>○Miyazaki T[1], Baba T[2], Komori T[1] ([1]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-8** | Histological studies on the tooth development of green spotted pufferfish (*Tetradon nigroviridis*)<br>○Yamamoto H, Fujiseki M, Yamazaki T (Dept Histol Dev Biol, Tokyo Dent Coll) |
| **P2-9** | Immunohisitochemical analysis of prostaglandin transporter in pulpotomized rat molars<br>○Ohkura N[1], Edanami N[1], Yoshiba N[1], Yoshiba K[1], Ida-Yonemochi H[2], Ohshima H[2], Okiji T[3] ([1]Div Cariol, Operative Dent Endod, Dept Oral Health Sci, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Anat Cell Biol Hard Tissue, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [3]Dept Pulp Biol Endodont, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-10** | Study of the preventive effect of initial enamel caries by carbon dioxide laser irradiation<br>○Kanri Y, Okada Y (Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata) |
| **P2-11** | Inorganic polyphosphate-induces MMP-3-mediated proliferation in rat dental pulp fibroblast-like cells is mediated by a Wnt5-Lrp5 signaling cascade<br>○Ozeki N[1], Yamaguchi H[1], Hiyama T[1], Kawai R[1], Mogi M[2], Nakata K[1] ([1]Dept Endo, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Med Biochem, Sch Pharm, Aichi Gakuin Univ) |
| **P2-12** | Development of an applicable clinical kit which are useful for an indicator of the healthy periodontal tissue<br>○Uchibori S[1], Kobayashi T[1], Tsuzukibashi O[2], Aida M[1] ([1]Dept Crown Bridge Prosthodont, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, [2]Dept Microbiol and Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-13** | Localization of AM1-43 in the tooth nerve fibers using fluorescence and electron microscopy<br>○Nishikawa S (Dept Biol, Tsurumi Univ Sch Dent Med) |

| | |
|---|---|
| **P2-14** | Whole genome analysis of human periodontal ligament stem cells stimulated by a synthetic peptide<br>○Tominaga K[1], Kato H[2], Okamura T[1], Wato M[1], Nishikawa T[1], Tanaka A[1] ([1]Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ, [2]Dept Periodontol, Osaka Dent Univ) |
| **P2-15** | Microvasculature and peri-implant tissue changes after photo functionalization<br>○Matsuo M, Okudera T, Maeda S (Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent) |
| **P2-16** | Regenerating processes of alveolar bone after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF)<br>○Okudera T[1], Miyoshi Y[2], Maeda S[1], Matsuo M[1] ([1]Div Dent Anat, Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ Grad Sch Dent) |
| **P2-17** | (withdrawn) |
| **P2-18** | Intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide increases plasma TNF-$\alpha$ levels in anaesthetised rats<br>○Aono Y, Saigusa T (Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-19** | Stress-responsive protein is involved in the increase regulatory mechanism of the periodontal ligament fiberblasts<br>○Sadaoka S[1], Yagami K[1,2], Kawahara I[1,2] ([1]Dept Oral Health Sci, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Health Promotion Stomatol, Matsumoto Dent Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Oral Implant, Matsumoto Dent Univ Hosp) |
| **P2-20** | The effects of PKR and NLRP3 on the bone-regulated gene expression in *P. gingivalis*-treated osteoblasts<br>○Yoshida K[1], Okamura H[2], Ozaki K[3] ([1]Dept Oral Healthcare Education, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci, [2]Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci, [3]Dept Oral Healthcare Promotion, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci) |
| **P2-21** | Macroscopic analysis of vessels and nerve supply in the elderly human palatine<br>○Sato I, Miwa Y, Sunohara M (Dept Anat Sch Dent The Nippon Dent Univ at Tokyo) |
| **P2-22** | Protective effects of $BH_4$ on local ischemia/reperfusion-induced suppression of reactivehyperemia in rat gingiva<br>○Toyama T[1], Todoki K[2], Takahashi S[3], W-Takahashi S[3], Yoshino F[3], Yoshida A[3], Watanabe K[1], Hamada N[1] ([1]Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ, [2]Dept Health Sci, Kanagawa Dent Univ, [3]Dept Oral Sci, Kanagawa Dent Univ) |
| **P2-23** | Relationship between parotid salivary secretion and hemodynamic change of superficial temporal artery after citric acid stimulation<br>○Kuroki A[1,2], Ono K[1], Hitomi S[1], Yamashina R[3], Obata A[4], Yoshino K[2], Inenaga K[1] ([1]Div Physiol, Kyushu Dent Univ, [2]Dept Oral Health Management, Kyushu Dent Univ, [3]Hitachi High-Tech, Corp, [4]Hitachi, Ltd) |
| **P2-24** | Study of function in SNAP23 knockout HAP1 cells<br>○Arakawa T[1], Okayama M[2], Mizoguchi I[2], Takuma T[1] ([1]Div Biochem, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido, [2]Div Orthod, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P2-25** | Transient up-regulation of Bpifb1 expression in parotid acinar cells of infant mice<br>○Nashida T[1], Yoshie S[2], Yoshimura K[3], Shimomura-Kuroki J[4], Tsujimura M[2], Sato R[5] ([1]Dept Biochem, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Histol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [3]Dept Anat, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [4]Dept Pediatric Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [5]Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata) |
| **P2-26** | Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcitosine in fetal mouse submandibular gland development<br>○Hayashi T, Koyama N, Mizukoshi K, Kashimata M (Dept Pharmacol, Asahi Univ) |
| **P2-27** | Expression of precursor cell marker during injury and recovery in salivary gland<br>○Yokoyama M, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J (Dept Physiol Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-28** | Metbolomic analysis of age-related changes of salivary amino acids<br>○Tanaka S[1], Akita S[1], Taniguchi K[1], Katayama T[1], Sakagami H[2] ([1]Dept General Cli Dent, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-29** | Inhibition of the peptidoglycan-mediated Toll-like receptor 2 signaling by salivary histatin<br>○Imamura Y[1], Wang PL[2], Sogawa N[1] ([1]Dept Pharmacol, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Dent Educ Innov, Osaka Dent Univ) |
