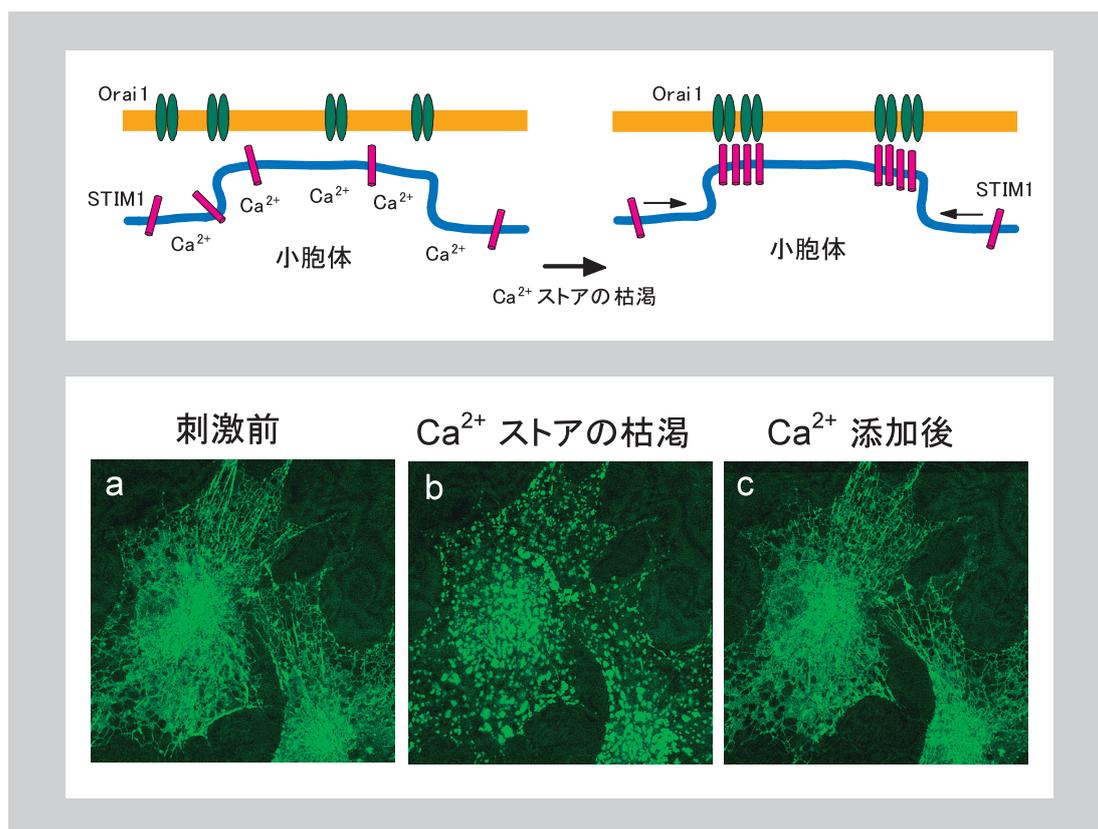


北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌
第32卷 第2号 平成25年12月



北海道医療大学歯学会役員

会 長 有 末 眞
専 務 理 事 越 智 守 生
常 任 理 事 安 彦 善 裕・齊 藤 正 人 (庶務担当)
遠 藤 一 彦・谷 村 明 彦 (会計担当)
田 隈 泰 信・坂 倉 康 則 (編集担当)
越 野 寿・入 江 一 元 (企画担当)
監 事 江 口 正 尊・東 城 庸 介

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Makoto ARISUE

Vice President : Morio OCHI

Directors : Yoshihiro ABIKO, Masato SAITO,
Kazuhiko ENDO, Akihiko TANIMURA,
Taishin TAKUMA, Yasunori SAKAKURA,
Hisashi KOSHINO, Kazuharu IRIE

Auditors : Masataka EGUCHI, Yosuke TOJYO

Editorial Board

Editor-in-Chief : Taishin TAKUMA

Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,
Yosuke TOJYO, Itaru MIZOGUCHI

