

## 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は血管内皮細胞の遊走を促進する

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野<sup>1</sup>、(株) ツーセル<sup>2</sup>  
松田真司<sup>1</sup>、藤田 剛<sup>1</sup>、加治屋幹人<sup>1</sup>、武田克浩<sup>1</sup>、柴 秀樹<sup>1</sup>、河口浩之<sup>1</sup>、辻紘一郎<sup>2</sup>、栗原英見<sup>1,2</sup>

### Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances endothelial cell migration

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University  
Graduate School of Biomedical Sciences<sup>1</sup>, TWO CELLS Co. Ltd<sup>2</sup>.

Shinij Matsuda<sup>1</sup>, Tsuyoshi Fujita<sup>1</sup>, Mikihito Kajiya<sup>1</sup>, Katsuhiko Takeda<sup>1</sup>, Hideki Shiba<sup>1</sup>,  
Hiroyuki Kawaguchi<sup>1</sup>, Kouitirou Tsuji<sup>2</sup>, Hidemi Kurihara<sup>1,2</sup>

#### 目的

ビーグル犬の歯周炎モデルにおいて、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 投与群では非投与群と比較してセメント質、歯槽骨の再生が促進され、一定の幅を持つ歯周靭帯も再生することを明らかにした。また、BDNF は歯周靭帯由来線維芽細胞やセメント芽細胞の増殖、および骨関連タンパク質の発現を促進することを明らかにしてきた。さらに、BDNF は血管内皮細胞に対しても、細胞増殖、VEGF-B の発現を促進し、管腔形成を促進した (Tissue Eng. 2005, Journal of Biol. Chem. 2008)。血管新生は組織再生において必要不可欠であり、血管内皮細胞の遊走は、血管新生の初期過程において重要な役割を担っていると考えられているが、BDNF の作用については解明されていない。そこで本研究では BDNF が血管内皮細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。

#### 材料および方法

1. 供体細胞: ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) は CAMBREX 社より購入し、3 代継代培養した細胞を実験に使用した。
2. 細胞遊走能
  - 1) Wound Healing Assay: HMVEC を 5 日間培養後、滅菌した 1000  $\mu$ l のチップの先端で擦過し細胞を線状に剥離し BDNF (10, 25, 50ng/ml) を添加して、12 時間培養後、同部の状態を顕微鏡下で観察した。
  - 2) Transwell Cell Migration Assay: 解析にはメンブレンのポアサイズが 8  $\mu$ m の Transwell plate (COSTAR 社) を用いた。upper chamber に細胞を  $2 \times 10^5$  播種し、lower chamber に BDNF (10, 25, 50ng/ml) を添加した。24 時間後にエタノールで固定し、ギムザ染色を行い、遊走した細胞数を顕微鏡下で計測した。

#### 結果

細胞遊走能の実験において、Wound Healing Assay 及び Transwell Cell Migration Assay のどちらの実験系においても BDNF 添加群は、BDNF 非添加群と比較して HMVEC の遊走を促進した。Wound Healing Assay では BDNF の濃度 25ng/ml で最も細胞遊走が促進された。同様に、Transwell Cell Migration Assay においても BDNF 25ng/ml を添加した時に遊走細胞数が最も多かった。

#### 結論および考察

BDNF はヒト微小血管内皮細胞の遊走を促進した。これまでの研究成果と考え合わせると BDNF による歯周組織再生において、BDNF は血管内皮細胞の遊走、増殖、VEGF-B の発現を促進することによって、血管新生を促進することが示唆された。

## 口臭物質はヒト歯肉線維芽細胞にアポトーシスを誘導する

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科  
生体硬組織再生学講座 歯周学分野

○藤村 麻衣子、和泉 雄一

**Oral malodorous compound induces apoptosis in human gingival fibroblasts**  
Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School, Tokyo  
Medical and Dental University  
○Maiko Fujimura, Yuichi Izumi

### 【諸言】

近年、多くの方が口臭に悩んでおり、口臭は社会的あるいは心理的な障害ともなっている。その原因の約 87%は口腔内が原因であり、揮発性硫黄化合物 (VSC) である硫化水素 ( $H_2S$ )、メチルメルカプタン ( $CH_3SH$ )、ジメチルサルファイド ( $(CH_3)_2S$ ) が主要な口臭原因物質とされている。その中でも $H_2S$ は最近、一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)に続く第三のgasotransmitterとして知られ、口腔領域に限らず、多くの研究がなされている。これまでの研究では $H_2S$ が様々な細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている。しかし、それらのアポトーシスを起こす経路については未だ明らかに解明されていない。そこで本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞 (以下 HGF) を用いて、 $H_2S$ によるアポトーシスシグナル伝達経路についての解析を行った。

### 【材料と方法】

HGFは、日本歯科大学歯学部附属病院に来院された患者の健常歯肉より採取した。分析では継代数P4~P10 のものを用いた。 $H_2S$ ガス発生装置は、液体 $H_2S$ を揮発させ、5% $CO_2$ -Airにて希釈したものを、チャンバー内に定量を流し続けるものとした。

HGFを 50ng/mlの $H_2S$ ガスにて培養したものをテスト群、5% $CO_2$ -Airにて培養したものをコントロール群とし、以下の分析を行った。

- 1、ネクローシス細胞の比較：24、48 時間後にトリパンブルー染色を行い、光学顕微鏡にて計測を行った。
- 2、アポトーシス誘導の有無：24、48 時間後に Annexin-V・7-AAD 染色を行い、フローサイトメーターによりアポトーシスの検出を行った。
- 3、ミトコンドリア外膜の脱分極化：24、48 時間後に JC-1 染色を行いフローサイトメーターにより検出を行った。

### 【結果および結論】

- 1、ネクローシス細胞は、24 時間後ではコントロール群で 3.26%、テスト群で 3.89%と有意な差は見られなかった。また、48 時間後ではコントロール群 3.02%、テスト群で 2.83%と有意な差は見られなかった。
- 2、初期アポトーシスに関しては、24 時間後ではコントロール群で 4.12%、テスト群で 13.12%と $H_2S$ によりアポトーシスが有意に増加した。また 48 時間後にはコントロール群で 3.49%、テスト群で 21.35%となり 24 時間後と同様に有意な差が認められた。
- 3、ミトコンドリア膜の脱分極については 24 時間後にコントロール群で 5.28%、テスト群で 27.88%とテスト群において有意な上昇が見られた。また 48 時間後にはコントロール群で 6.72%、テスト群で 29.35%となり 24 時間後同様に $H_2S$ による有意な脱分極化が認められた。

以上の結果より、 $H_2S$ はHGFにアポトーシスを誘導することが明らかになった。また、アポトーシスを起こす過程でミトコンドリアが関与するミトコンドリアの脱分極に始まるCaspase-9 経路が活性化されている可能性が示唆された。

本研究にあたり、日本歯科大学生命歯学部 衛生学講座 八重垣 健教授、村田 貴俊講師、Calenic Bogdan 先生の御協力ならびに御助言に深く感謝いたします。

培養ヒト歯根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間における Bone sialoprotein および Matrix metalloproteinase-2 の発現

東北大学病院歯科医療センター 総合歯科診療部<sup>1</sup>、  
東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座歯科保存学分野<sup>2</sup>  
○下西 充<sup>1</sup>、遠藤 直樹<sup>1</sup>、齋藤 修<sup>1</sup>、小松正志<sup>2</sup>、菊池 雅彦<sup>1</sup>

Expression of bone sialoprotein and matrix metalloproteinase-2 at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament

Division of Comprehensive Dentistry, Tohoku University Dental Hospital<sup>1</sup>,  
Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry<sup>2</sup>  
○Mitsuru Shimonishi<sup>1</sup>, Naoki Endou<sup>1</sup>, Shu Saitoh<sup>1</sup>, Masashi Komatsu<sup>2</sup>, Masahiko Kikuchi<sup>1</sup>

