

ムタナーゼとデキストラナーゼからなるキメラ酵素作製とその性状

鶴見大学歯学部 保存修復学講座¹ 探索歯学講座²
○大塚 良子¹ 今井 奨² 花田 信弘² 桃井 保子¹

Production and characterization of chimeric enzyme composed of mutanase and dextranase

Department of Operative Dentistry¹, Department of Translational Research²,
Tsurumi University school of Dental Medicine
○OTSUKA Ryoko¹, IMAI Susumu², HANADA Nobuhiro², MOMOI Yasuko¹

【背景】

う蝕の原因菌であるミュータンスレンサ球菌のバイオフィーム形成には、 α -1,3-グルコシド結合と α -1,6-グルコシド結合をとともに有する非水溶性グルカンが関与している。このグルカンはミュータンスレンサ球菌の歯面への付着、定着に関与し、う蝕原性バイオフィームの成熟を促す。 α -1,3-グルコシド結合主体の非水溶性グルカンと α -1,6-グルコシド結合主体の水溶性グルカンを同時に分解することができれば、バイオフィーム形成を阻止し、う蝕の発症を抑制することが期待できる。

【目的】

α -1,3-グルコシド結合の分解酵素であるムタナーゼと α -1,6-グルコシド結合の分解酵素であるデキストラナーゼからなるキメラ酵素を作製し、その性状を検討する。

【方法】

Paenibacillus humicus からムタナーゼ遺伝子、*Streptococcus mutans* UA159 株からデキストラナーゼ A (dexA) 遺伝子を、それぞれクローニングし、両遺伝子を同一ベクター内で連結して Lac Z プロモーターの下流に組み込み、大腸菌に導入した。大腸菌を振盪培養して増殖させた後 ($OD_{640}=0.5\sim 0.7$)、IPTG により遺伝子発現誘導を 4~5 時間行った。遠心分離により上清と沈渣に分画し、沈渣をクラッシュャーで機械的に破壊したのち、遠心分離した (上清を Lysate-1 とする)。この沈渣に Qproteome[®]Bacterial Protein Prep Kit (QIAGEN) を使い、タンパク質を可溶化させ遠心分離した (上清を Lysate-2 とする)。さらに、沈渣に Inclusion Body Solubilization Reagent を加え、封入体の破壊を行い遠心分離した (上清を Lysate-3 とする)。

キメラ酵素の活性を基質グルカンからの還元糖の遊離によって測定した。還元糖の定量には Somogyi-Nelson 法を用いた。650nm の吸光度を測定し、標準曲線からグルコース量に換算した。培養上清、Lysate-1、Lysate-2、Lysate-3、最終沈渣をキメラ酵素画分とした。デキストラナーゼに対して 1% デキストラン (Dextran grade C)、ムタナーゼに対して 2% ムタン (防衛医科大学校化学教室 津守秀明先生より供与) をキメラ酵素の基質として用いた。

【結果】

各酵素画分をムタンおよびデキストランと反応させ、それぞれの基質が分解したことを確認した。各画分の酵素活性を比較すると、培養上清、Lysate-1、Lysate-2 で活性が認められ、細胞内に可溶性タンパクとして存在するものが一番多いことがわかった。デキストラナーゼの至適 pH は 5 をピークに 4~5.5 で、ムタナーゼのそれは pH4~6.5 の広いピークであった。キメラ化したことで、ムタナーゼ活性、デキストラナーゼ活性を消失することなく、両酵素の性質を保つことが確認できた。

【今後の展望】

本研究により開発した酵素を用いて、より効果的なバイオフィームの分解と、う蝕発症予防に貢献できる可能性についてさらに検討する。

【会員外研究協力者】

津守 秀明 (防衛医科大学校 化学教室)
野村 義明, 角田 衣理加 (鶴見大学歯学部 探索歯学講座)

Porphyromonas gingivalis のバイオフィーム形成におけるプロテアーゼの役割

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)

○山口幹代, 野村由一郎, 朝日陽子, 前園葉月, 山本れいこ, 呉本勝隆, 林 美加子, 恵比須繁之

The Role for Protease in the Biofilm Formation of *Porphyromonas gingivalis*

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Mikiyo Yamaguchi, Yuichiro Noiri, Yoko Asahi, Hazuki Maezono, Reiko Yamamoto, Katsutaka Kuremoto, Mikako Hayashi,
Shigeyuki Ebisu

[研究目的]

Porphyromonas gingivalis は、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎の主要な病原細菌であり、プロテアーゼ、線毛ならびにリボ多糖などの病原因子を有する。また、*P. gingivalis* はバイオフィームを形成することで、抗菌剤や宿主の免疫機構に対して抵抗性を獲得するため、疾患を難治化・慢性化に導くとともに、バイオフィームが細菌のリザーバーとなり、遊離した細菌が感染の拡大や急性症状の原因になると考えられる。*Staphylococcus aureus* では、バイオフィームからの細菌の遊離、すなわちデタッチメントにプロテアーゼが関与していることが報告されている。*P. gingivalis* においても、主要なプロテアーゼであるジンジパインの欠損株およびジンジパインの活性化に関与する遺伝子の欠損株で、野生株と比較してバイオフィーム形成の亢進が認められ、プロテアーゼとデタッチメントの関連が示唆されている。本研究では、プロテアーゼ阻害剤を添加することにより、プロテアーゼのバイオフィーム形成に対する役割を検討した。