Address of Editorial Board

Taishin TAKUMA

Division of Biochemistry, Department of Oral Biology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido,

Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

E-mail: takuma@hoku-iryu-u. ac. jp

Phone: + 81 133-23-2394; Fax: + 81 133-23-1391

〔総説〕

唾液腺におけるストア作動性Ca²⁺流入の活性化機構

東城 庸介

北海道医療大学歯学部人間基礎科学分野生物物理
北海道医療大学大学院歯学研究科薬理学分野Mechanism of activation of store-operated Ca²⁺ entry in salivary gland

Yosuke TOJYO

Laboratory of Biophysics, Integrated Human Sciences, School of Dentistry ; Department of Pharmacology,
Graduate School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The cellular Ca²⁺ signaling system plays a central role in secretion of water and electrolytes in salivary glands. Activation of membrane receptors linked to phospholipase C results in a release of Ca²⁺ from intracellular stores and a sustained entry of Ca²⁺ across the plasma membrane. The Ca²⁺ release is mediated by inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃), while the Ca²⁺ entry is regulated by the level of Ca²⁺ stored in the endoplasmic reticulum (ER). This Ca²⁺ entry pathway is referred

to as “capacitative Ca²⁺ entry” or “store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)”. In the past eight years, two key proteins, STIM1 and Orai1, in the molecular regulation of SOCE have been discovered. The STIM1 and Orai1 play critical roles in SOCE, as a Ca²⁺ sensor within the ER and as a store-operated Ca²⁺ channel in the plasma membrane, respectively. In this review, I summarize the historical development of the concept of SOCE.

1. はじめに

カルシウムイオン (Ca²⁺) は唾液分泌を調節する最も重要な細胞内メッセンジャーである。ムスカリン受容体やα₁アドレナリン受容体が活性化すると、細胞の内外からCa²⁺が動員され、細胞内（細胞質）のCa²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) が速やかに上昇する。[Ca²⁺]_iの上昇は2つの機序による。1つは、細胞内Ca²⁺ストア (store) と呼ばれるCa²⁺貯蔵部位（主に小胞体）からのCa²⁺の放出である。このCa²⁺放出にはイノシトールリン脂質代謝によって生成したイノシトール1,4,5三リン酸 (IP₃) がメッセンジャーとして働く。もう1つの機序は細胞外から細胞内へのCa²⁺の流入である。この2つの動員機序によって細胞内の [Ca²⁺]_iは一挙に数倍に上昇する。唾液腺細胞では、この反応が引き金になって様々なイオンチャネルやイオン輸送系が活性化し、腺房の基底側から腺腔側への水の移動（水分泌）が起きる（図1）(谷村, 東城,

2006)。

唾液腺にはCa²⁺シグナル系以外に、βアドレナリン受容体を介して活性化するcyclic AMP (cAMP) 産生系が存在する。こちらは主にアミラーゼやムチンなどのタンパク質の開口分泌を調節している。唾液腺ではCa²⁺系とcAMP系の2つの細胞内シグナル系が協同的に働くことから、唾液腺の生理機能や病態に興味を持つ研究者ばかりでなく、開口分泌の分子機構を追求する研究者、さらにはCa²⁺シグナルの生成機構に興味を持つ研究者にも、唾液腺は研究材料として広く応用されてきた。

今から30年ほど前、アメリカのNIEHS（国立環境衛生研究所）のJames W. Putneyは、非興奮性細胞におけるCa²⁺流入機構のモデルとして極めてユニークな仮説を提唱した（Putney, 1986）。Putneyはその仮説をcapacitative Ca²⁺ entry（容量性Ca²⁺流入）と名付けたが、現在ではstore-operated Ca²⁺ entry (SOCE)（ストア作動性Ca²⁺流