| **P2-30** | HAP-100, a fragment of protamine, is available for recovery of drug-induced xerostomia<br>○Okubo M[1], Kawaguchi M[2], Shinomiya T[1], Tsukagoshi E[1] ([1]Dept Pharmacol, Tokyo Dent Coll, [2]Tokyo Dent Coll) |
| **P2-31** | Molecular mechanism of actin-coat formation on the membrane-fused secretory granules —Realtime imaging analysis with intravital microscope—<br>○Shitara A (IMTS, OPCB, NIDCR, NIH) |
| **P2-32** | Involvement of MARCKS phosphorylation and translocation in isoproterenol-induced amylase release in parotid acinar cells<br>○Satoh K[1], Narita T[2], Kato O[3], Sugiya H[2] ([1]Dept Regul Physiol, Dokkyo Med Univ Sch Med, [2]Lab Vet Biochem, Nihon Univ Coll Bioresource Sci, [3]Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent Matsudo) |
| **P2-33** | The membrane microdomains is related to the concentration of secretory proteins into the rat parotid granules<br>○Katsumata-Kato O, Yokoyama M, Fujita-Yoshigaki J (Dept Physiol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-34** | Mechanisms of acetylcholine-induced tissue-wide synchronization of $Ca^{2+}$ oscillations in rat submandibular gland<br>○Nezu A, Morita T, Tanimiura A (Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P2-35** | Effects of liquid diet on growth of rat submandibular and sublingual glands<br>○Takahashi S[1], Uekita H[2], Inoue K[1], Domon T[1] ([1]Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [2]Dept Crown Bridge Prosthodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med) |

| | |
|---|---|
| **P2-36** | Intake of indigestible carbohydrates for the different periods influence immunoglobulin A concentrations of the rat saliva<br>○Yamamoto Y[1], Tou M[2], Shimizu T[2], Saruta J[2], Tsukinoki K[2] ([1]Dept Junior Coll, Kanagawa Dent Univ, Sch Dent Hygiene, [2]Dept Oral Sci, Div Environmental Pathol, Kanagawa Dent Univ, Grad Sch Dent) |
| **P2-37** | Release of Ro/SS-A and La/SS-B into the extracellular space as an exosomal protein<br>○Sohda M, Oda K (Div Oral Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-38** | Muscarinic agonist-induced trafficking of AQP5 to nuclei and its role in rat parotid glands<br>○Bragiel A, Pieczonka T, Ishikawa Y (Dept Pharm, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci) |
| **P2-39** | Proliferative and multidifferentiation potential of human periodontal ligament stem cells under serum-free culture condition<br>○Murabayashi D, Nakahara T (Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-40** | Immunoexpression of glucose related protein-78 in the mouse molar and incisor teeth during tooth development<br>○Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Mikami Y, Jinno A, Abe M, Kiyoshima T (Dept Oral Pathol, Fac Dent, Kyushu Univ) |
| **P2-41** | Expression pattern of keratin and vimentin in rat odontogenic epithelium<br>○Ito H, Sakurai Y, Yusa J (Div Oral Pathol, Ohu Univ Sch Dent) |
| **P2-42** | Expression of osteogenic factors in the cleft palate of the A/J mouse embryo<br>○Maekawa M[1], Mori A[1,2], Komada M[1], Ikeda Y[1] ([1]Dept Anat, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, [2]Div Res Treat Oral Maxillac Congen Anom, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P2-43** | Stem cell population in the bone induction of muscles BMP gene transfer red using in vivo electroporation<br>○Kawai M[1], Kataoka Y[1], Ikegame M[1], Ohura K[2], Yamamoto T[1] ([1]Dept Oral Morpho Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm, [2]Osaka Dent Univ) |
| **P2-44** | VEGF-C enhances proliferation and migration ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells<br>○Igarashi Y[1], Chousa N[2], Kyakumoto S[2], Kamo M[2], Kondo H[1], Isisaki A[2] ([1]Dept Prosthodont Oral Implantol, Sch Dent, Iwate Med Univ, [2]Div Cell Biosignal Sci Dept Biochem Iwate Med Univ) |
| **P2-45** | A study of cartilage formation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*<br>○Nakatsuka M[1], Matsuda Y[1], Hosoya A[2], Kumabe S[1] ([1]Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ, [2]Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ) |
| **P2-46** | A inductive role of anterior axial mesendoderm in the determination of migratory pathway of GnRH-neuron in rat embryos<br>○Imai H, Baba O (Dept Biosci, Ohu Univ Sch Dent) |
| **P2-47** | Long-term observation of capillary formation in three-dimensional tissue culture using three kinds of porous materials as scaffold in vitro<br>○Okamura T[1,2], Nishikawa T[1], Wato M[1], Tominaga K[1], Imai K[1] ([1]Dept Oral Pathol, Osaka Dent Univ, [2]Dept Biomater, Osaka Dent Univ) |
| **P2-48** | Study on the change in the expression level of phospho-Erk1/2 and the palatal cleft phenotype of TGF beta3 knockout mice by Gefitinib administration<br>○Sugiyama A[1], Into T[2], Takigawa T[1] ([1]Dept Oral Anat, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P2-49** | Gene ontology analysis of genes associated with cleft palate<br>○Funato N (Tokyo Med Dent Univ, Hum Gene Sci Center) |
| **P2-50** | Effects of MPAIDs, NF-$\kappa$B inhibitor on osteoblasts<br>○Hirata-Tsuchiya S[1], Okamoto K[2], Jimi E[3], Morotomi T[1], Kitamura C[1] ([1]Div Endodontics Restorative Dent, Kyushu Dent Univ, [2]Clinical Proteomics Mol Med, St Marianna Univ Grad Sch Med, [3]Div Mol Signaling Biochem, Dept Biosci, Kyushu Dent Univ) |
| **P2-51** | The effect of acetaminophen on the behavior of mouse calvaria-derived cell line MC3T3-E1<br>○Nakatsu Y[1], Higashi S[2], Osumi T[2], Watanabe S[1], Takeuchi H[2] ([1]Div Dent Anesthesiol, Kyushu Dent Univ, [2]Div Appl Pharmacol, Kyushu Dent Univ) |
| **P2-52** | The effect of mouse LRAP synthesized by solid phase chemistry (F-moc) on osteo-/chondrogenesis<br>○Matsuda Y[1], Hatakeyama Y[2], Nakasima K[1], Kamogashira N[1], Hatakeyama J[3], Sawa Y[2], Ishikawa H[1] ([1]Orthodontics, Fukuoka Dent Coll, [2]Functional Structure, Fukuoka Dent Coll, [3]Operative Dent, Fukuoka Dent Coll) |