(研究目的)

我々はマラッセの上皮遺残由来上皮細胞と歯根膜由来線維芽細胞を同一シャーレ内で共培養することにより、その細胞間相互作用に関する研究を行ってきた。この培養系において、上皮-間葉組織間に存在する基底膜の構成成分である細胞外マトリックスの Type IV コラーゲンおよびラミニンの発現が確認された (Shimonishi et al., Eur J Oral Sci 2005; 113: 34-40)。

SIBLING (Small Integrin-Binding LIgand N-linked Glycoprotein) family の一つ Bone sialoprotein は、特異的に潜在型 MMP-2 を活性型 MMP-2 にすることが知られている。本研究では、MMP-2 が TypeIV コラーゲンの分解活性を持つことから、上皮細胞-線維芽細胞間の境界部における Bone sialoprotein および MMP-2, -14 の発現に関する検討を行った。

(材料および方法)

歯学部附属病院口腔外科外来で抜歯した第三大臼歯より歯根膜組織を採取し、無血清混合培地により同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養し、境界部の確認をした後、サンプルとして実験に用いた。細胞は、10分間 4%Paraformaldehyde で固定後、通法に従い、免疫染色および *In situ* hybridization 法にて Cytokeratin AE1/AE3、Amelogenin、Type IV コラーゲン、Bone sialoprotein、MMP-2 および MMP-14 の発現を解析した。

また、上皮細胞と線維芽細胞の境界部のサンプルを取り出すために、ワセリンを底部にぬった直径 5 mm のシリコニングを境界部に挿入抽出し、Bone sialoprotein、MMP-2 および MMP-14 の mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。コントロールとして、上皮細胞のみ、線維芽細胞のみを培養したものをを用いた。

(結果)

上皮細胞と線維芽細胞の境界部において、Bone sialoprotein は免疫染色法、*In situ* hybridization 法共に線維芽細胞で発現がみられたが、上皮細胞ではその発現は確認されなかった。一方、MMP-2 は免疫染色法では、上皮細胞に強く発現したが、*In situ* hybridization 法では、MMP-2 の mRNA はむしろ線維芽細胞側でその発現がみられた。MMP-14 は免疫染色法、*In situ* hybridization 法共に上皮細胞でその発現が強くみられた。

RT-PCR 法では、Bone sialoprotein および MMP-2 の mRNA は共培養することによって強く発現し、相互作用による強い誘導が観察された。一方、MMP-14 の mRNA の発現に有意差はなかった。

(考察)

上皮細胞-線維芽細胞間の境界部における MMP-2 は、線維芽細胞側で発現した後、相互作用によって発現した上皮細胞側の MMP-14 に引き寄せられ、Bone sialoprotein によって境界部で活性化されることが示唆された。

## 新規歯小嚢マーカー分子、F-spondin の培養ヒト歯根膜細胞を用いた機能解析

松本歯科大学歯科保存学第一講座<sup>1</sup> 大阪大学大学院歯学研究科生化学教室<sup>2</sup>

○西田 英作<sup>1</sup>、斎藤 正寛<sup>2</sup>、吉成 伸夫<sup>1</sup>

Functional Analysis of the Dental Follicle Specific Maker, F-spondin.

Matsumoto Dental University, School of Dentistry, Department of Periodontology<sup>1</sup>

Osaka University, Graduate School of Dentistry, Department of Molecular and Cellular Biochemistry<sup>2</sup>

Eisaku NISHIDA<sup>1</sup>, Masahiro SAITO<sup>2</sup>, Nobuo YOSHINARI<sup>1</sup>

研究目的 歯周病は、歯肉、歯根膜、歯槽骨に炎症が波及し、歯の支持を喪失する炎症性の疾患である。歯周病罹患部位に対する処置は、スケーリング・ルートプレーニングなど原因除去療法が中心であるが、重篤な歯槽骨吸収を伴った場合、歯周ポケットが残存したり、著しく審美・機能を損ねた治癒形態をとらざるを得なかったりと問題点は多い。現在、臨床で歯周病患者に対する治療法として GTR 法、エムドゲインなどが行われているが、適応症例は限定されており、上記のような重症歯周病患者には適さない。そこで、疾患や外傷により一度失った組織・臓器を再生させる再生医療を歯周組織再生に応用すべく、歯根膜発生メカニズムに基づいた歯周組織再生療法を確立することを目的とし、歯根膜マーカー分子の検索を試みている。これまで演者らが構築した歯根膜遺伝子発現プロファイリングデータベース(Peioime データベース)より、歯小嚢に特異的に発現する新規マーカー分子として F-spondin を同定することに成功した(Nishida et al, Gene, 2007)。そこで、F-spondin がどのような機能を持つかを培養ヒト歯根膜細胞を用いて解析した。

### 材料および方法

#### 1. shRNAi-F-spondin ウイルスの作製

3 種類の F-spondin の shRNAi 配列を設計し (shRNAi-hF-spondin-1, 2, 3)、レンチウイルスベクター (CS-RfA-CG: 理化学研究所筑波研究所、三好浩之博士より供与) に組み換えた。その後 CS-shRNAi-hF-spondin-CG を 293T 細胞にトランスフェクションし、レンチウイルスを作製した。得られた shRNAi-hF-spondin レンチウイルスを 6well plate に培養したヒト歯根膜細胞 (以下 HPDL) に感染させ、その後 6 日間細胞培養を行った (HPDL-shRNAi-hF-spondin)。その後、HPDL より total RNA を抽出し、realtime RCR にてノックダウン効率を確認した。また、ネガティブコントロールとして shRNAi-Luciferase ウイルスを作製、使用した。

#### 2. shRNAi-hF-spondin を作用させた HPDL の形態観察

HPDL- shRNAi-hF-spondin の形態変化を観察する目的に、24 時間ごとに位相差顕微鏡像で撮影した。

#### 3. shRNAi-hF-spondin を作用させた HPDL の遺伝子発現の確認

HPDL- shRNAi-hF-spondin の歯根膜構成分子の発現に変化が生じるか否かを、歯根膜形成に関わる遺伝子群 (I 型コラーゲン、XII 型コラーゲン、periostin, tenascin N) の発現を realtime RCR 法を用いて確認した。

結果 作製した shRNAi-F-spondin ウイルスのノックダウン効率を検討した結果、shRNAi-F-spondin-2 はコントロールとして用いた HPDL-shRNAi-luciferase と比較して、HPDL- shRNAi-hF-spondin-2 における F-spondin の発現量を 27% に低下させることに成功した。HPDL- shRNAi-hF-spondin-2 の形態変化は観察されなかったが、realtime PCR の結果、歯根膜構成成分である I 型コラーゲン、XII 型コラーゲンの発現量が顕著に低下した。

考察 歯小嚢特異的に発現する F-spondin を HPDL でノックダウンすると、歯根膜構成成分である I 型コラーゲン、XII 型コラーゲンの発現量が顕著に減少したことより、F-spondin が歯根膜形成に関わる可能性が示唆された。

結論 F-spondin は歯小嚢特異的な細胞外マトリックスであり、歯根膜形成に関与する可能性が示唆された。

## 歯根膜細胞におけるPGE<sub>2</sub>によるVEGF産生に関する研究

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野

<sup>2</sup>鹿児島大学大学院 歯学総合研究科 歯周病学分野

坂東 由記子<sup>1</sup>、野口 和行<sup>2</sup>、小林 宏明<sup>1</sup>、和泉 雄一<sup>1</sup>

### PGE<sub>2</sub>-induced VEGF production in human periodontal ligament cells

<sup>1</sup>Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Department of Periodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Yukiko Bando<sup>1</sup>, Kazuyuki Noguchi<sup>2</sup>, Hiroaki Kobayashi<sup>1</sup>, Yuichi Izumi<sup>1</sup>

(諸言)