受付：平成25年9月30日

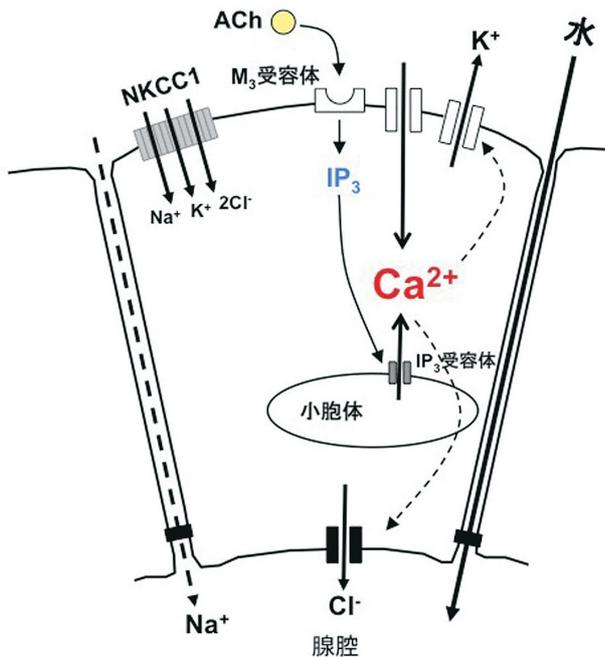


図1. 唾液腺における水分分泌の情報伝達機構. ACh, アセチルコリン; M₃受容体, M₃アセチルコリン受容体; IP₃, イノシトール1,4,5-三リン酸; NKCC1, Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体.

入) という呼び名の方が一般的である. 非興奮性細胞とは, 細胞膜が電氣的興奮を起こさない細胞のことで, 神経や筋肉の様な活動電位を發する興奮性細胞と区別して付けられた名称である. 唾液腺細胞は典型的な非興奮性細胞と考えられており, PutneyがSOCE仮説を提唱するに至る多くの研究が唾液腺を使った研究であった. 私は, 1988年にPutneyの研究室を訪問した際(図2), この仮説モデルを初めて知り, 唾液腺を使った研究から普遍的なCa²⁺流入モデルを組み立てた彼の洞察力と研究手法に感銘を受けると共に, そのユニークな仮説モデルに強い興味を持った. ここでは「ストア作動性Ca²⁺流入

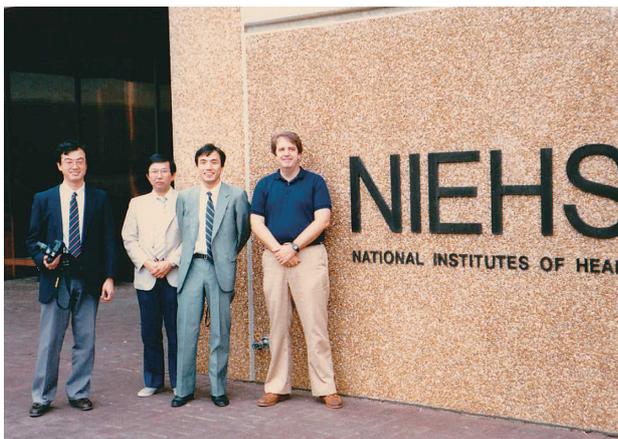


図2. 1988年にDr. Putneyの研究室を訪問した時のスナップ. 右端からDr. Putney, 北里大学解剖の瀬川彰久先生, 筆者, 生化学の田隈泰信教授.

(SOCE)」モデルと, それと関連する研究を概説し, さらに近年発見されたSOCEの制御分子を紹介する.

2. 細胞膜のイノシトールリン脂質代謝とCa²⁺動員

神経や筋肉など興奮性細胞には電氣的興奮によって開口する電位依存性Ca²⁺チャンネルが存在し, 膜が脱分極するとCa²⁺チャンネルが開口して細胞外からCa²⁺が流入する. また, 筋肉の場合は, 細胞膜で発生した電氣的興奮が筋小胞体にも伝わり, 筋小胞体上のCa²⁺チャンネル(リアノジン受容体)からCa²⁺が放出され, [Ca²⁺]_iは一挙に上昇する. 電位依存性Ca²⁺チャンネルは, 神経や筋肉に存在する最も主要なCa²⁺流入経路であり, 神経伝達物質の放出や筋収縮の制御に必須のシグナルとして働いている.