| **P2-53** | Bidirectional communication between sensory neuronal cells and osteoblasts in an in vitro co-culture system<br>○Kodama D, Togari A (Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P2-54** | Coordinated effect of IL-17A and IL-27 on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells<br>○Inoue H, Uchihashi K, Nishikawa N (Dept Physiol, Osaka Dent Univ) |
| **P2-55** | Analysis of expression and function of Zbtb7a (OCZF) protein in osteoclastogenesis<br>○Kukita A[1], Xu X[1,2], Kukita T[2] ([1]Dept Microbiol, Fac Med, Saga Univ, [2]Dept Mol Cell Biol Oral Anat, Kyushu Univ) |
| **P2-56** | Transcriptional factor NFIL3/E4BP4 in osteoblasts<br>○Hirai T, Tanaka K, Togari A (Dept Pharmacol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P2-57** | The role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast<br>○Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T (Div Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-58** | Different effects of two types of bisphosphonates on alkaline phosphatase activity and matrix contents in osteoblastic cells<br>○Baba T[1], Miyazaki T[2], Ohara-Nemoto Y[1], Nemoto T[1] ([1]Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |

| | |
|---|---|
| **P2-59** | The effect of progesterone for estrogen-induced medullary bone resorption in male quail<br>○Yamamoto T[1], Shiotsu N[1,2], Kataoka Y[1,3], Kawai M[1,4], Ikegame M[1], Uchibe K[1] ([1]Dept Oral Morphol, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm Sci, [2]Comprehensive Dent Clinic, Okayama Univ Hosp, [3]Dept Oral Maxillofa Reconst Sur, Okayama Univ Grad Sch Med, Dent Pharm Sci, [4]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ) |
| **P2-60** | The relevance of FGF21/βKlotho, glucose and lipid metabolic mediators, in the balance between osteogenesis and adipogenesis<br>○Minamizaki T, Yoshioka H, Takei Y, Yoshiko Y (Dept Calcif Tissue Biol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| **P2-61** | Geranylgeraniol induces osteoblast differentiation<br>○Urata M[1,2], Kokabu S[1], Nakatomi C[1], Matsubara T[1], Hirata-Tsuchiya S[2], Morotomi T[2], Kitamura C[2], Jimi E[1] ([1]Dept Mol Signaling Biochem, Dept Health promotion Kyushu Dent Univ, [2]Div Endodont and Restorative Dent, Kyushu Dent Univ) |
| **P2-62** | In vivo imaging of osteoclast precursor recruitment to the inflammatory site where extensive bone destruction occurs<br>○Suzuki K[1,2], Nagaoka M[1], Suzuki R[1], Shinoda H[3] ([1]Div Dent Pharmacol, Ohu Univ Sch Dent, [2]Dept Pharmacol, Sch Dent, Showa Univ, [3]Cent Environ Dent, Grad Sch Dent, Tohoku Univ) |
| **P2-63** | Effect of adiponectin on osteoclast formation<br>○Amano H, Ooura K (Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ) |
| **P2-64** | Osteoclasts with large nuclear number can not only resorb bone matrix but also engulf osteocytes<br>○Suzuki R[1], Imai H[2], Nagaoka M[1], Suzuki K[1] ([1]Dept Dent Pharmacol, Sch Dent, Ohu Univ, [2]Dept Biol, Sch Dent, Ohu Univ) |
| **P2-65** | Vascular invasion of cartilaginous matrix within Meckel's cartilage resorption<br>○Inoue K[1], Ushijima N[2], Yagihara S[1], Morita W[1], Takahashi S[1], Domon T[1] ([1]Dept Oral Functional Anat, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Lab EM, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| **P2-66** | Histochemical studies with finite element analysis about the type and intensity of the mechanical stress for osteocyte reaction<br>○Watanabe R, Yano W, Satoh K, Kogaya Y, Ejiri S (Dept Oral Anat, Div Oral Structure, Function and Development, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P2-67** | Healing of bone tissue surrounding titanium implants in a rat model<br>○Tsujimura M[1], Nakahara K[2], Maeda T[3], Yoshie S[1] ([1]Dept Histol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Adv Res Center, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [3]Div Oral Anat, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-68** | Estrogen does not induce apoptosis, but regulates function of avian medullary bone osteoclasts<br>○Hiyama S, Watanabe M, Uchida T (Dept Oral Biol, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| **P2-69** | Ultrastructural study of periosteal cell spheroids to the human alveolar bone with exposure to low-intensity pulsed ultrasound<br>○Miyagi N[1], Higasi K[1], Maeda S[2], Kawata A[1], Takahasi O[1] ([1]Dept Neuroanatomy, Histol Embryol, Kanagawa Dent Univ Grad Sch, [2]Div Curriculum Development, Kanagawa Dent Univ) |
| **P2-70** | Role of Irx3 in chondrogenesis and chondrocyte differentiation<br>○Tamamura Y[1], Mera H[1], Itokazu M[1,2], Wakitani S[1,3] ([1]Dept Health Sports Sci, Mukogawa Women's Univ, [2]Dept Orthopedic Surgery, Osaka City Univ Grad Sch Med, [3]Dept Artificial Joint Biomater, Hiroshima Univ Inst Biomed Health Sci) |
| **P2-71** | Roles of N-terminal region of Fibronectin in maintaining of osteoclast precursors<br>○Amano S, Ohmori Y (Dept Oral Biol Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-72** | Expression of calcium binding proteins calbindin and calretinin in the taste organ of frog<br>○Ando H[1], Imamura Y[2], Tadokoro O[3], Sogawa N[2], Kondo E[3], Kitagawa J[1] ([1]Dept Oral Physiol, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Pharmacol, Matsumoto Dent Univ, [3]Dept Oral Anat, Matsumoto Dent Univ) |
| **P2-73** | Taste responses of bitter sensitive taste cells in mice<br>○Yoshida R, Ninomiya Y (Sec Oral Neurosci, Grad Sch Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P2-74** | Analysis of single fiber responses to fatty acids in mouse chorda tympani nerve<br>○Yasumatsu K[1,2], Ninomiya Y[1,2] ([1]Div Sensory Physiol, R&D Center for Taste and Odor Sensing, Kyushu Univ, [2]Sect Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ) |
| **P2-75** | The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system<br>○Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Nakatomi M, Kibe K (Div Anat, Kyushu Dent Univ) |