[材料および方法]

1. 使用菌株およびプロテアーゼ阻害剤

菌株は、*P. gingivalis* ATCC 33277 を使用した。また、プロテアーゼ阻害剤として、Leupeptin および N-alpha-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) を使用した。

2. バイオフィームの形成

5 μ g/ml ヘミンと 1 μ g/ml メナジオンを添加した Trypticase Soy Broth (TSB) 培地にて一晩培養した *P. gingivalis* を phosphate-buffered saline (PBS) にて 5×10^8 CFU/ml に懸濁後、唾液処理を施したカバーガラスチャンバー内で 37°C、嫌気条件下にて 24 時間培養し、バイオフィームを形成した。

3. デタッチメントの検討

上記 2 項の方法で形成したバイオフィームを洗浄後、サンプルの一部は PBS にて懸濁し、吸光度(OD₅₅₀)を測定した。一方、他のサンプルは、各ウェルに PBS あるいは TSB を添加し、嫌気的条件下にて、4°C あるいは 37°C で 90 分静置し、上清を除去し洗浄後、同一の方法で吸光度(OD₅₅₀)を測定した。両者の量を比較することにより、デタッチメントしたバイオフィーム量を検討した。

4. デタッチメントに対するプロテアーゼ阻害剤の影響

上記 2 項の方法で形成したバイオフィームを洗浄後、各ウェルに TSB またはプロテアーゼ阻害剤添加 TSB を添加し、嫌気的条件下にて、4°C または 37°C で 90 分静置後、3 項と同一の方法で定量した。

5. バイオフィーム形成に対するプロテアーゼ阻害剤の影響

5 μ g/ml ヘミンと 1 μ g/ml メナジオンを添加した TSB 培地にて一晩培養した *P. gingivalis* を TSB またはプロテアーゼ阻害剤添加 TSB にて 5×10^8 CFU/ml に懸濁後、唾液処理を施したカバーガラスチャンバー内で 37°C、嫌気条件下にて 24 時間培養した。上清を除去し、PBS にて洗浄後、吸光度(OD₅₅₀)を測定した。

6. 統計学的解析

得られた結果は Student's *t*-test にて有意差検定を行った。

[成績]

1. 形成したバイオフィームに TSB を添加したサンプルは、4°C および 37°C の両方において、PBS を添加したサンプルと比較して残存するバイオフィームの量が有意に減少した ($p < 0.05$)。

2. 形成したバイオフィームに TSB を添加した後、37°C で静置したサンプルは、4°C で静置したサンプルと比較して、残存するバイオフィームの量が有意に減少した ($p < 0.01$)。

3. 形成したバイオフィームに TSB を添加する際、プロテアーゼ阻害剤を加えたサンプルは、加えなかったサンプルと比較して、37°C で静置した場合は残存するバイオフィームの量が有意に増加した ($p < 0.05$) が、4°C で静置した場合には有意差はなかった。

4. バイオフィーム形成の際にプロテアーゼ阻害剤を添加したサンプルでは、添加しなかったサンプルと比較して、バイオフィーム形成量が増加した ($p < 0.01$)。

[考察]

TSB を添加したサンプルでは PBS を添加したサンプルと比較して、また 37°C で静置したサンプルでは 4°C で静置したサンプルと比較してデタッチメント量が有意に増加した。また、プロテアーゼ阻害剤を添加することで、デタッチメントが阻害され、バイオフィーム形成が増加した。これらの結果より、バイオフィーム形成細菌は栄養に富んだ条件下または至適温度下でプロテアーゼの発現が増加し、デタッチメントが誘導されることが示唆された。

[結論]

P. gingivalis のバイオフィーム形成において、プロテアーゼはその成長やデタッチメントを制御する一因であることが示唆された。

(本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(若手研究(B)23792171)の補助の下に行われた。)

マイクロコスモバイオフィームによる *in vitro* 表層下脱灰病巣モデルの確立

神奈川県立歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野¹, 神奈川県立歯科大学 感染防御学講座 微生物学分野²,
○富山 潔¹, 向井義晴¹, 熊田秀文², 椎谷 亨¹, 渡辺清子², 浜田信城²,
寺中敏夫¹

Establishment of the microcosm biofilm model inducing subsurface dentin lesions *in vitro*

¹Div. of Restorative Dent, Dept. of Oral Medicine, ²Div. of Microbiology, Dept. of Infection Control,
Kanagawa Dental College

OTOMIYAMA Kiyoshi¹, MUKAI Yoshiharu¹, KUMADA Hidefumi², SHIYA Toru¹,
WATANABE Kiyoko², HAMADA Nobushiro²,
TERANAKA Toshio¹

【研究目的】現在までに、バイオフィームの性質の解明および齲蝕予防を目的としたコーティング材、充填材料、抗菌薬などの開発を目的として様々なバイオフィームモデルが開発されている。しかしながら、口腔内プラークの基質への強固な附着および基質の違いによるプラーク代謝の相違を再現すると共に、さらには抗菌薬の濃度、処理回数を正確に反映できる実験モデルは Exterkate らが報告するまで報告されていなかった (Caries Res, 2010)。我々は、マイクロコスモバイオフィームの長期培養モデルを確立し第 133 回本学会において報告した。本研究では、この長期モデルを応用し、バイオフィームが歯質の脱灰に関与する新しい *in vitro* 表層下脱灰病巣モデルを確立することを目的として、バイオフィームの糖代謝および総細菌数と象牙質の脱灰様相との関係についての検討を行なった。