歯周炎は、歯周病原細菌による感染性疾患であり、その結果として局所の炎症及び骨吸収を伴う。血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) は血管新生作用や血管透過性亢進作用を有する分子であり、炎症病変や創傷治癒に関与していることが明らかにされている。炎症歯周組織においてもVEGF が存在することが報告され、また起炎性因子で刺激された培養歯肉線維芽細胞がVEGFを産生することも示されている。Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、PG合成酵素であるcyclooxygenase (COX)によって産生される起炎性因子であるが、近年では炎症時の血管新生にも関与することが明らかになってきている。我々は既にIL-1 $\alpha$ 刺激を受けた歯根膜細胞がCOX-2を介してPGE<sub>2</sub>を産生すること、およびCOX-2由来のPGE<sub>2</sub>がVEGF<sub>165</sub>産生に関与していることを報告した。しかしながら、ヒト歯根膜細胞におけるVEGF産生のシグナル経路に関しては十分に解明されていない。そこで、本研究では培養ヒト歯根膜細胞を用いてPGE<sub>2</sub>によるVEGF<sub>165</sub>産生メカニズムを検討したので報告する。

(材料及び方法)

#### 1. 細胞の培養

ヒト歯根膜細胞は10%牛胎児血清(FBS)含有 $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)培地を用いて37°C, 95% air, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。細胞は5~10代継代のものを各培養皿上の細胞数が一定になったところで実験に用いた。

#### 2. 細胞の刺激

歯根膜細胞をPGE<sub>2</sub>及びEP receptor agonistである17-phenyl- $\omega$ -trienor PGE<sub>2</sub> (EP1), butaprost (EP2), ONO-AE1-329 (EP3), ONO-AP-324 (EP4)で刺激し、24時間培養後に上清を回収し、上清中のVEGF<sub>165</sub>産生量をELISA kitにて測定した。VEGF産生に関与するPGE receptorについて検討した。またPGE<sub>2</sub>刺激によるVEGF<sub>165</sub>産生調節にどのシグナル経路が関与しているか検討するため、各種kinase inhibitor添加30分後PGE<sub>2</sub>で刺激し、24時間培養後に上清を回収し、上清中のVEGF<sub>165</sub>産生量をELISA kitにて測定した。歯根膜細胞に各kinase inhibitor添加後、PGE<sub>2</sub>で刺激し2時間後に全RNAを抽出した。RT-PCR法にてVEGF mRNA発現量を調べた。使用したkinase inhibitorはPKA阻害剤(H-89)、PKC阻害剤(Bisindolylmaleinide)、PI3阻害剤(LY294002)、ERK経路阻害剤(U0126)、p38阻害剤(SB203580)、JNK阻害剤(SP600125)であった。

(結果)

1. PGE<sub>2</sub>及びEP2レセプター刺激によってVEGF<sub>165</sub>産生の有意な亢進が認められた。
2. H-89 およびBisindolylmaleinideはPGE<sub>2</sub>刺激によるVEGF<sub>165</sub>産生に影響を与えなかったが、LY294002、U0126、SB203580、SP600125添加によってその発現抑制が認められた。

(結論)

歯根膜細胞においてPGE<sub>2</sub>はEP2レセプターを介してVEGF<sub>165</sub>産生に関与していることが示唆された。一般的にEP2はGs蛋白質と共役して細胞内cAMPレベルを上昇させprotein kinase Aを活性化することが明らかとなっているが、今回の結果から歯根膜細胞においては、VEGF<sub>165</sub>産生にcAMP経路は関与せず、MAPK経路およびPI3経路が関与している可能性が示唆された。

*Tannerella forsythensis* レスポンスレギュレーター変異株のプロテオーム解析愛知学院大学歯学部<sup>1</sup>歯内治療学講座<sup>2</sup>微生物学講座○丹羽大介<sup>1,2</sup> 西川 清<sup>2</sup> 中村 洋<sup>1</sup>Proteomic Analysis of a Response Regulator Mutant of *Tannerella forsythensis*Departments of <sup>1</sup>Endodontics and <sup>2</sup>Microbiology, School of Dentistry,

Aichi-Gakuin University, Nagoya, Japan

○Daisuke Niwa<sup>1,2</sup>, Kiyoshi Nishikawa<sup>2</sup>, Hiroshi Nakamura<sup>1</sup>

**【目的】** *Tannerella forsythensis* (Tf) は、*Porphyromonas gingivalis* (Pg) や *Treponema denticola* と並び、歯周炎や根尖病変に深く関与するグラム陰性偏性嫌気性桿菌として重要視されている。多くの病原細菌は環境応答型シグナル伝達機構である二成分制御系 (TCS) を有し、様々な環境シグナルを感知して病原因子の発現を調節していることが解ってきた。Tf 菌標準株のゲノム中にも TCS レギュレーターをコードすると予想される遺伝子が少なくとも 15 個存在するが、いずれも未解析のままである。本研究では、このうちセンサー・レギュレーター融合型の TF0022 に着目し、親株と変異株のプロテオーム比較解析で発現量が変動するタンパク質を同定することによって、Tf 菌の環境適応や病原性発現への同 TCS の役割を明らかにすることを目的とした。

**【方法】**

**培養条件:** 標準株 ATCC43037 の血液寒天平板上での培養は、5% ウサギ溶血血液、2.5 μg/ml Hemin、5 μg/ml Menadion、0.01% Dithiothreitol (DTT) および 50 μg/ml *N*-Acetylmuramic acid を添加した Brucella HK agar を用い、37°C 嫌気条件下で行った。また液体培養は 0.25% Yeast extract、2.5 μg/ml Hemin、5 μg/ml Menadion、0.01% DTT、250 μg/ml *N*-Acetylmuramic acid と 2.5% (v/v) Fildes extract を添加した Trypticase soy broth を使用した。

**変異株作製:** Pg 菌で標準的に用いられる挿入変異株作製法を応用した。大腸菌プラスミドにクローン化された TF0022 遺伝子中央付近の制限酵素部位にエリスロマイシン耐性遺伝子カセット (Emr) を挿入し、標準株にエレクトロポレーション法にて導入した。相同組換えにより生じた挿入変異株の選択には 1 μg/ml エリスロマイシン添加血液寒天平板を用いた。TF0022 遺伝子座における Emr 挿入の確認は、ゲノムを鋳型とした PCR とサザンブロット解析を併用した。

**増殖曲線:** 親株と TF0022 変異株の前培養液の濁度 (OD<sub>600</sub>) を 1.0 に調整し、それらを 100 倍希釈した培地 3ml を 3 本ずつ作製して、嫌気条件下 37°C にて培養した。濁度測定は培養開始から 24 時間毎に行い、増殖曲線を作成した。

**二次元電気泳動:** 親株と TF0022 変異株を液体培養し、濁度を 1.0 に合わせた培養液 10 ml 由来の菌体を 10% Trichloroacetic acid (TCA) 処理した。ジエチルエーテルで 2 回洗浄後の乾燥菌体を Cell Lysis Solution (420mg/ml Urea、152mg/ml Thiourea、80mg/ml CHAPS、1mM EDTA、0.2% Tributyl phosphine、40mM Tris-HCl、pH 8.0) に溶解し、Ettan IPGphor II (GE) を用いて等電点電気泳動を行った。更に SDS-12%ポリアクリルアミドゲルで二次元に展開後 CBB 染色し、得られたタンパク質スポットを画像解析した。