一方, 唾液腺細胞のような非興奮性細胞には膜電位の変化によって開閉する電位依存性Ca²⁺チャンネルは存在しないと考えられている. たとえ存在したとしても, その役割はおそらくマイナーであろう. 現在, 非興奮性細胞のCa²⁺シグナルがイノシトールリン脂質代謝を介して起きることは広く認められているが, 1970年代はほとんど謎であった. 大変古い話だが, 1953年にCa²⁺シグナル研究の先駆けになった論文がHokin夫妻によって発表された(Hokin & Hokin, 1953). 夫妻は, ハトの膀胱スライスをアセチルコリンで刺激すると, イノシトールリン脂質への³²Pの取り込みが増加することを発見した. 今から捉え返すと, この増加は分解したイノシトールリン脂質の再合成過程を反映したものであると考えられる. この研究は極めて重要な発見であるにもかかわらず, ³²P取り込みの生理的な意味が不明であったため, 当時はほとんど注目されなかったという. しかし, 私がCa²⁺シグナルの研究に手を染め始めた1980年代になると, M. R. HokinとL. E. Hokinの名は, Ca²⁺シグナル研究の先駆者として多くの研究者が知るところであった.

Hokin夫妻の研究から22年後の1975年, 英国のR. H. Michellは, 細胞膜で起きるイノシトールリン脂質の代謝亢進こそがCa²⁺動員を起こすメカニズムであるとする仮説を提唱した(Michell, 1975). Michellは, Ca²⁺動員として細胞外からのCa²⁺流入を想定していたので, 今日確立されたメカニズムとはやや違うが, 細胞膜のリン脂質代謝とCa²⁺シグナルとをドッキングさせた最初の研究者として広く知られている. しかし, 当時, この仮説に対しては反対もあり, Ca²⁺動員が先なのか, それともイノシトールリン脂質代謝が先なのかといった, 卵が先かニワトリが先かに似た論争がしばらく続いた. この論争に終止符を打ったのが1983年のM. J. Berridgeらの研究

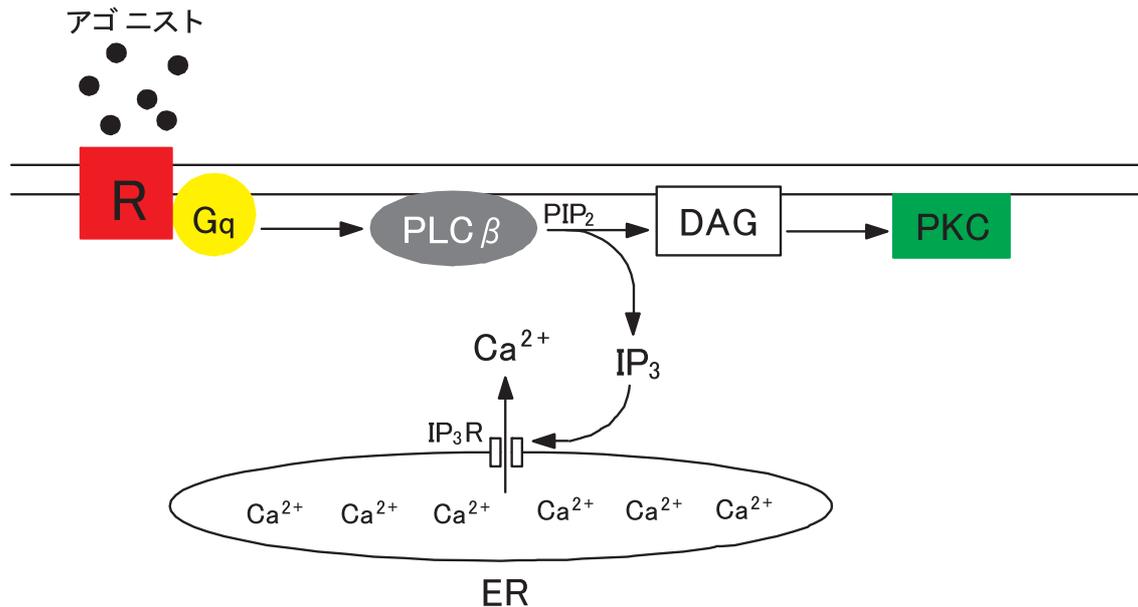


図3. イノシトールリン脂質代謝を介するCa²⁺動員. R, 受容体; G_q, G_{q/11}型のGタンパク質; PLCβ, ホスホリパーゼCβ; PIP₂, ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸; IP₃, イノシトール1,4,5-三リン酸; DAG, ジアシルグリセロール; PKC, プロテインキナーゼC; IP₃R, IP₃受容体; ER, 小胞体.