【材料および方法】ウシ下顎中切歯の歯根部の歯頸部直下から 8 mm 根尖側の位置を水平に切断し (IsometTM, Buehler, USA), 得られた円筒状試片を 2 分割 (Well 3242, Walter Ebner, Germany) した後、表面を 2000 番の耐水研磨紙で研磨し、さらに直径 6 mm 厚さ 1 mm の円盤状象牙質試料を切り出した。試料 2 枚の表面が両側となるように貼りわせ、バイオフィーム形成用試片とした。実験群は、①ガラス群 (G), ②対照群 (F 非含有: 0F), ③0.2 ppm F 含有培養液群 (0.2F), ④2.5 ppm F 含有培養液群 (2.5F) の 4 群とした (n=6)。バイオフィームの培養には、1 被験者から採取した刺激唾液を用い、バイオフィームモデルとして Amsterdam active attachment model (Exterkate RAM ら, 2010) に従い、培養は McBain 2005 (0.2% スクロース含有) を用い、培養液の交換を 10 時間、14 時間の間隔で 1 日 2 回行なう連続嫌気培養を 8 日間行なった。交換済みの培養液に対して pH の測定 (9618-10D, F-71, Horiba) を行なった。その後、実験終了時に血液寒天培地を用いて生菌数測定を行なった。さらに培養終了後の象牙質試片より厚さ 300 μm の薄切切片を作製し、Transversal Microradiography (TMR) を撮影後 (PW3830, Spectris, UK), ミネラル喪失量 (IML) を測定し (TMR2000, Inspector, The Netherlands) した後、One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5% にて統計学的分析を行ない、各群の脱灰様相を比較検討した。

【結果】0.2 F 群および 2.5 F 群では、明瞭な表層を伴った表層下脱灰病巣の形成が確認され、2.5 F 群の表層ミネラル密度は 0.2 F 群に比較して上昇していたが、対照の 0 F 群では表層が不明瞭な脱灰病巣が形成されていた。0.2 F 群および 2.5 F 群の表層には、ラミネーション構造が認められた。各群の平均 IML (vol%×μm) は、他群に比較して 0 F 群が有意に大きく、0.2 F 群と 2.5 F 群間に有意差は認められなかった。バイオフィーム実験終了時の pH は、G 群 (4.15), 0 F 群 (5.6), 0.2 F 群 (5.6), 2.5 F (5.5) であり、G 群の pH が最も低かった。また象牙質上で培養した 3 群の総細菌数は G 群に比較して有意に多かった。

【考察】口腔内唾液に含まれるフッ化物濃度であるとされる 0.2 ppm F を含有させたマイクロコスモバイオフィームモデルは表層を伴う象牙質脱灰病巣を形成した。象牙質で培養を行なった 3 群の pH は、G 群に比較して顕著に高い値を示し、象牙質から溶出した成分が緩衝作用を生じさせている可能性が示唆された。さらに培養の終了時点においては 3 群 (0 F, 0.2 F, 2.5 F) の pH 値間には有意差が認められなかったが、0.2 ppm F および 2.5 ppm F は、バイオフィームによる象牙質の脱灰過程において表層形成の役割を担うとともに脱灰抑制を促すが、総細菌数やバイオフィーム中の細菌の糖代謝には大きな影響を及ぼさない可能性があることが判明した。これらの結果より、本モデルはバイオフィームの性質、細菌叢の多様性の分析、各種抗菌薬の効能、齲蝕の予防効果を期待したコーティング材および充填材料の評価など、様々な分野への応用が期待できることが示唆された。

【結論】マイクロコスモバイオフィームを用いた *in vitro* モデルは、口腔内を模した、表層下脱灰病巣を誘発できることが確認された。したがって本モデルは、実際の口腔内におけるバイオフィーム形成過程を再現しており、齲蝕のメカニズム解析およびその予防法・治療法を検討するための最も効果的な手法と思われる。

再石灰化されたエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰したときの性状変化に関する研究

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○林 真希, 村上景子, 堀江 卓, 富士谷盛興, 千田 彰

Changes in characteristics of demineralized enamel subsurface lesion treated with remineralization

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○HAYASHI Maki, MURAKAMI Keiko, HORIE Taku, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【研究目的】

エナメル質表層下脱灰層には、再石灰化によりミネラル量の回復や結晶構造の変化などが起こり、ある程度の耐酸性が獲得されるといわれている。しかしながら、再びエナメル質表層で脱灰と再石灰化の平衡関係が崩れ脱灰に傾くと、耐酸性を獲得した初期エナメル質う蝕と同様に窩を形成する可能性がある。

再石灰化した表層下脱灰層を再度脱灰したときのミネラル量の変化については、いくつかの報告がある。しかし、これらのほとんどは再石灰化した表層下脱灰層の表層のみについて検討したものであり、表層下脱灰層の深層を含めて検討した報告はほとんど見受けられない。