| **P2-76** | Expression of renin-angiotensin system (RAS) components in taste organ<br>○Shigemura N[1], Ninomiya Y[1,2] ([1]Sec Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Res Dev Center Taste Odor Sensing, Kyushu Univ) |
| **P2-77** | Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase (NOS) isoforms after peripheral nerve transection in mice<br>○Kikuchi R[1], Ambe K[2], Nakagawa T[2], Watanabe H[2] ([1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Ohu Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Histol, Ohu Univ Sch Dent) |
| **P2-78** | Response properties of thalamic neurons during mechanical stimulation of the temporomandibular joint in the rabbit<br>○Suzuki T[1], Wakamori M[2], Tsuboi A[1,3] ([1]Div Aging Geriat Dent, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Mol Pharmacol Cell Biophys, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Tohoku Med MegaBank Org, Tohoku Univ) |
| **P2-79** | Involvement of $Na^+$-microdomain in spines in the inhibition of AMPA-receptor current by h-current in mesencephalic trigeminal neurons<br>○Saito M, Sato H, Toyoda H, Kawano T, Yin D, Kang Y (Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P2-80** | Neurons in the rostral nucleus tractus solitarius receive cardiovascular and respiratory afferent inputs<br>○Ishizuka K, Satoh Y (Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata) |
| **P2-81** | Possible involvement of dopaminergic brainstem neurons in cisplatin-induced delayed nausea and/or emesis<br>○Hirai Y, Hisadome K, Maezawa H, Funahashi M (Dept Oral Physiol, Grad Sch Dent Med, Hokkaido Univ) |

| | |
|---|---|
| **P2-82** | Evaluation of dimethyl sulfide odor masking by food derived volatiles to the biosensor mice<br>○Osada K（Div Physiol Dept Oral Biol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent） |
| **P2-83** | Variability of temporal signaling patterns of cortical somatosensory neurons during sequential tongue movements<br>○Toda T, Kudo T（Div Oral Physiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent） |
| **P2-84** | Functional connectivity of human primary olfactory cortex: 7 tesla fMRI study<br>○Fukami H, Sahara Y（Dept Physiol, Iwate Med Univ Sch Dent） |
| **P2-85** | Identification of neurons responding to dental pulp stimulation by use of a two-photon microscopy<br>○Fujita S, Koshikawa N, Kobayashi M（Dept Pharm, Nihon Univ Sch Dent） |
| **P2-86** | The brain mechanisms underlying the perception of pungent taste of capsaicin and subsequent autonomic responses<br>○Sato H[1], Kawakami S[2], Toyoda H[1], Saito M[1], Kawano T[1], Yin D[1], Kang Y[1]（[1]Dept Neurosci Oral Physiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Morinaga & Co, Ltd） |
| **P2-87** | Postnatal changes of excitatory synaptic inputs in the rat masseter motoneurons<br>○Nakamura S[1], Kajiwara R[2], Mochizuki A[1], Nakayama K[1], Kiyomoto M[1], Inoue T[1]（[1]Dept Oral Physiol, Showa Univ Sch Dent, [2]Showa Univ Sch Dent） |
| **P2-88** | Role of the vestibular nuclear complex in facilitating the jaw-opening reflex following stimulation of the red nucleus in rats<br>○Satoh Y[1], Ishizuka K[1], Takahashi M[1,2], Iwasaki S[1]（[1]Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Removal Prosthodont, Nippon Dent Univ Life Sci at Niigata） |
| **P2-89** | Physiological properties of repetitive masseter activity during NREM sleep in guinea pigs<br>○Kato T[1], Sato F[1], Yoshida A[1], Higashiyama M[2]（[1]Dept Oral Anat Neurobiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Prosthodont 1, Osaka Univ Grad Sch Dent） |
| **P2-90** | Analysis of pre-weaning behaviors in prenatal bisphenol A treated rats<br>○Fujimoto T, Nishikawa Y（Dept Physiol, Osaka Dent Univ） |
| **P2-91** | Microglial BK channels gate the pathogenesis of morphine hyperalgesia<br>○Hayashi Y, Nakanishi H（Dept Aging Sci Pharmacol, Fac Dent Sci, Kyushu Univ） |
| **P2-92** | Interactions between parasympathetic vasodilation and systemic arterial blood pressure in the hemodynamics in the orofacial area<br>○Ishii H, Sato T（Div Physiol, Dept Oral Biol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido） |
| **P2-93** | TLE3 regulates myogenesis in vitro<br>○Kokabu S[1], Nakatomi C[1], Urata M[1], Matsubara T[1], Katagiri T[2], Jimi E[1]（[1]Div Mol Signaling Biochem, Kyushu Dent Univ, [2]Div Pathophysiol, RCGM, Saitama Med Univ） |
| **P2-94** | Function of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles<br>○Nariyama M[1], Shimazaki E[1], Ando H[2], Ohnuki Y[3], Okumura S[3], Asada Y[1]（[1]Dept Pediatric Dent, Tsurumi Univ Sch Dent Med, [2]Dept Biophysics, Tsurumi Univ Sch Dent Med, [3]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med） |
| **P2-95** | Protective effects of clenbuterol against dexamethasone-induced masseter muscle atrophy and myosin heavy chain transition<br>○Umeki D[1], Ohnuki Y[2], Ito A[1], Nakamura Y[1], Okumura S[2]（[1]Dept Orthodont, Tsurumi Univ Sch Dent, [2]Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent） |
| **P2-96** | Promotion of Th1 response by lymphnode-metastatic sub-clones（L cells）of mouse oral squamous cell carcinoma, Sq1979 cells<br>○Adachi M[1,2], Kamiya M[2,3], Kawaki H[2], Takayama E[2], Inagaki T[1,2], Ito H[1,2], Sumi S[1,2], Muramatu Y[1], Sumitomo S[1], Kondoh N[2]（[1]Dept Oral Maxillofacial Surg, Asahi Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Biochem, Asahi Univ Sch Dent, [3]Chem Lab, Asahi Univ Sch Business Admin） |
| **P2-97** | Effects of the extracts of *Paeonia lutea* on proliferation and metastasis of squamous cell carcinoma<br>○Mukudai Y, Motohashi H（Dept Oral Surg, Sch Dent, Showa Univ） |
| **P2-98** | Immunohistochemical analysis of cornified cell envelope related proteins in keratocystic odontogenic tumours<br>○Ochiai T[1], Nakano K[2], Hasegawa H[1]（[1]Dept Oral Pathol, Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Oral Pathol and Med, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci） |
| **P2-99** | Suppression of bone resorption enhanced in myeloma by Pim inhibition<br>○Teramachi J[1,2], Okamura H[1], Haneji T（[1]Dept Histol Oral Histol, Tokushima Univ Inst Biomed Sci, [2]Dept Hematol, Endocrinol Metabolism, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci） |