**質量分析:** 染色されたスポットをゲルから切り出し、トリブチン処理後ペプチド抽出を行った。解析は 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (ABI) を用いて行った。

**RT-PCR:** 産生量に変動が認められたタンパク質をコードする遺伝子に特異的なプライマーセットを設計し、RiboPure kit (Ambion) を用いて抽出した全 RNA を鋳型に、半定量的 RT-PCR 解析を行った。

**【結果・考察】** TF0022 遺伝子座への Emr カセット挿入は、ゲノム PCR とサザンブロット両解析で確認できた。このことより Pg 菌で標準的に用いられている挿入変異株作製法は Tf 菌にも応用できることがわかった。液体培地における変異株の増殖速度は、親株よりも約 1 日の遅延傾向が認められた。この結果から TF0022 が菌の増殖に関連する遺伝子の発現調節に、直接または間接的に関与している可能性が示唆された。二次元電気泳動解析の結果、変異株で産生量が明らかに減少した蛋白質が少なくとも 1 つ (TF2441)、増大した蛋白質は少なくとも 4 つ (TF0157、TF0038、TF0985、TF2730) 見出された。これらの蛋白質の転写レベルでの発現変動を RT-PCR で解析した結果、変異株において TF2441 の減少が認められ、逆に TF0038 では増加が認められた。それ以外の 3 つの遺伝子では転写レベルでの明瞭な変化は認められなかった。この結果から、標準的な液体培養条件下において TF0022 は正負両方向のレギュレーターとして機能していると推測された。

### MTA はヒト歯根膜細胞の BMP2 発現を誘導する

<sup>1)</sup>九州大学病院歯内治療科、<sup>2)</sup>九州大学大学院歯内疾患制御学研究分野、<sup>3)</sup>University of Adelaide, Colgate Australian Clinical Dental Research Centre

○前田英史<sup>1)</sup>、友清淳<sup>1)</sup>、藤井慎介<sup>1)</sup>、島一也<sup>1)</sup>、中野嗣久<sup>2)</sup>、和田尚久<sup>3)</sup>、門野内聡<sup>2)</sup>、堀清美<sup>2)</sup>、赤峰昭文<sup>1) 2)</sup>

#### MTA induces BMP2 expression in human periodontal ligament cells

Kyushu University Hospital, Kyushu University Faculty of Dental Science, University of Adelaide  
Hidefumi Maeda, Atsushi Tomokiyo, Shinsuke Fujii, Kazuya Shima, Tsuguhisa Nakano, Naohisa Wada, Satoshi Monnouchi, Kiyomi Hori, and Akifumi Akamine

**研究目的：** 歯内治療用材料として開発された Mineral Trioxide Aggregate (MTA)は、我国では昨年直接覆髄への臨床応用が認可されたが、欧米では根管充填材、髄床底または根管穿孔部の封鎖して逆充填材としても利用されている。また動物実験を用いた根尖部や歯根穿孔部への応用例では、その表層がセメント質によって覆われることが報告されている。私達は第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会において、MTA にはヒト歯根膜細胞を骨芽細胞様細胞へと分化を誘導する働きがあり、それには MTA から溶出するカルシウムが関与している可能性があることを報告した。そこで本研究では、MTA がこのような分化を誘導するメカニズムについて、さらに詳細に検討することを目的として実験を行った。

**材料および方法：** 矯正治療を目的として九州大学病院を受診した 22 歳女性および 14 歳男性より抜去した健康な小臼歯の歯根膜組織を採取し、3-4 継代培養後の細胞をヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF-2H または HPLF-2I) として本研究に用いた。MTA (DENTSPLY Tulsa Dental, Johnson City, TN) は、粉 3 に対し滅菌蒸留水 1 の割合で混和した後、直径 9mm 厚さ 1mm のディスク状の型に填入し湿度 100%、37° C に 12 時間放置した。各々の HPLF を 10% FBS 含有  $\alpha$ MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 中に分散し 24 穴プレート上に播種した後、硬化した MTA ディスクを底面に静置し約 2 週間共培養した。その後、real time PCR (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いた遺伝子発現解析と抗ヒト BMP2 抗体を用いた免疫細胞化学的染色法によって解析を行った。また各々の HPLF を CaCl<sub>2</sub> または MgCl<sub>2</sub> 存在下で 3 日間培養した後、同様に real time PCR を用いて解析した。さらに CaCl<sub>2</sub> 存在下で HPLF を 4 週間培養し、von Kossa 染色を行った。

**結果：** MTA と共培養した HPLF は、2H ならびに 2I ともに培養 2 週間後には BMP2 の発現が上昇しており、免疫染色後の結果、MTA 周囲に集簇した細胞が BMP2 を強く発現していた 5mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で培養した HPLF では、いずれも BMP2 の発現量の上昇が認められたが、5mM MgCl<sub>2</sub> 存在下で培養した HPLF では、無添加のコントロール群とほぼ同程度で BMP2 の発現量の増加は観察されなかった。さらに HPLF は BMP2 レセプターである BMPR-IA ならびに BMPR-II を発現していたが、BMPR-IB に関しては発現が認められなかった。また 4 週間の CaCl<sub>2</sub> 刺激により、HPLF の石灰化が誘導された。

**考察：** MTA から溶出するカルシウムがヒト歯根膜細胞に働き、BMP2 発現を誘導し、分泌された BMP2 が autocrine または paracrine 的に BMP2 のレセプターを発現している歯根膜細胞に働くことによって、骨関連タンパクの発現を促進し、結果として骨芽細胞様細胞への分化を進めた可能性が示唆された。

## 培養ヒト歯根膜細胞におけるプロテアーゼ受容体 PARs (protease-activated receptors) の発現について

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座<sup>1)</sup> 口腔分子薬理学講座<sup>2)</sup>

○室町 幸一郎<sup>1)</sup>、神尾 直人<sup>1)</sup>、橋爪 英城<sup>1)</sup>、山浦 賀弘<sup>1)</sup>、  
中尾 寿美<sup>2)</sup>、松島 潔<sup>1)</sup>

### The expression of PARs (protease-activated receptors) in human periodontal ligament cells

Department of Endodontics<sup>1)</sup>, Oral Molecular Pharmacology<sup>2)</sup> Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
Kouichiro MUROMACHI<sup>1)</sup>, Naoto KAMIO<sup>1)</sup>, Hideki HAHSIZUME<sup>1)</sup>, Yasuhiro YAMAURA<sup>1)</sup>, Sumi NAKAO<sup>2)</sup>,  
Kiyoshi MATSUSHIMA<sup>1)</sup>

#### 【目的】

細胞膜には様々なプロテアーゼ受容体 (Protease-activated receptors : PARs) が存在し、種々の生理学的、病態生理学的役割を担っていることから、新しい治療のターゲット分子になり得ると考えられている。そのため PARs に対する選択的なアゴニストやアンタゴニストの開発は様々な臨床応用への可能性を秘めている。演者らは第 126・128 回歯科保存学会において、PAR-1 がヒト歯髄線維芽細胞において恒常的に発現し、PAR-1 アゴニストや細胞外マトリクスの破壊に関与するプラスミンによって活性化すると細胞内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)が上昇し、ひいては PGE2 や IL-8 の遊離を引き起こし歯髄炎の進展に関与することを示唆した。一方、歯髄炎の継発症である根尖性歯周炎が発症する歯根膜組織における PARs の動態についての報告はなく、それらの組織と歯髄組織の差異を比較することは各々の病態を解明する上で極めて重要である。そこで演者らは、根尖周囲組織の炎症にヒト歯根膜線維芽細胞 (Human Periodontal Ligament Cells: HPLC) の PARs が関与するものと仮定し、HPLC における PARs の分布を確認し、各種 PARs アゴニストを作用させた際に起こる [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の動態を調べることによって、HPLC における PARs の活性化調節機能を検索した。

#### 【材料および方法】

1. HPLC の培養：矯正治療目的 (病的原因以外) で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された歯の歯根中央部より歯根膜を分離した後、Somerman らの方法によって培養シャーレに静置し、アウトグロースした細胞を歯髄線維芽細胞として実験に用いた。
2. PARs の発現：HPLC における PAR1~4 mRNA の発現を RT-PCR 法にて観察した。
3. PARs の活性化調節機能：蛍光色素 Fura-2 を用い、2 波長蛍光測定法によって HPLC 内における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 動態を測定した。