本研究は、再石灰化したエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰した場合、脱灰層の深層も含めて脱灰された部分の性状変化や結晶構造について検証することとした。そこでまずミネラルの挙動を検索することを目的に、表層下脱灰層をフッ化物あるいは CPP-ACP (カゼインホスホペプチド-非結晶性リン酸カルシウム複合体) で再石灰化し、再度脱灰したときのミネラル量の変化、ならびに再石灰化層のミネラルの耐酸性を検討した。

【材料および方法】

新鮮ウシ抜去前歯唇側エナメル質から 5×4×3 mm のブロックを切り出し、唇側面 (#2000 仕上げ) に設けた 3×2 mm の矩形面以外をネイルバーニッシュでマスキングし、試片とした。試片全体を脱灰ゲル (0.1M 乳酸, 8 % methylcellulose, pH 4.6, 37 °C) に 10 日間浸漬して表層下脱灰層を作製した。次に、CPP-ACP ペースト (MI Paste, ジーシー, 以下 MI (群) と略す) およびリン酸酸性フッ化ナトリウムゼリー (フルオール・ゼリー, 東洋製薬, 以下 F (群) と略す) を再石灰化促進物質として用いて再石灰化した。すなわち、MI 群は 1 日 2 回 (1 回: 30 分), F 群は 1 日 1 回 (30 分) それぞれ定時に 7 日間塗布し、処理時間以外は唾液基準ミネラル溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.0, 37 °C) に保管した。再石灰化後、再び人工脱灰液* (50 mM 酢酸, 1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, pH 4.6, 37 °C) に 6 日間浸漬した。なお、健全エナメル質も同様に脱灰し、これをコントロールとした。表層下脱灰層作製時、再石灰化時、および再脱灰時の各試片からそれぞれ調製したスライス標本 (100 μm 厚) を用いて、Contact Microradiography (管電圧 10 kV, 管電流 2 mA, 照射時間 5 分) を撮影し、分析用ソフト (Win ROOF, 三谷) を用いて脱灰層の表層側および深層側のミネラルプロファイルを作製した。

【結果および考察】

本実験の条件下では、MI 群、F 群いずれの実験群においても表層下脱灰層を再石灰化した場合のミネラルの取り込み量は、表層下脱灰層の表層側の方が深層側より多かった。しかしながら、再石灰化後のミネラルの総量は表層側の方が深層側よりも少なく、また、健全エナメル質のミネラル量と同程度までには回復しなかった。ところが再石灰化した表層下脱灰層を再度脱灰した場合の脱灰量は、深層側の方が表層側より多かった。このことから、表層下脱灰層を再石灰化した場合、表層側の方が深層側に比べ耐酸性が向上することが判明した。したがって、健全エナメル質、表層下脱灰層、あるいは再沈着したミネラルの結晶構造の変化など、さらに検討する必要があると思われた。

【結論】

再石灰化したエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰したときの表層側および深層側のミネラルの挙動について検討し、以下の知見が得られた。

- 1) 表層下脱灰層を再石灰化した場合のミネラルの取り込み量は、表層下脱灰層の表層側の方が深層側より多かった。
- 2) 再石灰化した表層下脱灰層を再度脱灰した場合の脱灰量は、深層側の方が表層側より多かった。
- 3) 再石灰化した表層下脱灰層の表層側は、深層側に比べ耐酸性が向上した。

【参考文献】

* 富永貴俊, 他: エナメル質再石灰化病巣の物理的・化学的安定性; 日歯保存誌 51, 226-234, 2008.

クロルヘキシジン配合セルフエッチングアドヒーシブの *Streptococcus mutans* に対する抗菌性

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科保存修復学分野
○森本 紗也子、西谷 佳浩、星加 知宏、吉山 昌宏

Antibacterial effects of an experimental self-etching adhesive incorporated chlorhexidine against *Streptococcus mutans*

Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences
○MORIMOTO Sayako, NISHITANI Yoshihiro, YOSHIYAMA Masahiro

【研究目的】コンポジットレジンによる接着修復材料の進歩はめざましく、接着力・耐久性・審美性においても優れることから現在の臨床において広範囲に使用されている。しかしながら接着界面からの二次う蝕の発現は依然として多い。このことから接着界面での抗菌作用を持つ修復材料が二次う蝕の発現抑制につながるのではないかと考えた。数ある修復材料の中ではグラスイオノマーセメントが細菌に対し発育抑制があることが報告されているが、接着性コンポジットレジン修復と比較すると審美性、耐久性が劣るとされている。そこで本研究では接着界面での二次う蝕の発現抑制を目的とし、クロルヘキシジンを配合した試作セルフエッチングアドヒーシブを用いて抗菌性について検討を行った。

【材料および方法】供試菌として *Streptococcus mutans* (以下 *S. mutans*) を使用し、TSBY 培地を用いて培養した。試作アドヒーシブに 0%、1%、2%、3%、4%、5% のクロルヘキシジン (SIGMA 社) を配合したクロルヘキシジン配合セルフエッチングアドヒーシブ (以下 CHSEA) をそれぞれに作製し、実験に供した。

1. 未重合における CHSEA の抗菌作用をディスク拡散法にて検討した。620nm における OD 値 (濁度) 0.1 の *S. mutans* 菌液 100 μ l を TSBY 寒天培地上に播種し、その培地上に各試作 CHSEA を 5 μ l ずつ吸収させた直径 6 ミリの円形ろ紙を置いた。その後 36.5°C で 24 時間培養させた後の阻止円を検討した。コントロールとして、クロルヘキシジンそのものの抗菌性を CHSEA と比較するため同様にクロルヘキシジンを配合した PBS についても検討を行った。