| **P2-100** | Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cell<br>○Nishioka T[1,2], Tada H[3]（[1]Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Res Unit Interface Oral Health Sci, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent） |
| **P2-101** | Kruppel-like factor 4 expression and methylation of promoter in oral carcinoma cells<br>○Yamaguchi K, Chiba T, Mihara N, Sudoh H, Imai K（Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo） |
| **P2-102** | EBV promotes production of inflammatory cytokines through TLR-NF-kB pathway<br>○Imai K, Ochiai K（Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent） |
| **P2-103** | Histopathological and immunohistochemical study of oral lichen planus and lichenoid legion<br>○Okada Y（Dept Pathol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata） |
| **P2-104** | Depressed apoptosis in cultured human gingival fibroblasts exposed to phenytoin<br>○Takeuchi R[1], Matsumoto H[2], Hiratsuka K[1]（[1]Dept Biochem Mol Biol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo, [2]Dept Pharmacol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo） |

| | |
|---|---|
| **P2-105** | Syndecan-4 is involved in inflammation in human dental pulp cells<br>○Kamada A, Tamura I, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Ikeo T (Dept Biochem, Osaka Dent Univ) |
| **P2-106** | Effects of radical scavengers on radiation injury to fetal salivary glands<br>○Nasu M[1], Horie T[1], Ide Y[2], Mitsuhashi F[1], Nakahara T[2] ([1]Res Cent for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [2]Dept Dev Reg Dent, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-107** | Activation of astrocyte in the trigeminal subnucleus caudalis evoked by inflammatory stimulation of the masticatory muscle<br>○Matsuda Y, Nakatsuka M, Kumabe S (Dept Oral Anat, Osaka Dent Univ) |
| **P2-108** | Mechanisms of dexmedetomidine hydrochloride effects to rat paw edemas induced with carrageenan and histamine<br>○Fukada T[1], Toen T[1], Hashimoto S[3], Sunada K[2] ([1]Sect Radioisotopes Res, Res Center for Odontol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [2]Dept Oral Anesth, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo, [3]Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-109** | Analysis of immune system against periodontal-pathogen *Porphyromonas gingivalis*<br>○Nagao J, Tasaki S, Hashimoto M, Narita Y, Cho T, Tanaka Y (Sec Infect Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll) |
| **P2-110** | Molecular analyses for formation of macrophage extracellular traps induced by multifunctional glycolipid<br>○Oda M, Kurosawa M, Domon H, Terao Y (Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-111** | Functional analysis of TLR7-meidated immuno-regulatory responses in epithelial cells<br>○Matsuguchi T[1], Kusuyama J[2], Kakimoto K[1], Ohnishi T[1] ([1]Dept Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Oral Pathol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-112** | Analyses of oral mucosa recruiting T cells under the inflammatory condition<br>○Hirunwidchayarat W, Ohno T, Kang SW, Nagai S, Azuma M (Dept Mol Immunol, Tokyo Med Dent Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-113** | Involvement of infiltrated T-helper cell type 1 in differentiation of CD163-positive tumor associated macrophages in oral premalignant lesion<br>○Mori K[1], Hiroi M[2], Shimada J[1], Ohmori Y[2] ([1]Div Oral Maxillofac Surg, Dept Diagnosis Therapeutics Sci, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div Microbiol Immunol, Dept Oral Biol Tissue Engineering, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-114** | Kinetics of chemokine gene expression in a mouse tongue cancer model<br>○Yamaguchi H, Ohmori Y (Div Microbiol Immuno Dept Oral Biol Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-115** | *P. gingivalis* fimbriae enhances dendritic cell-mediated cross-presentation<br>○Tada H[1], Matsushita K[2], Takada H[1] ([1]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Dis Res, NCGG) |
| **P2-116** | Activation of NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerrated atherosclerosis and periodontal disease<br>○Ochiai T, Kobayashi R, Takizawa T, Kuwahara N, Tsuzukibashi O, Saito M (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-117** | MSCs educate undifferentiated monocytes/macrophages to the CD206-positive immunosupressive (M2) macrophages in the co-culture of mouse bone marrow cells<br>○Kyakumoto S[1], Takizawa N[2], Shima A[3], Chosa N[1], Kamo M[1], Okubo N[4], Ibi M[5], Yaegashi T[2], Ishisaki A[1] ([1]Div Cell Biosignal Sci, Dept Biochem, Iwate Med Univ, [2]Div Perio, Dept Preserv, Sch Dent, Iwate Med Univ, [3]Dept Biochem, Sch Pharmaceut Sci, Iwate Med Univ, [4]Lab Pathophysiol and Therapeut, Fac Pharmaceut Sci, Hokkaido Univ, [5]Dept Mol Cell Pharma, Sch Pharma Sci, Iwate Med Univ) |
| **P2-118** | Characterization of immuno responses with nasal immunization by differential time condition<br>○Kobayashi R, Kuwahara N, Tsudukibashi O, Saito M, Ochiai T (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-119** | Involvement of antimicrobial peptide cathelicidin on reparative dentin formation<br>○Horibe K, Hosoya A, Hiraga T, Nakamura H (Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ) |
| **P2-120** | Exploration of periodontal pathogen's components inducing immune response<br>○Narita Y, Tasaki S, Hashimoto M, Nagao J, Cho T, Tanaka Y (Sec Infct Biol, Dept Funct Biosci, Fukuoka Dent Coll) |
| **P2-121** | Intranasal immunization with outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* induces a biased type 2 response<br>○Nakao R, Senpuku H (Dept Bacteriol, Natl Inst Infect Dis) |
| **P2-122** | Inhibition effect of Weissella strain W3 on biofilm formation<br>○Doi T, Mouri S, Narise A (Oral Sci Sec, Central Laboratory, LOTTE CO, LTD) |