#### 【結果】

1. HPLC において、PAR-1、2、4 の発現を認めた。
2. 10nM α-トロンビン、PAR-1 アゴニストペプチド SFLLRN、PAR-2 アゴニストペプチド SLIGKV、100nM プラスミンによって、HPLC 内における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は上昇した。
3. 100nM プラスミンは HPLC における PAR-2 mRNA の発現を促進した。

#### 【考察】

HPLC には PAR-1、2、4 が恒常的に発現しており、細胞の活性化調節には PAR-1 と PAR-2 が関与していることが明らかになった。またプラスミンは活性化調節に関与するだけでなく、細胞膜における PAR-2 の発現調節を行っていることも示唆された。PAR1 や PAR2 はサイトカイン遊離促進プロスタノイドの遊離などの炎症促進作用を有する事が報告されている。すなわち PAR1 や PAR2 選択的アンタゴニストの開発は、根尖性歯周炎の治療の創薬研究の指標となるものと演者らは考えている。

本研究の一部は、平成 20 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) No. 19592212) により行いました。

## テオフィリンはラット歯髄刺激に対する海馬血流増加反応を抑制する

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

兵庫医科大学医系物理化学教室\*

○長谷川誠実、秦 順一\*、阿部徹也、本田公亮、清水明彦

**Theophylline Attenuates Hippocampal Blood Flow Responses Induced by Dental Pulp Stimulation in Rats**

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

Department of Medical Physics and Chemistry, Hyogo College of Medicine\*

HASEGAWA Makoto, HADA Junichi\*, ABE Tetsuya, HONDA Kousuke and SHIMIZU Akihiko

【緒言】 日常の臨床において、歯科治療に対する異常な恐怖心を有する患者にしばしば遭遇する。これは、歯科治療中の急激な疼痛が、中枢性に強い反応を呈することで、歯科治療と痛みが一つの記憶となり定着することによると考えている。そして、まず、歯髄刺激により記憶に関与する海馬の活動が惹起されるかどうかについて、第 126 回本学会において報告した。その結果、歯髄刺激により海馬血流増加反応が生じたこと、また、その反応が cyclooxygenase-2 阻害剤であるエトドラクにより抑制されることが明らかとなった。一方、坐骨神経刺激により大脳皮質血流が増加する報告があり、その増加反応はアデノシンによる血管拡張作用によるとされている (Nagai et al. Effect of sciatic nerve stimulation on pial arterioles in rats., Am. J. Physiol., 254, p133-139, 1988.)。そこで、今回は、歯髄刺激による海馬血流増加反応のメカニズムに焦点を当て、まず血流増加反応に関わる脳内生理活性物質としてアデノシンに着目した。本研究は、アデノシンの非選択的拮抗薬であるテオフィリンを用いて、アデノシンが歯髄刺激時の海馬血流増加反応に関与するのかどうかを検討した。

【材料と方法】 実験には、雄性ウィスター系ラット 10 匹 (9~11 週齢、300~320 g) を用いた。ラットに、20% ウレタン (1.2 g/kg) により全身麻酔を施した。麻酔奏効確認後、下顎切歯に象牙質に至る窩洞を形成し、導電性ペーストと電極固定用即時重合レジンを用いて直径 0.3 mm の銀線電極を固定し、歯根膜内に直径 20  $\mu$ m のステンレス針電極を挿入し歯髄刺激電極とした。その後、ラットを脳定位固定装置に固定し、レーザー血流測定用プローブを、ラットの左側海馬内に挿入した。そのプローブは、レーザー血流計に、歯牙の電極は電気刺激装置に接続した。電気刺激としては、duration 500  $\mu$ s の pulse を interval 10 ms で 10 s 間、歯髄に与えた。刺激強度は、海馬血流増加反応を生じる閾値の、3 および 5 倍とした。テオフィリン群は、腹腔内にテオフィリン 20 mg/kg (n = 5) を投与した。対照群は、テオフィリン投与量と同量の生理食塩水 (n = 5) を投与した。そして、歯髄電気刺激時の海馬血流をサーマルアレイレコーダーで記録した。テオフィリン投与前と投与後 30 分から 60 分の間に記録された海馬血流反応を分析の対象とした。海馬血流反応は、歯髄刺激直前の血流量を基準として増加量を % で評価し、テオフィリン群および対照群について、それぞれ投与前後で比較検討した。統計学的処理は、Student の t 検定を用いて行った。

【結果】 海馬血流は、歯髄刺激に対しては増加反応を示した。歯髄刺激強度が閾値の 3 倍の場合、対照群では、生理食塩水投与前増加率  $8.1 \pm 3.8\%$  に対して投与後  $8.6 \pm 4.4\%$  であった。テオフィリン群では、 $10.5 \pm 3.2\%$  に対して投与後 30 分から 60 分では  $4.3 \pm 1.1\%$  であった。刺激強度が閾値の 5 倍の場合、対照群では、投与前  $10.0 \pm 2.4\%$  に対して投与後  $10.5 \pm 2.5\%$  であった。テオフィリン群では、投与前  $11.1 \pm 2.7\%$  に対して投与後 30 分から 60 分で  $4.7 \pm 1.4\%$  であった。刺激強度が閾値の 3 倍も 5 倍もともに、対照群では、生理食塩水投与前後で、海馬血流の増加率に差を認めなかったが、テオフィリン群では、投与前後で海馬血流増加率は有意 ( $p < 0.01$ ) に減少することが示された。

【考察】 歯髄の電気刺激により生じる海馬血流増加反応は、アデノシンの非選択的拮抗薬であるテオフィリンの投与により、有意に抑制された。このことから、歯髄刺激により生じる海馬の血流増加反応にアデノシンが関わっていることが明らかである。ただ、アデノシンの作用をブロックしても、血流増加反応の抑制は完全ではなく、約 1/2 程度であった。これは、海馬血流増加反応に関わる生理活性物質としてアデノシン以外、例えば prostaglandin E2 や一酸化窒素等が考えられる。これら、様々な生理活性物質と歯髄刺激による海馬血流増加反応の関係は今後解決されるべき課題である。

## 歯髄の mustard oil 刺激により誘発されたラット脳幹における p38MAPK 及び GFAP のアップレギュレーション

1 東京医科歯科大学歯学部附属病院 総合診療科 クリーンルーム歯科外来

2 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

○砂川光宏<sup>1,2</sup>, 金子友厚<sup>2</sup>, 金子実弘<sup>2</sup>, 須田英明<sup>2</sup>

### p38MAPK and GFAP are Upregulated in the Rat Brain-stem by Mustard Oil Tooth Pulp Stimulation

1 Clean Room, University Hospital, Faculty of Dentistry, 2 Pulp Biology and Endodontics,

Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○SUNAKAWA Mitsuhiro<sup>1,2</sup>, KANEKO Tomoatsu<sup>2</sup>, KANEKO Mitsuhiro<sup>2</sup>, SUDA Hideaki<sup>2</sup>

**【目的】** p38MAPK は、中枢神経系においては neuron や glia 細胞において発現し、外因性ストレスに対する細胞応答過程と同時に侵害刺激受容過程においても重要な役割を担っていることが報告されている。また、最近の研究によれば、glia 細胞の中で microglia と astrocyte が中枢性感作の成立に中心的役割を演じていることも報告されている。本研究においては、allyl isothiocyanate (mustard oil, MO) 歯髄刺激により誘発された歯髄神経の興奮と刺激直後の脳幹 glia 細胞の活性化との関係を明らかにすることを目的として動物実験を行った。