2. 重合後の CHSEA の抗菌作用を以下の方法により検討した。各試作 CHSEA 1g を重合させた後、それぞれ室温にて 3 週間滅菌水 3 ml に浸漬させた (以下 CHSEA 水とする)。この CHSEA 水 900 μ l に 10 倍濃度の TSBY 培地 100 μ l を混合し、さらに OD 値 (濁度) 10^{-5} の菌液 10 μ l を添加した。36.5°C で 24 時間反応させた後、100 μ l を TSBY 寒天培地に播種し、さらに 24 時間培養後に生じた集落数を計測した。

【結果】未重合 CHSEA の抗菌作用をディスク拡散法にて検討した結果、クロルヘキシジン配合 PBS ではいずれにおいても阻止円がみられたが濃度間の差はみられず、CHSEA においても同様であった。クロルヘキシジンを配合しない CHSEA 及び PBS では全く阻止円はみられなかった。重合後の CHSEA を使用した実験においては、3% 以上の CHSEA 水を用いた場合において細菌集落数の減少が認められた。

【考察】未重合における CHSEA の抗菌作用は、1~5% のクロルヘキシジンを配合した場合には濃度による差がみられなかった。このことからクロルヘキシジン配合 1% 以下についても抗菌性があると期待される。さらに CHSEA 中のクロルヘキシジンが寒天培地に拡散することによって阻止円が形成されたと思われる。

また CHSEA 水を使用した実験では 3~5% のクロルヘキシジン配合濃度では細菌集落数の減少がみられた。これは硬化した CHSEA からクロルヘキシジンが徐放され *S. mutans* の細菌集落を減少させたと思われる。以上のことからセルフエッチングアドヒーシブにクロルヘキシジンを配合した場合には、未重合でも重合後でも *S. mutans* の発育抑制を行い、接着界面における二次う蝕発現を抑制する可能性が示唆された。

ルシフェラーゼレポーターアッセイによるレジンモノマー解毒代謝応答の評価

¹愛知学院大学歯学部歯内治療学講座, ²愛知学院大学歯学部生化学講座,
³愛知学院大学歯学部高齢者歯科学講座, ⁴愛知学院大学歯学部歯科理工学講座
○折本 愛¹, 鈴木崇弘², 上野温子³, 河合達志⁴, 中村 洋¹, 金森孝雄²

Detoxification responses to resin monomers estimated with a luciferase reporter assay

¹Department of Endodontics, ²Department of Biochemistry, ³Department of Gerodontology,
and ⁴Department of Dental Material Science, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Ai Orimoto¹, Takahiro Suzuki², Atuko Ueno³, Tatushi Kawai⁴, Hiroshi Nakamura¹, Takao Kanamori²

【研究目的】

アクリル系レジンの未重合モノマーは細胞障害性を有する。レジンモノマーの毒性に対する細胞応答を明らかにすることは、レジンの安全な使用法を考え、また新規レジンの開発を行う上で重要である。我々はこれまでに、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより、メチルメタクリレート(MMA)が、抗酸化剤応答配列 (Anti-oxidant Responsive Element:ARE) を介した転写活性化によりグルタチオン-S-トランスフェラーゼ alpha 1 (*GSTa1*) 遺伝子の発現誘導を行うことを明らかにしている (Hattori et al. J. Dent. Res. 87(12):1117-1121, 2008)。しかしながら、他のモノマーに関しては解毒代謝遺伝子発現に関する報告は未だに無い。今回、我々は、ARE を有するレポーターベクターの改良を行い、ジヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)の ARE を介した転写活性への作用について、MMA との比較解析を行った。

【材料と方法】

TATA box を含む最小プロモーター (minP) を有するホタルルシフェラーゼベクター (pGL4. 23, Promega) を用いて、*GSTa1* 遺伝子 (ENSMUSG00000074181) の 5' 上流領域に存在する ARE (-729/-689, 41 bp; 8 bp のコンセンサス配列を 2 個含む) を 1-3 個有するレポーターベクターを構築した。また、応答率向上の目的で、hPEST または hPEST/hCL1 タンパク質分解配列を含む不安定化ホタルルシフェラーゼベクター (pGL4. 24 と pGL4. 25, Promega) も用いた。*GSTa1* プロモーター活性は、*GSTa1* 遺伝子の 5' 上流領域 990 bp を有するベクター (pGL4. 10-mGSTa1pro990) を用いて評価した。また、モデル細胞としては、解毒応答に優れるヒト肝がん細胞株 HepG2 を用いた。ARE を有するレポーターベクターをトランスフェクションして 24 時間培養した HepG2 細胞に対して、MMA、HEMA を添加し一定時間培養した。その後、細胞溶解液を回収し、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。内部標準としては、CMV プロモーターを有するレニラルシフェラーゼベクター (pRL-CMV) を共導入し、相対的な発光活性を算出した。