| **P2-123** | Evaluation of penetration mechanism of monoterpene alcohol and sesquiterpene alcohol into the preformed biofilm of *Streptococcus mutans*<br>○Fujita M[1], Osada K[2], Miyakawa H[1], Kamaguchi A[1], Nakazawa F[1] ([1]Dept Oral Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, [2]Div Physiol, Dept Oral Biol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent) |
| **P2-124** | Effect of Roselle calyx extract on biofilm formation, cytokine production and gingipain activity<br>○Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Kamaguchi A, Nakazawa F (Dept Oral Microbiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent) |
| **P2-125** | Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral streptococci<br>○Okahashi N[1], Nakata M[2], Sumitomo T[2], Sakurai A[3], Kuwata H[4], Kawabata S[2] ([1]Cent Frontier Oral Sci, Osaka Univ Grad Sch Dent, [2]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Pediatric Dent, Tokyo Dent Coll, [4]Dept Oral Microbiol Immunol, Showa Univ Sch Dent) |

| | |
|---|---|
| **P2-126** | Two arginine residues of *Streptococcus gordonii* Hsa essential for the binding to sialoglycoconjugates<br>○Tashiro Y, Takahashi Y, Konishi K (Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-127** | A study on role of Mfa5 in biogenesis of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*<br>○Hasegawa Y[1], Nagano K[1], Yoshida Y[1], Murakami Y[2], Yoshimura F[1] ([1]Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Oral Microbiol, Asahi Univ Sch Dent) |
| **P2-128** | The microbiological analysis of *Streptococcus oralis* strain 308 isolated from infective endocarditis<br>○Kondo Y[1], Sato K[2], Imamura K[1], Hoshino T[1], Nakayama K[2], Fujiwara T[1] ([1]Dept Pediatr Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Div Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-129** | Virulence gene expression and growth of *Staphylococcus aureus* in calf serum<br>○Oogai Y, Komatsuzawa H (Dept Oral Microbiol, Kagoshima Univ Grad Sch Med Dent Sci) |
| **P2-130** | BIPM killing enhancing effect of a P. aeruginosa AHL analog compound<br>○Murakami K, Hirota K, Miyake Y (Dept Oral Microbiol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci) |
| **P2-131** | Characterization of putative ECF sigma factor mutants of *Porphyromonas gingivalis*<br>○Kikuchi Y[1], Shibayama K[1], Kokubu E[1,2], Ohara N[3], Nakayama K[4], Ishihara K[1,2] ([1]Dept Microbiol, Tokyo Dent Coll, [2]Oral Health Sci Center, Tokyo Dent Coll, [3]Dept Oral Microbiol, Grad Sch Med Dent Pharm Sci, Okayama Univ, [4]Div Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-132** | Involvement of periodontitis-related bacteria in canine mitral regurgitation<br>○Watanabe K, Hamada N (Dept Microbiol, Kanagawa Dent Univ) |
| **P2-133** | Exploration of novel *Candida albicans* derived antigens recognized by T-cell receptor of $CD4^+$ T cell<br>○Cho T, Tasaki S, Nagao J, Narita Y, Hashimoto M, Tanaka Y (Dept Func Biosci, Fukuoka Dent Coll) |
| **P2-134** | Survey on oral carriage of genus *Candida* in young healthy students and the antifungal susceptibility of the isolates<br>○Fukui K[1], Imai A[2,3], Kuwashima H[1], Nakamura K[1] ([1]Dept Pharmacol, The Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Biochem, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [3]Dept Dent Hygiene, The Nippon Dent Univ Coll at Niigata) |
| **P2-135** | A study on CoA-transferases involving the butyrate produce in *Porphyromonas gingivalis*<br>○Sato M[1,2], Yoshida Y[2], Nagano K[2], Hasegawa Y[2], Takebe J[1], Yoshimura F[2] ([1]Dept Removable Prosthodont, Aichi Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P2-136** | Enzymatic characterization of succinyl-CoA reductase associated with biosynthesis of butyrate in *Porphyromonas gingivalis*<br>○Yoshida Y, Sato M, Nagano K, Hasegawa Y, Yoshimura F (Dept Microbiol, Aichi Gakuin Univ Sch Dent) |
| **P2-137** | Contribution of chloride channel permeases to fluoride resistance in *Streptococcus mutans*<br>○Murata T, Hanada N (Dept Translational Res, Tsurumi Univ Sch Dent Med) |
| **P2-138** | Discovery of three genes encoding glycosyltransferases involved in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide synthesis<br>○Shoji M[1], Sato K[1], Yukitake H[1], Kamaguchi A[2], Naito M[1], Nakayama K[1] ([1]Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Oral Microbiol Sch Dent Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P2-139** | Role of *Porphyromonas gulae* 41-kDa Fimbriae<br>○Sasaki H, Watanabe K, Koyata Y, Hamada N (Dept Microbiol, Grad Sch Dent, Kanagawa Dent Univ) |
| **P2-140** | Development of an easy-to-use clinical kit for estimating *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* levels<br>○Tsuzukibashi O, Kuwahara N, Saito M, Takizawa T, Kobayashi R, Ochiai T (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-141** | Fine intra-species genomic comparison in *Prevotella intermedia* strains<br>○Naito M, Nakayama K (Dept Mol Microbiol Immunol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-142** | Evaluation of amino acid and dipeptide uptakes of *Porphyromonas gingivalis* by non-RI assay using redox indicator<br>○Kobayakawa T, Ohara-Nemoto Y, Baba T, Nemoto T (Dept Oral Mol Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-143** | Attenuation of the PI3 kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp<br>○Nakayama M[1], Naito M[2], Nakayama K[2], Ohara N[1] ([1]Dept Microbiol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]Dept Microbiol Oral Infect, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-144** | Characterization and identification of red-pigmented novel species of genus *Propionibacterium* isolated from periodontal pockets<br>○Saito M, Kuwahara N, Tsuzukibashi O, Kobayashi R, Takizawa T, Ochiai T (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ, Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-145** | Activation of NLRP3 inflammasome by *Mycoplasma salivarium*<br>○Sugiyama M, Saeki A, Hasebe A, Shibata K (Dept Oral Mol Microbiol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med) |