**【方法】** pentobarbital sodium にて麻酔したSD系雄性ラット(体重: 300g; 9-10W)を実験動物として用い、左側上顎第一臼歯に点状露髄を示す小窩洞を形成した。歯髄神経を興奮させるために、細神経興奮性物質かつ起炎性物質である MO (0.5  $\mu$ l) を滅菌ペーパーポイントの薄片に浸漬させ、この窩洞内に適用した。その後、動物を 10, 20, 30 及び 60 分後に断頭屠殺し(各群 n=3)、両側の三叉神経脊髄路核[中間亜核/尾側亜核 (Vi/Vc) 境界部]組織および視床組織の標本を摘出、それぞれ mRNA 保存液中に浸漬した。これらの標本から mRNA 抽出を行い、p38MAPK 及び astrocyte のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) を対象とした RT-PCR 法による分析を実施した。なお、MO による歯髄化学刺激の対照として、非窩洞形成動物(n=3)及び mineral oil (Min) を上記と同様の方法で歯髄に適用した群(n=3)をそれぞれ用いた。また、2% lidocaine 溶液により局所麻酔を施した後に MO を歯髄適用した動物(LC)群(n=3)においても p38MAPK 及び GFAP mRNA の抽出を試みた。

**【結果】** p38MAPK の mRNA 発現は、同側の Vi/Vc 境界部において MO 歯髄刺激後 10 分から認められ、MO 適用後 60 分までその発現は上昇した。反対側 Vi/Vc 境界部では mRNA の上昇は認められなかった。また、視床においては、対側では MO 歯髄刺激後 10 分から認められ、MO 適用後 60 分までその発現は上昇したが、刺激と同側ではその発現の上昇は確認されなかった。MO 歯髄適用の対照とした非窩洞形成動物においては、p38MAPKmRNA の発現の上昇は認められなかった。Min 歯髄適用群、及び LC 群の化学物質歯髄適用 60 分後においては、p38MAPKmRNA の発現の上昇は認められたものの、その発現は MO 群に比べて明らかに少なかった。GFAPmRNA の発現に関しても同様の結果が得られた。

**【考察】** これまで脊髄後角における侵害受容機構において、ATP 受容体や Glutamate の NMDA 受容体の関与する中枢性感作や神経因性疼痛の発症、特に allodynia の発現において、活性化型 astrocyte や microglia など glia 細胞の関与が報告されている。しかし、三叉神経系、特に実験的に歯髄炎を誘発し、その際に生ずる歯髄内細神経線維の興奮により中枢神経系において GFAP や p38MAPK の mRNA 発現が上昇することはこれまでに報告されておらず、本研究において MO 歯髄刺激後 10 分という短時間経過時にこれらの mRNA の発現が上昇したことは、歯髄疾患に伴い観察される頭頸部の慢性疼痛の発症機構を考慮する上で重要な実験的事実であると考えられる。p38MAPK は microglia のみならず neuron にも発現が認められており、今回の実験で microglia の活性化を特異的に観察したとは言い難いが、急性症状を伴う歯髄炎時に中枢神経系において neuron のみならず glia 細胞も活性化され、neuron-glia 相互作用が生じている可能性が示唆された。また、lidocaine の局所投与で MO 歯髄刺激による中枢神経系の細胞の活性化を抑制できる可能性が示され、このことは局所麻酔薬使用の臨床上的重要性を示唆している。

**【結論】** MO 刺激による実験的歯髄炎誘発ラットにおいて、歯髄神経投射系脳幹内の p38MAPK 及び GFAP の mRNA 発現上昇が歯髄刺激後短時間内に生ずること、また局所麻酔薬注射によりその上昇を抑制できる可能性が確認された。

乳歯由来歯髄細胞は血管新生・神経再生を促進する

1. 国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部
2. 名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座顎顔面外科学
3. 名古屋大学医学部附属病院 遺伝子・再生医療センター
4. 愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座

庵原 耕一郎<sup>1</sup>, 杉山 昌彦<sup>1,2</sup>, 中村 さやか<sup>2</sup>, 山田 陽一<sup>3</sup>, 上田 実<sup>2</sup>, 松下 健二<sup>1</sup>, 中村 洋<sup>4</sup>, 中島 美砂子<sup>1</sup>

Pulp Cells from Deciduous Teeth induce Vasculogenesis and Neurogenesis

1. Laboratory of Oral Disease Research, National Institute for Longevity Science
2. Department of Oral Maxillofacial Surgery/ Protective Care for Masticatory Disorders, Nagoya University Graduate School of Medicine
3. Center for Genetic and Regenerative Medicine, Nagoya University School of Medicine
4. Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
Koichiro Iohara, Masahiko Sugiyama, Sayaka Nakamura, Youichi Yamada, Minoru Ueda,  
Kenji Matsushita, Hiroshi Nakamura, Misako Nakashima

【研究目的】

これまで私たちは、ブタ歯髄幹細胞を用いて血管・神経再生を含む歯髄再生に成功した。しかし、臨床応用を行うためにはヒトの歯髄幹細胞の解析を行う必要がある。歯髄幹細胞の供給源としては、智歯、矯正学的便宜抜去歯および乳歯が考えられる。特に乳歯は永久歯に生え代わる時に脱落し廃棄されるため、人体に侵襲を加えず、また倫理的にも問題なく入手できる。一方、歯髄を再生するには歯髄固有組織と同時に血管や神経を再生させる必要がある。よって、本研究では、ヒト乳歯由来歯髄細胞の歯髄再生の細胞源としての有効性を明らかにすることを目的として、マウス下肢虚血モデルおよびラット脳梗塞モデルに乳歯歯髄細胞を移植し、血管新生能および神経再生能を検索した。

【材料と方法】

1. ヒト乳歯および永久歯歯髄より歯髄細胞を酵素分離後、培養
2. フローサイトメトリーによるヒト乳歯および永久歯歯髄細胞の表現型の解析 (CD24, CD31, CD34, CD105, CD133, CD150)
3. 乳歯細胞の幹細胞としての性質の解析 (自己複製能、多分化能)
4. *in vitro* における血管誘導、神経誘導能の解析  
血管誘導 (matrigel 上に播種)、神経誘導 (neurosphere 形成後、ゼラチンコート dish に播種)
5. *in vivo* における血管新生能および神経再生能の解析  
(1) マウス下肢虚血モデルにおける血管新生能の検索  
下肢虚血 24 時間後、乳歯歯髄細胞を移植し、一週間後解析を行った。
  - A. レーザードップラー画像解析による血流回復の検討
  - B. 連続切片の免疫組織学的解析(BS1-lectin)  
(2) ラット脳梗塞モデルにおける神経再生能の検索  
脳梗塞モデルを作成後、24 時間後頭蓋より  $1 \times 10^6$  個の細胞を線条体に移植し、一週間後解析を行った。
  - A. 運動麻痺スコアによる行動機能解析
  - B. 連続切片の免疫組織学的解析(GFAP, NeuN, Neurofilament)

【結果】

乳歯歯髄細胞は永久歯歯髄細胞に比べ、CD105 および CD150 を強く発現しており、未分化な幹細胞が多く含まれていることが示唆された。また、乳歯歯髄細胞は自己複製能を有し、血管誘導や神経誘導を含む多分化能を有していた。さらに、乳歯歯髄細胞をマウス下肢虚血部に移植すると血流回復ならびに血管新生促進がみられ、ラット脳梗塞モデルに移植すると神経再生を促進した。

【考察】

ヒト乳歯由来歯髄細胞は、高い血管新生能および神経再生能を有したことから、細胞導入法による歯髄再生の細胞源として有効である可能性が示唆された。

## ヒト乳歯歯髄由来幹細胞の特性の検討

<sup>1)</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野, <sup>2)</sup>名古屋大学医学部附属病院 遺伝子・再生医療センター, <sup>3)</sup>名古屋大学医学部 臨床細胞治療学講座

○中村さやか<sup>1)</sup>, 山田陽一<sup>2)</sup>, 片桐渉<sup>1)</sup>, 杉戸孝行<sup>1)</sup>, 伊藤憲治<sup>3)</sup>, 上田実<sup>1)</sup>