【結果および考察】

ARE を 1-3 個有するレポーターベクターについて、MMA (10 mM) の作用を比較検討した結果、ARE を 2 個タンデムに有する minP ベクター (pGL4. 23-2xARE) の応答率が最大 (3.9 倍) であり、pGL4. 10-mGSTa1pro990 と同等であったことから、ARE を介した転写活性を調べる上では、*GSTa1* の ARE を 2 個有するベクターが最適と考えられた。そこで次に、ARE を 2 個タンデムに有する不安定化ホタルルシフェラーゼベクター (pGL4. 24-2xARE と pGL4. 25-2xARE) を作出して MMA の作用を調べた結果、hPEST タンパク質分解配列のみを有する pGL4. 24-2xARE では、無刺激時の発光活性が pGL4. 23-2xARE に対して 1/10 になるものの、10 mM MMA に対する応答率が 8 倍へと上昇した (刺激後 6 時間で最大)。タンパク質分解配列として hPEST と hCL1 の両方を有するベクター pGL4. 25-2xARE を用いてもこれ以上の応答率の改善は認められなかった。次に、MMA に対して最大の応答率を示した pGL4. 24-2xARE をレポーターベクターを用いて、HEMA の作用を検討したところ、MMA と比較して HEMA は低濃度 (0.1 mM) から有意に作用を示し、10 mM で 22 倍という強い作用を示した。

【結論】

応答率の高いレポーターベクターを作出することで、HEMA は MMA と比較して、ARE を介した転写活性に対して低濃度から高い作用を示すことが明らかとなった。我々の構築した解毒代謝応答についての細胞評価系は、レジンモノマーの生体有害作用を解析する上で有用と考えられる。

ラット歯髄細胞における β -catenin による ectodin 発現と象牙芽細胞分化について

奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野
○門倉弘志、横瀬敏志

Effects of ectodin induced by β -catenin on odontoblast differentiation
in rat dental pulp cells

Division of operative dentistry, Department of conservative dentistry, Ohu university school of dentistry
○ Hiroshi Kadokura and Yokose Satoshi

【研究目的】

Wnt シグナル経路は個体発生や形態形成において重要な働きをしている。歯の発生過程にも Wnt は発現し、細胞の運命付けや増殖と分化に大きく関わっていることが知られている。一方、DAN/cerberus に属する ectodin は Wnt および BMP のアンタゴニストと考えられており、ectodin のノックアウトマウスでは歯数の異常や咬頭形態の異常が認められる。しかし、象牙芽細胞分化における Wnt シグナル経路の役割および ectodin 発現については不明な点が多い。本研究は象牙芽細胞分化における Wnt シグナルと ectodin の関わりを調べることを目的として、Wnt シグナル伝達経路の一つである canonical Wnt/ β -catenin シグナル経路に注目し、ラット培養歯髄細胞を用いて実験を行ったので報告する。

【材料と方法】

5 週齢の雌ラットの下顎切歯から歯髄組織を摘出し、細切後にコラーゲン-トリプシン酵素液にて分離した細胞を実験に用いた。培地は 10%CS α MEM に 1.5mM の β グリセロリン酸と 50 μ g/ml のアスコルビン酸を添加して使用した。 β -catenin の核内への集積の為に GSK-3 β の阻害薬として塩化リチウムを加えた群 (LiCl 添加群) を実験群とし、対照群と比較した。培養 20 日目において ALP 染色法および象牙質様石灰化結節の解析の為に、Von Kossa 染色法を行った。実験群および対照群について、象牙芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、DSP、オステオカルシン (OCN) mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。また、各群の ectodin mRNA の発現についてリアルタイム PCR 法により解析した。

【結果と考察】

対照群では培養 20 日目に ALP 陽性の細胞に囲まれた石灰化結節が認められたが、LiCl 添加群では石灰化結節の形成は減少した。ALP、DSP、OCN mRNA の発現は対照群に比較して LiCl 添加群では抑制された。また、LiCl 添加群では対照群に比較して ectodin の発現が亢進した。骨芽細胞は象牙芽細胞と同様の石灰化基質を分泌することが知られている。これまでに canonical Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の分化を促進することが報告されている。また、BMP は象牙芽細胞の石灰化結節形成を促進させることが報告されている。これらの事から canonical Wnt/ β -catenin シグナルにより Wnt および BMP のアンタゴニストである ectodin の発現が亢進し、その結果として象牙芽細胞の分化が抑制されたことが示唆された。

【結論】

Canonical Wnt/ β -catenin シグナルはラットの象牙芽細胞の ectodin 発現を誘導し、象牙芽細胞分化を調節していることが示唆された。

FGF-2 による KN-3 細胞の象牙芽細胞分化メカニズムの解析

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野¹

医療人間形成学講座総合診療学分野

○鷺尾絢子¹、寺下正道²、北村知昭¹

Mechanism of odontoblast differentiation of KN-3 cells by FGF-2.