| **P2-146** | Analysis of pneumococcus-induced cell death<br>○Domon H[1], Sakaue Y[1], Oda M[1], Yamaguchi M[2], Kawabata S[2], Terao Y[1] ([1]Div Microbiol Infect Dis, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Dept Oral Mol Microbiol, Osaka Univ Grad Sch Dent) |
| **P2-147** | HtrA protease involved in protein quality control of the type IX secretion system (T9SS)<br>○Sato K[1], Kondo Y[2], Imamura K[2], Naito M[1], Nakayama K[1] ([1]Dept Mol Microbiol Immun, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci, [2]Dept Pediatric Dent, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |

| | |
|---|---|
| **P2-148** | Exhaustive analyse of the number of oral bacterial strains found among healthy elderly treated with catechin gel : Next generation sequencing approach<br>○Tamura M[1,2], Abe K[1], Ohya M[1,3], Seki K[1,3,4], Ochiai K[1,2] ([1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, [2]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent, [3]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent, [4]Dept Compre Dent Clin Edu, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P2-149** | Genome analyses of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype g<br>○Kuwahara N, Saito M, Tsuzukibashi O, Takizawa T, Kobayashi R, Ochiai T (Dept Microbiol Immunol, Nihon Univ Sch Dent at Matsudo) |
| **P2-150** | A2059G 23S rRNA and G439A *rplC* gene mutations in *Streptococcus criceti* strain OMZ 61<br>○Tamura H, Yamada A, Kato H (Div Bioregulatory Pharmacol, Dept Pharmacol, Iwate Med Univ) |
| **P2-151** | Comparison of oral microbiota between smokers and non-smokers in dental students<br>○Nakano Y[1], Taniguchi N[2], Yoneda M[3], Hirofuji T[3], Kuwata F[1], Hanioka T[2] ([1]Dept Chem, Nihon Univ Sch Dent, [2]Dept Preventive Public Health Dent, Fukuoka Dent Coll, [3]Dept General Dent, Fukuoka Dent Coll) |
| **P2-152** | Butyric acid induce TWEAK and TRAIL signaling in NGF treated PC12 neuronal cell<br>○Seki K[1,2], Kamio N[3,4], Cueno M[3], Tamura M[3,4], Kamimoto A[2], Ochiai K[3,4] ([1]Div Oral Health Sci, Nihon Univ Sch Dent Grad Sch Dent, [2]Dept Compre Dent Clin Educ, Nihon Univ Sch Dent, [3]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, [4]Div Immunol Pathobiol, Dent Res Cent, Nihon Univ Sch Dent) |
| **P2-153** | Circadian profiling of a dimerization of BMAL1 and CLOCK and their subcellular localization by a FRET biosensor<br>○Nishide S (Dept Cell Physiol, Hokkaido Univ Grad Sch Med) |
| **P2-154** | Long-chain free fatty acid receptor FFAR1 induces cell proliferation in human airway smooth muscle cells<br>○Mizuta K (Dept Dento-oral Anesthesiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **P2-155** | Periodontal disease level-butyric acid putatively contributes to blood ageing: A proposed link between periodontal diseases and the ageing process<br>○Cueno M[1], Tamura M[1,2], Ochiai K[1,2] ([1]Dept Microbiol, Nihon Univ Sch Dent, [2]Div Immunol Pathobiol, Res Cent Nihon Univ Sch Dent) |
| **P2-156** | MAP3K8/Cot/Tpl2 signaling molecule is degraded by LPS stimulation, and recovered by induction of mRNA expression through NF-$\kappa$B signal pathway in macrophages<br>○Kakimoto K[1], Kusuyama J[1], Bandow K[2], Ohnisi T[1], Matsuguchi T[1] ([1]Div Oral Biochem, Kagoshima Univ Grad Sch Med and Dent, [2]Div Biochem, Dept Oral Biol and Tissue Engineering, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-157** | Evoked inward currents in trigeminal ganglion neurons following mechanical stimulation of odontoblasts in the odontoblast-neuron coculture system<br>○Sato M, Kimura M, Kojima Y, Higashikawa A, Shimada M, Ogura K, Mochizuki H, Shibukawa Y, Tazaki M (Dept Physiol, Tokyo Dent Coll) |
| **P2-158** | Analyses of long-term $Ca^{2+}$ responses and cell movements in culture conditions in the salivary cells with stably expressing $Ca^{2+}$ biosensor using AAV vectors<br>○Morita T, Nezu A, Tanimura A (Dept Pharmacol, Sch Dent, Health Sci Univ Hokkaido) |
| **P2-159** | The elucidation of molecular mechanisms underlying the TGF-$\beta$-induced pathological changes of synovial cells derived from temporomandibular joint<br>○Yokota S[1], Chousa N[2], Ibi M[3], Kikuchi E[1], Kimura H[1], Kyakumoto S[2], Kamo M[2], Sato K[1], Ishisaki A[2] ([1]Dept Develop Oral Health Sci, Div Ortho Iwate Med Univ Sch Dent, [2]Div Cell Biosignal Sci Dept Biochem, Iwate Med Univ, [3]Div Mol Cell Pharmacol Sch Pharmaceutical, Iwate Med Univ) |
| **P2-160** | Molecular mechanisms of modifying effects by gymnemic acids and miraculin on the sweet taste receptor, T1R2/T1R3<br>○Sanematsu K[1], Shigemura N[1], Ninomiya Y[1,2] ([1]Sec Oral Neurosci, Fac Dent Sci, Kyushu Univ, [2]Div Sens Physiol, Res and Develop Ctr for Taste and Odor Sens, Kyushu Univ) |
| **P2-161** | Neuromodulatory effects of appetite-related factors in GLP-1 releasing neurons of mouse brainstem<br>○Hisadome K, Hirai Y, Maezawa H, Funahashi M (Dept Oral Physiol, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| **P2-162** | Molecular control of angiogenesis in tooth development<br>○Sunohara M, Sato I (Dept Anat, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-163** | Effect of placenta on collagen type-1 and inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts<br>○Masuno K[1], Imamura Y[2], Honda Y[3], Wang P[1] ([1]Dept Innovation Dent Educ, Osaka Dent Univ, [2]Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ, [3]Inst Dent Res, Osaka Dent Univ) |
| **P2-164** | Changes of metabolic profiles in normal oral cells induced by eugenol<br>○Sakagami H[1], Tanaka S[2], Murakami Y[2], Katayama T[2], Amano O[3], Yokose S[4] ([1]Div Pharmacol, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div General Clin Dent, Meikai Univ Sch Dent, [3]Div Anat, Meikai Univ Sch Dent, [4]Div End Operative Dent, Meikai Univ) |
| **P2-165** | Identification and analysis of a protein regulating vesicle trafficking of endosome/lysosomes in osteoclasts<br>○Iwatake M, Okamoto K, Tsukuba T (Dept Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-166** | Characterization and partial purification of Ca-dependent ATPase of osteoblastic MC3T3-E1 cell<br>○Kudo T[1,2], Deyama Y[3,4], Yosimura Y[3], Suzuki K[3], Yamazaki Y[1] ([1]Dept Oral Gerodont, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [2]Nikikai Dent Clinic, [3]Dept Mol Cell Pharmacol, Hokkaido Univ Grad Sch Dent Med, [4]Poplar Avenue Dent Clinic) |