### Characterization of human deciduous tooth dental pulp stem cells

<sup>1)</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery Nagoya University Graduate School of Medicine,

<sup>2)</sup>Center for Genetic and Regenerative Medicine Nagoya University School of Medicine,

<sup>3)</sup>Department of Clinical Cell Therapy and Tissue Engineering Nagoya University School of Medicine

○Sayaka Nakamura<sup>1)</sup>, Yoichi Yamada<sup>2)</sup>, Wataru Katagiri<sup>1)</sup>, Takayuki Sugito<sup>1)</sup>, Kenji Ito<sup>3)</sup> and Minoru Ueda<sup>1)</sup>

#### [研究目的]

近年、再生医療は失われた組織、臓器に対する治療法として注目を集め、臓器ドナー不足等の問題を抱えている移植治療に代替する医療として、めざましい発展の一途をたどっている。再生医療の三要素の一つである“細胞”に関しては、ヒト ES 細胞や iPS 細胞が樹立され、究極の万能細胞として期待されているが、社会的、倫理的、安全性の問題があり、臨床への実用化は厳しいのが現状である。現在は、骨髄や臍帯血などが細胞供給源として用いられている。しかし、骨髄は加齢に伴い幹細胞数が減少することや、骨髄穿刺が患者への負担となること、症例によっては採取できないこと等の問題を抱えている。また、臍帯血に関しては、間葉系幹細胞の存在頻度が低いことや、分娩から細胞採取までの時間や臍帯血量により影響を受けやすいことから、効率や確実性に問題がある。そこで、我々は幹細胞の存在が報告されている歯髄、中でもこれまで脱落后廃棄されてきた乳歯の歯髄に注目し、再生医療における幹細胞供給源としての可能性について検討を行った。

#### [材料および方法]

##### 1. ヒト乳歯および永久歯歯髄細胞の培養

ヒト抜去乳歯および永久歯より歯髄組織を採取後、酵素処理にて歯髄由来細胞を単離し、20%FBS 含有 D-MEM 培地にて培養した。

##### 2. 増殖能の検討

BrdU 細胞増殖アッセイにより、乳歯歯髄細胞および永久歯歯髄細胞の増殖能を比較検討した。

##### 3. 幹細胞マーカーの発現の解析

乳歯歯髄細胞および永久歯歯髄細胞を用いて、フローサイトメトリーにて、CD13, CD29, CD44, CD73, CD14, CD45 等の幹細胞表面マーカーの発現について、比較検討した。また、同細胞を用いて、STRO-1 の免疫染色を行った。

##### 4. 骨・象牙質および脂肪分化能の検討

歯髄細胞を骨芽細胞分化誘導培地にて培養後、アリザリンレッド染色を行った。さらに、骨分化誘導後経時的に RNA を抽出し、骨芽細胞特異的遺伝子および象牙質特異的遺伝子の発現について、定量的 PCR 法を用いて比較検討した。

また、歯髄細胞を脂肪細胞分化誘導培地にて培養後、oil red o 染色を行った。

#### [結果]

乳歯歯髄細胞は、永久歯歯髄細胞と比較して、増殖能が高い傾向が示された。また、免疫染色により STRO-1 発現が確認された。さらに、フローサイトメトリー分析では、乳歯歯髄細胞は永久歯歯髄細胞と同様に CD13, CD29, CD44, CD73 等の間葉系幹細胞マーカーの発現が認められたのに対し、CD14, CD45 等の造血系幹細胞マーカーの発現はほとんど認められなかった。また、乳歯歯髄細胞は骨芽細胞分化誘導によりアリザリンレッド染色は陽性を示し、骨芽細胞および象牙質細胞特異的遺伝子の発現が認められた。脂肪細胞分化誘導においては、乳歯歯髄細胞では脂肪滴の形成が確認されたが、永久歯歯髄細胞では脂肪滴は認められなかった。

#### [考察および結論]

乳歯由来歯髄細胞は、間葉系幹細胞特異的な表面抗原を発現しており、骨系および脂肪への多分化能を有することから、永久歯歯髄同様に幹細胞特性を有することが示された。また、乳歯歯髄細胞は永久歯歯髄細胞と比較して増殖能が高いことから、より未分化な細胞群に富んでいると考えられる。乳歯に含まれるこれらの幹細胞は非侵襲的に容易に採取可能であり、倫理上の問題も少なく安全性が高いという利点があることから、再生医療にとって将来有望な細胞源になり得ることが示唆された。

## ヒト歯髄細胞における細胞外Ca<sup>2+</sup>刺激による bone morphogenetic protein-2 発現誘導

東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座 歯内歯周治療学分野  
○ 濱地 希 金谷 聡介 根本 英二 島内 英俊

**Elevated extracellular Ca<sup>2+</sup> induces bone morphogenetic protein-2 in human cells.**  
Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry,  
Sendai, Japan  
○ Nozomu Hamaji, Sousuke Kanaya, Eiji Nemoto and Hidetosi Shimauchi

### 【研究目的】

歯髄細胞中には自己再生および多種の細胞へ分化する能力を有する歯髄幹細胞が存在することが知られている。同細胞には、Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 および BMP-4 により象牙芽細胞に分化して象牙質を形成し、歯髄の創傷治癒が促進されることが報告されている。我々はこれまでにマウスセメント芽細胞において細胞外カルシウムは細胞膜上の G タンパク受容体を介して *Fibroblast growth factor (FGF)-2* 遺伝子の発現を誘導する作用があることを報告してきた (第 51 回春季日本歯周病学会学術大会 および 第 86 回 IADR 学術大会)。一方、水酸化カルシウムは、その作用機序には不明な点が多く存在するものの、歯髄における修復象牙質の形成を促し治癒に導くことから臨床で広く用いられている。そこで我々は歯髄細胞が硬組織形成能を獲得する機序として細胞外カルシウムが大きく関与しているのではないかと考えた。本研究では、ヒト歯髄細胞培養系を用いて細胞外 Ca<sup>2+</sup> 刺激によるヒト歯髄細胞の成長因子産生誘導の可能性について検討した。

### 【材料および方法】

細胞：インフォームドコンセントを行った患者の抜去歯から得た歯髄細胞を用いた。歯の表面を 1% ペニシリン PBS で洗った後、タービンにて全周に歯髄に達しない切れ込みを入れ、次いでヘーベルを用いて分割して歯髄組織を注意深く取り出した後、35-mm 細胞培養ディッシュにて培養した。10% FBS 添加  $\alpha$ -MEM 培地にて継代培養を行い、コンフルエントになった細胞を実験に供した。

Ca<sup>2+</sup>刺激：歯髄細胞を 4 時間血清飢餓状態で培養した後、 $\alpha$ -MEM 培地に CaCl<sub>2</sub> を添加することで細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度 (1.8mM-10mM) を調節し、48 時間まで刺激培養を行った。

遺伝子発現：BMP-2、FGF-2、PDGF-B mRNA 発現は SYBR グリーンを用いたリアルタイム RT-PCR 法 (Bio Rad) にて解析した。

阻害剤：Protein Kinase C (PKC) に対する阻害剤である U73122 存在下で 1 時間培養した後、Ca<sup>2+</sup> 刺激を 6 時間行い BMP-2 mRNA の発現を解析した。

### 【成績】

1. ヒト歯髄細胞を Ca<sup>2+</sup> で刺激したところ、6 時間において Ca<sup>2+</sup> 10 mM をピークとして BMP2 mRNA の強い発現誘導がみられた。
2. ヒト歯髄細胞を Ca<sup>2+</sup> で刺激したところ、刺激後 24 時間をピークとして BMP2 mRNA の強い発現誘導がみられた。しかし、その他の成長因子 (FGF-2, PDGF-B) の著明な誘導はみられなかった。
3. Ca<sup>2+</sup> による BMP-2 mRNA の発現誘導は PKC に対する阻害剤である U73122 前処理により抑制がみられた。