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology¹, Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice², Kyushu Dental College

○WASHIO Ayako¹, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

<目的>

我々はこれまでに樹立した、Runx-2、Dentin sialophosphoprotein (DSPP) および collagen type I の発現や石灰化能 (象牙質形成能) といった象牙芽細胞の特徴を有する象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) を用い、歯髄創傷治癒および再生メカニズムを詳細に検討している。その成果のひとつとして、Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) による刺激が KN-3 細胞の Smad シグナル伝達経路を活性化し、Dentin sialoprotein (DSP) および Dentin matrix protein-1 (DMP-1) の発現を誘導することを明らかにした。さらに第 134 回 日本歯科保存学会春季学術大会において、我々は Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 刺激により KN-3 細胞の細胞突起伸長が誘導されること、石灰化能は抑制されること、神経細胞分化マーカーである Neurofilament 68 (NF68) の発現は認められない一方で象牙芽細胞分化マーカーの発現に変化が認められたことを報告した。以上の結果は、FGF-2 刺激による KN-3 細胞の突起伸長は、神経細胞分化による形態変化ではなく象牙芽細胞分化における形態変化であることを示唆している。今回、FGF-2 による KN-3 細胞の細胞突起伸長と象牙芽細胞分化との関連性を明らかにするため、FGF-2 刺激後の KN-3 細胞における細胞内シグナル伝達経路の解析をおこなった。

<材料と方法>

FBS 含有 α -MEM に各種濃度 (5~100 ng/ml) の FGF-2 を添加することにより KN-3 細胞を刺激した。一定時間培養後にタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法により FGF-2 シグナル経路に関与する PI3 kinase/Akt 経路および MAP kinase 経路上で機能する各種情報伝達分子の FGF-2 濃度依存性・刺激時間依存性のタンパク質発現およびリン酸化の状態を解析した。

<結果>

FGF-2 で KN-3 細胞を刺激することにより、Akt、p38 および ERK のリン酸化が認められた。Akt および p38 は FGF-2 濃度に依存しないリン酸化を示したが、ERK リン酸化は FGF-2 濃度 5 ng/ml において発現が強く認められた。次に、FGF-2 濃度 5 ng/ml で KN-3 細胞を刺激し、各シグナル伝達分子リン酸化への経時的影響を検討した。その結果、刺激時間 30 分において Akt、p38 および ERK のリン酸化が強く認められた。

<考察>

今回、FGF-2 刺激により KN-3 細胞の PI3 kinase/Akt 経路および MAP kinase 経路ともに活性化されることが明らかとなった。以上の結果は、FGF-2 刺激による KN-3 細胞の突起伸長が PI3 kinase/Akt 経路および MAP kinase 経路を介して誘導されることを示唆している。

<結論>

象牙芽細胞の特徴を有する KN-3 細胞は FGF-2 の刺激により PI3 kinase/Akt 経路および MAP kinase 経路を介して象牙芽細胞へと分化していることが示唆された。

ヒト歯髄細胞培養系においてアナンダマイドは Cannabinoid-1 receptor、Transient Receptor Potential Vanilloid-1 を介して MMP-2 産生を誘導する

鹿児島大学大学院医学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科保存学分野
○宮下桂子、小山徹、作田哲也、森元陽子、藤澤真理、徳田雅行、鳥居光男

Anandamide Induces Matrix Metalloproteinases-2 Production Through Cannabinoid-1 Receptor and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Human Dental Pulp Cells in Culture

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Medicine

○MIYASHITA Keiko, OYAMA Tohru, SAKUTA Tetsuya, MORIMOTO Yoko, FUJISAWA Mari, TOKUDA Masayuki, TORII Mitsuo

[研究目的]

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は細胞外マトリックスを分解する酵素で、様々な炎症性の疾患において重要な役割を果たすと考えられている。歯髄炎においては、MMP-2, -8, -9 の発現が上昇することが、また根尖病変においては MMP-1, -2, -8 および -9 のポジティブ細胞の割合の増加が報告されている。これらのことより MMP-2 を含む MMPs が、歯髄炎や根尖病変の発症に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。

アナンダマイド (AEA) は生体内脂質メディエーターである内因性カンナビノイドのひとつであり、鎮痛作用のみならず、免疫調節、炎症、細胞浸潤など様々な作用を持つことが知られている。AEA のレセプターとしては、カンナビノイド (CB) レセプター (CB1, CB2) と TRPV1 が知られており、これまで歯髄組織の神経線維に CB1 と TRPV1 の発現が、さらにヒト培養歯髄細胞では TRPV1 の発現が報告されている。

種々の細胞において AEA やそのアナログが MMP-2 の産生を誘導すること、もしくは抑制することが知られている。我々の研究室では、第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会で、歯髄細胞においては、AEA は、主として JNK 活性化を介して MMP-2 産生を誘導することを報告した。そこで本研究では、ヒト培養歯髄細胞における AEA レセプターの発現と MMP-2 産生への関与を検討した。

[材料および方法]

1. ヒト歯髄細胞の培養

矯正学的理由により抜去された第一小臼歯より歯髄細胞を採取し、10%FBS 添加 D-MEM で培養した。実験には 5~10 代までの細胞を用いた。

2. ヒト培養歯髄細胞における CB1, CB2, TRPV1 の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

3. ヒト培養歯髄細胞を CB1, CB2, TRPV1 のアンタゴニストを用いて前処理した後 AEA で刺激し、MMP-2 産生の阻害の有無をウェスタンブロット法にて検討した。

4. さらに AEA 刺激時の MMP-2 産生への関与が示唆された CB1, TRPV1 については siRNA にて knockdown し、その影響を確認した。

[結果]

1. ヒト培養歯髄細胞において CB1, CB2, TRPV1 の発現を確認した。

2. ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は CB1 および TRPV1 のアンタゴニストにより抑制された。

3. ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は CB1 siRNA, TRPV1 siRNA による knockdown 実験でもレセプターアンタゴニストの結果と同様に抑制された。

[考察]