| **P2-167** | Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast maturation<br>○Fukuma Y, Sakai E, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T (Div Dent Pharmacol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **P2-168** | Phosphate enhances the bisphosphonate-induced cytotoxicity of osteoblastic cells<br>○Tajima M, Sakagami H (Div Pharmacol, Dept Diagn Therapeutic Sci, Meikai Univ Sch Dent) |

| | |
|---|---|
| **P2-169** | Inhibition of oral ulcer-induced pain by shogaol and gingerol through sodium channel $Na_v1.8$ blockage<br>○Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Inenaga K (Div Physiol, Kyushu Dent Univ) |
| **P2-170** | Regulation of noradrenaline transporter gene expression by nicotine<br>○Sogawa C[1,4], Ohyama K[2], Sogawa N[3], Kozaki K[1] ([1]Dept Dent Pharmacol, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [2]RI Res Cent, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci, [3]Dept Dent Pharmacol, Matsumoto Dent Univ,, [4]Adv Res Ctr Oral Craniofacial Sci, Okayama Univ Grad Sch Med Dent Pharm Sci) |
| **P2-171** | Purification of a novel lectin from the dorsal spines of the stonefish, *Synanceia verrucosa*<br>○Kato K[1], Nakagawa H[1,2], Shinohara M[1], Ohura K[1] ([1]Dept Pharmacol, Osaka Dent Univ, [2]Dept Nursing Sikoku Univ) |
| **P2-172** | The designing of the new derivatives of Coumarin having cytotoxic activity to human oral tumor cell (Part 2)<br>○Ishihara M[1], Yamauchi M[2] ([1]Div Basic Chem Oral Biol, Tissue Engineering, Meikai Univ Sch Dent, [2]Div Med Informatics Dept Community Health Sci, Meikai Univ Sch Dent) |
| **P2-173** | Neuronal response to thermal stimuli in the monkey ventral premotor cortex<br>○Unno S, Iwata K (Dept Physiol, Sch Dent, Nihon Univ) |
| **P2-174** | The behavioral responses to various concentration of vitamin C solutions in vitamin C deficient rats<br>○Yasuo T, Suwabe T, Sako N (Dept Oral Physiol,Asahi Univ Sch Dent) |
| **P2-175** | Whole mouth gustatory test on elementary school-age children<br>○Saiki C, Ide R, Takahashi M, Imai T (Dept Physiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Tokyo) |
| **P2-176** | Measurement of physical properties of food bolus with incline analysis<br>○Shiozawa K, Okumura S (Dept Physiol, Tsurumi Univ Sch Dent Med) |
| **P2-177** | Involvement of FOXO1 and PGC1-alpha in transcription of D-dopachrome tautomerase gene<br>○Iwata T[1], Kuribayashi K[2], Yoshimoto K[1] ([1]Dept Med Pharmacol, Tokushima Univ Grad Sci Inst Biomed Sci, [2]Dept Oral Max Surgery, Sch Med, Dokkyo Med Univ) |
| **P2-178** | Codon optimization of luciferase genes for efficient protein expression in mammalian cells and bioluminescence imaging: its application for dentistry research<br>○Suzuki T[1], Egashira M[2], Kawai T[2,3], Kanamori T[1,3], Inouye S[4] ([1]Dept Biochem, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, [2]Dept Dent Mater Sci, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent, [3]Center Adv Oral Sci, Aichi-Gakuin Univ, [4]JNC Yokohama Res Center) |
| **S-1** | Distribution of TRPV1 and TRPV2 in the human stellate ganglion and spinal cord<br>○Fujii Y, Sato T, Shimizu Y, Ichikawa H (Div Oral Craniofacial Anat, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **S-2** | Histochemical assessment of tooth germ and alveolar bone in transgenic mice over-expressing parathyroid hormone-related peptide in osteoblasts<br>○Yamazaki N[1], Yamamoto T[2], Hasegawa T[2], Hongo H[2], Haraguchi M[2], Oda K[3], Komori T[4], Amizuka N[2] ([1]Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [2]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med, [3]Div Biochem, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [4]Dept Cell Biol, Nagasaki Univ Grad Sch Biomed Sci) |
| **S-3** | Saliva components as a possibility of systemic stress marker<br>○Hata F[1], Katsuragi H[2] ([1]Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata, [2]Dept Microbiol, Nippon Dent Univ Sch Life Dent at Niigata) |
| **S-4** | Immunohistochemical localization of RELM-beta/FIZZ2 during tooth development<br>○Takahama A[1], Hosoya A[2], Nakamura H[2] ([1]Matsumoto Dent Univ, [2]Dept Oral Histol, Matsumoto Dent Univ) |
| **S-5** | Spatiotemporal expression patterns of *Hey1* and *Hey2* during mouse tooth development<br>○Kibe K[1], Nakatomi M[2], Kataoka S[2], Toyono T[2], Seta Y[2] ([1]Sch Dent, Kyushu Dent Univ, [2]Div Anat, Kyushu Dent Univ) |
| **S-6** | Ultrastructural assessment on osteoblasts and osteocytes in *c-fos* deficient mice<br>○Abe M[1], Hongo H[2], Yamamoto T[2], Hasegawa T[2], Amizuka N[2] ([1]Sch Dent Med, Hokkaido Univ, [2]Dept Deve Biol Hard Tissue, Hokkaido Univ Grad Sci Dent Med) |
| **S-7** | *Porphyromonas gingivalis*-induced production of IL-31 by human mast cells<br>○Takase A[1], Tada H[1], Nishioka T[2], Matsushita K[3], Takada H[1] ([1]Div Oral Microbiol, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [2]Div Oral Diag, Tohoku Univ Grad Sch Dent, [3]Dept Oral Dis Res, NCGG) |
| **S-8** | Extracellular ATP induces IL-6 production in human salivary gland cells<br>○Nemoto T[1,2], Kuroishi T[2], Sugawara S[2] ([1]Tohoku Univ Sch Dent, [2]Div Oral Immunol, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |
| **S-9** | A study on a transport mechanism of the accessory protein Mfa5 in Mfa1 fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*<br>○Iijima Y, Hasegawa Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F (Dept Microbiol, Aichi-Gakuin Univ Sch Dent) |
| **S-10** | NFAT activity-based screening for identifying osteoclastogenesis-related small compounds<br>○Saikawa M[1], Kakihara Y[1], Akiba Y[2], Egusa H[3], Saeki M[1] ([1]Div Dent Pharmacol, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [2]Div Bio-Prosthodontic, Niigata Univ Grad Sch Med Dent Sci, [3]Div Oromaxillofacial Regeneration, Tohoku Univ Grad Sch Dent) |