### 【結論】

歯髄細胞は高濃度細胞外 Ca<sup>2+</sup> により、BMP-2 mRNA の発現を誘導することが明らかとなった。また、そのシグナル伝達には PKC が関与していることが明らかとなった。これらのことから、歯髄細胞は高濃度細胞外 Ca<sup>2+</sup> の環境下においては、その誘導される BMP-2 により硬組織形成細胞へ分化する可能性が示唆された。

### 【考察】

本研究で得られた結果は歯髄細胞の分化機序の仕組みを解明する上で重要な所見であり、今後、その誘導機序の詳細および受容体を同定することは新たな歯髄組織再生療法の実施戦略を確立する上で非常に有用と考えられる。

## ヒト歯髄培養細胞における酸化ストレスからのアポトーシス誘導

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

○松井 智、高橋知多香、高瀬俊彦、辻本恭久、松島 潔

### Induction of apoptosis from oxidant stress in human dental pulp cells

Depts. of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Matsui Satoshi, Takahashi Chitaka, Tsujimoto Toshihiko Takase, Yasuhisa and Matsushima Kiyoshi

#### 緒言

活性酸素から生じたフリーラジカルは、直接 DNA 損傷を引き起こすと考えられている。DNA 損傷を受けた細胞は、細胞周期を一時的に停止させて修復が行われるが、修復できない損傷を持つ細胞は、様々なシグナル伝達を介したアポトーシスといった細胞死に陥る。アポトーシスは、遺伝的に制御された細胞の自殺であり、生体の正常な発育、ホメオスタシスの維持、不必要な細胞の排除において重要な役割を果たしている。アポトーシスには、二つの経路が存在し、一つ目は、ミトコンドリアを中心とした内因性経路でありカスパーゼ 9 を経てカスパーゼ 3 を活性化させる。二つ目は、細胞膜上のデスレセプターを中心とした外因性経路でありカスパーゼ 8 を経てカスパーゼ 3 を活性化させる。このカスパーゼ 3 の活性がアポトーシスを惹起させる指標となっている。歯髄におけるアポトーシスの位置づけとして、歯髄炎の襲撃に対する自己防衛や石灰化との関連性が報告されているが、その経路や役割については、未だ十分に解明されていない。本研究では、歯髄細胞におけるアポトーシスの経路を明らかにする一助として、活性酸素を暴露させた歯髄細胞とアポトーシス関連因子であるカスパーゼ活性に着目し、研究を行った。

#### 材料および方法

細胞は、研究のインフォームドコンセントを十分に行って同意を得られた平均 21 歳の 3 人の患者から抜去された第 3 大臼歯の歯髄組織を、5~9 代継代させた細胞を実験に用いた。細胞がコンフルエントの状態になったところで 10, 1 mM の  $H_2O_2$  を 10 分間作用させた (10 mM  $H_2O_2$  作用群および 1 mM  $H_2O_2$  作用群)。また、 $H_2O_2$  無添加のものをコントロール群とした。

$H_2O_2$  作用後、24 時間以内の細胞におけるカスパーゼ 3, 8, 9 活性の変動を経時的に測定を行った。また、 $H_2O_2$  作用後、24 時間後の細胞数の測定を Cell counting kit を用いて測定を行った。

#### 結果および考察

$H_2O_2$  作用後、濃度に依存して 2 時間後からカスパーゼ 8 および 9 の経時的な上昇が認められ、コントロール群との間に有意差が認められた。また、カスパーゼ 3 においても 4 時間後から  $H_2O_2$  の濃度に依存して上昇が認められ、6 時間後の活性においてコントロール群との間に有意差が認められた。

以上の結果から、ヒト歯髄培養細胞におけるアポトーシスの経路には、内因性因子であるカスパーゼ 9 と外因性因子であるカスパーゼ 8 の両方の経路が関与しており、この両経路からカスパーゼ 3 が活性化され、アポトーシスが実行されることが示唆された。

本研究の一部は、平成 20 年度科学研究費補助金(若手研究(スタートアップ)) No. 19890226) より行いました。

## 抗菌ペプチド LL37 はヒト歯髄細胞の migration を促進する

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野  
加治屋幹人、柴 秀樹、藤田 剛、武田克浩、内田雄士、水野智仁、河口浩之、栗原英見

### LL37 stimulates the migration of human dental pulp cells

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University  
Graduate School of Biomedical Sciences  
Mikihito Kajiyu, Hideki Shiba, Tsuyoshi Fujita, Katsuhiko Takeda, Yuushi Uchida, Noriyoshi Mizuno,  
Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

#### 研究目的

Cathelicidin ファミリーに属する 18 kDa cationic antimicrobial protein の C 末端側は LL37 と呼ばれる。LL37 は抗菌活性や LPS 中和作用を示す。また、LL37 はヒト皮膚由来上皮細胞のマイグレーションやヒト単球の IL-1 $\beta$  の産生を促進する。この LL37 の作用は EGFR の transactivation あるいは purinergic P2x7 レセプターを介して生じる。歯髄炎に対して歯髄・象牙質の複合体を再生させるためには、細菌感染の排除、炎症の制御および宿主細胞の活性化が必要である。私たちは歯髄・象牙質の複合体の再生における LL37 の有用性を明らかにするために、LL37 が種々のう蝕原因細菌に対して抗菌活性を示すこと、(J. Antimicrob. Chemother. 2005) および LL37 が歯髄細胞において炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) の発現を抑制することを報告してきた (第 127 回日本歯科保存学会秋季大会)。本研究では、宿主細胞機能の活性化における LL37 の役割を調べるため、培養ヒト歯髄細胞のマイグレーションに及ぼす LL37 の影響を調べた。

#### 材料と方法

- 1) 歯髄細胞: インフォームドコンセントが得られた患者から矯正学的理由で便宜的に抜歯された健全な小白歯の歯髄から歯髄細胞を獲得した。10%FBS を含む DMEM を用いて継代培養し、以下の実験には 6 代継代細胞を使用した。
- 2) マイグレーション: LL37 (10  $\mu$ g/ml)、あるいは EGFR のアゴニストである HB-EGF (10 ng/ml) を 24 時間歯髄細胞に作用させた後、Wound healing assay によって評価した。
- 3) シグナル解析: EGFR の阻害剤である AG1478 (30 nM) および anti-EGFR 抗体 (10  $\mu$ g/ml)、または ERK の阻害剤である PD98059 (50  $\mu$ M)、p38 の阻害剤である SB203580 (10  $\mu$ M)、そして JNK の阻害剤である SP600125 (10  $\mu$ M) を LL37 作用の 1 時間前に添加し、マイグレーションを調べた。
- 4) リン酸化 JNK および EGFR の検出: LL37 および HB-EGF 刺激によるリン酸化 JNK および EGFR 発現を Western blot 法によって解析した。

#### 結果

- 1) LL37 はヒト歯髄細胞のマイグレーションを促進した。
- 2) HB-EGF はヒト歯髄細胞のマイグレーションを促進した。
- 3) EGFR の阻害剤である AG1478 および anti-EGFR 抗体、または JNK 阻害剤である SP600125 は LL37 によるヒト歯髄細胞のマイグレーションの促進を抑制した。ERK および p38 阻害剤はマイグレーションに影響を及ぼさなかった。
- 4) LL37 および HB-EGF は EGFR のリン酸化を促進した。さらに、LL37 および HB-EGF はリン酸化 JNK1 発現を促進したが、リン酸化 JNK2/3 発現には影響を及ぼさなかった。

#### 考察および結論

本研究から、LL37 は EGFR の活性化および JNK の活性化を介してヒト歯髄細胞の migration を促進することが明らかとなった。

LL37 は抗菌活性、炎症性サイトカイン発現の抑制および歯髄細胞機能の活性化作用を有することから、歯髄・象牙質複合体の再生を担える因子であることが示唆された。