ヒト培養歯髄細胞における AEA の MMP-2 産生の誘導は CB1, TRPV1 を介したものであることが示された。

骨芽細胞培養系におけるフィッシュコラーゲンペプチドのコラーゲンの質と石灰化に及ぼす影響

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野,²NC Oral Health Institute, School of Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill,³長崎大学産学官連携戦略本部共同研究支援部門先端科学支援室
○山田 志津香^{1,2}, 長岡 秀明², 寺嶋 雅彦², 津田 信明³, 林 善彦¹, 山内 三男²

Effects of Fish Collagen Peptides on Collagen Quality and Mineralization in Osteoblastic Cell Culture System

¹Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, ²NC Oral Health Institute, School of Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, ³Center for Industry, University and Government Cooperation, Nagasaki University
○Shizuka Yamada^{1,2}, Hideaki Nagaoka², Masahiko Terajima², Nobuaki Tsuda³, Yoshihiko Hayashi¹, Mitsuo Yamauchi²

【研究目的】

コラーゲンは、組織工学や再生医療において最も広く利用されている生体材料の一つである。口蹄疫や牛海綿状脳症などの人畜共通感染症の問題から、最近では魚の骨、皮、鱗から抽出したコラーゲンが健康補助食品、食品および化粧品の添加材として利用されている。しかし、魚コラーゲンの細胞機能への影響に関する EBM は殆どない。そこで、本研究では、マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞(MC3T3-E1 細胞)を用いて、コラーゲンの質と石灰化に関するフィッシュコラーゲンペプチド(FCP)の影響を検討した。

【材料および方法】

実験に用いた FCP は焼津水産化学工業(静岡)から供与された。まず、FCP を α -MEM に溶解し、5% (w/v)溶液を作製した。次に MC3T3-E1 細胞を 6 穴皿に 2×10^5 cells/well 播種し FCP 不含培地で培養した。コンフルエント後、5% FCP 溶液を総濃度 0.05, 0.1, 0.2, 0.5%となるよう培地に添加し、48 時間培養後、コラーゲン翻訳後修飾に関連する酵素[リシルヒドロキシラーゼ(LH)1-3, リシルオキシダーゼ(LOX), リシルオキシダーゼ類似(LOXL)1-4, グリコシルトランスフェラーゼ 25 ドメインコンテイング 1(GLT25D1)]の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により検討した。FCP 溶液を含有しない培地で培養した細胞を対照群とした。その後、至適濃度の FCP 溶液を含有する培地で培養を行い、2, 5, 7, 10, 14 日目に血球計算盤を用いて細胞数を計測した。培地は 3 日ごとに交換された。さらに、上記条件で培養を行い、培養 14 日目に細胞/基質を回収し、洗浄、凍結乾燥後、 NaB^3H_4 で還元し、6N 塩酸で加水分解した。その後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、対照群と FCP 実験群のアミノ酸分析ならびにコラーゲン架橋測定を行った。最後に、同条件で細胞を播種、培養して、コンフルエント後、FCP に加えて 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアスコルビン酸と 2mM の β グリセロリン酸含有の培地に置換した。培養 21 日目に 100%メタノールで細胞を固定して、1%アリザリンレッド S で染色を行った。染色された細胞は、Gregory らの方法 (*Analytical Biochemistry*, 329, pp. 77-84, 2004) を用いて評価した。

【結果】

飛行時間型質量分析法により、今回使用した FCP は分子量約 2,351~8,028 のペプチドであることが判明した。MC3T3-E1 細胞が、0.2%(w/v) FCP 含有培地で培養されたとき、LOX と LOXL1 を除く LH 1-3、LOXL 2-4、GLT25D1 の遺伝子発現が有意に増加した。よって、至適濃度を 0.2%(w/v)と決定した。そして、細胞増殖実験では、培養 5 日目を除いて、0.2% FCP 実験群と対照群間では細胞数に有意差はなかった。さらに培養 14 日目、細胞が産生したコラーゲン量を分析した結果、0.2% FC 実験群が対照群より有意に多かった。また、コラーゲン架橋に由来するヒドロキシリシン(Hyl)ならびに Hyl アルデヒド型が、0.2% FCP 実験群において有意に高いレベルを示した。さらに、石灰化誘導培地での 21 日間培養後のアリザリンレッド S 染色では、FCP を添加することにより、多くの石灰化塊を観察することができた。

【考察】

コラーゲンの糖鎖形成の役割についてはまだ十分に明らかではないが、GLT25D1 が I 型コラーゲンの Hyl にガラクトースを付加することが最近の研究で明らかとなっている。架橋部位の糖鎖形成の量と様式はコラーゲン架橋形成と成熟に重要な役割を果たす。本研究の結果、FCP は GLT25D1 の遺伝子発現を増加させ、アルデヒド型の総量には影響を及ぼさなかったが、Hyl アルデヒド型由来架橋経路に変化をもたらした。また、基質性石灰化が亢進したのは、コラーゲン産生量が増加したこと、ならびに上記経路の変化によりコラーゲン架橋の成熟が促進したことによるものと考えられる。これらのことから、FCP は、骨芽細胞培養系においてコラーゲン翻訳後修飾に関連する酵素の遺伝子発現を上方制御することでコラーゲン合成、質および基質性石灰化にポジティブな影響を及ぼしていることが示唆された。