である (Streb et al., 1983). 彼らは, イノシトールリン脂質の代謝産物の1つであるイノシトール1,4,5三リン酸 (IP₃) をラットの膵臓腺房細胞に入れると, 小胞体からCa²⁺が遊離することをCa²⁺電極を使って証明した. IP₃以外のイノシトール代謝産物はCa²⁺遊離をほとんど起こさない. これが, IP₃がCa²⁺放出を起こすメッセンジャーであることを明らかにした最初の研究である.

現在, イノシトール代謝からCa²⁺遊離までの流れはほぼ完全に解明されている (図3). 細胞膜受容体が刺激を受けるとGTP-結合タンパク質 (Gq) を介してホスホリパーゼCという酵素が活性化し, 細胞膜の構成成分の1つであるホスファチジルイノシトール4,5二リン酸 (PIP₂) が加水分解され, 代謝産物であるIP₃とジアシルグリセロール (DAG) が生成される. IP₃は, 細胞内Ca²⁺ストアの膜 (小胞体膜) に分布するIP₃受容体 (Ca²⁺チャネル型受容体) に作用してCa²⁺を放出させる. IP₃受容体には3種類のサブタイプが存在し, それぞれの特性や分子構造については現在までにおおよそ明らかにされている. ちなみに, IP₃受容体を発見したのは東京大学の御子柴克彦教授 (現理化学研究所) であり, 現在もIP₃受容体研究の世界的リーダーとして活躍している. また, もう一方の代謝産物であるDAGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化する. PKCは, 1977年に神戸大学の西塚泰美教授 (当時) らによって発見されたタンパク質リン酸化酵素である. 唾液腺でのこの酵素の機能は十分には解明されていないが, ムスカリン受容体を介するアミラーゼ分泌では, PKCが重要な役割をすること

が示唆されている (Putney et al., 1984; Takuma & Ichida, 1986; Tojyo et al., 1992).

唾液腺にはIP₃産生を起こす受容体が複数存在する. ムスカリンM₃受容体, アドレナリンα₁受容体, そしてサブスタンスP (SP) 受容体である. 横道にそれるが, SP受容体については種差が大きいようで, SPによく反応するのはラットの唾液腺である. 20年前, 私たちは, マウスの唾液腺細胞をSPで刺激しても [Ca²⁺]_i上昇やIP₃産生が全く起きないことを見つけ, AOBに短報で報告した (Tojyo et al., 1993). 我々より先に, 日本歯科大学新潟の岩淵良志喜博士は, マウスにSPを投与しても唾液分泌が起きないことを報告している (Iwabuchi et al., 1989). どうやらマウスの唾液腺にはSP受容体が存在しないらしい. 近縁の齧歯類なのにラットとマウスでなぜこのような違いがあるのか, 不思議な話だ. SPに反応するラットの唾液腺の方が特殊なのかも知れない. しかし, この様な種差の研究はあまり注目されないし, 周囲の評価も低いので, 誰も熱を入れてやらない.

3. Ca²⁺シグナルの二相性反応

細胞内 (細胞質) のCa²⁺濃度は細胞外の1万分の1以下, 約100nMである. この極微量なCa²⁺の測定にはCa²⁺感受性蛍光試薬を使うのが現在一般的である. 特にfura-2という蛍光試薬 (図4A) が最も広く用いられている. この測定法の原理については, 本学会誌の総説に以前書いたので参照してほしい (東城, 2005). ちなみにfura-2は, 1985年にRoger Y. Tsienという, 当時32歳のア

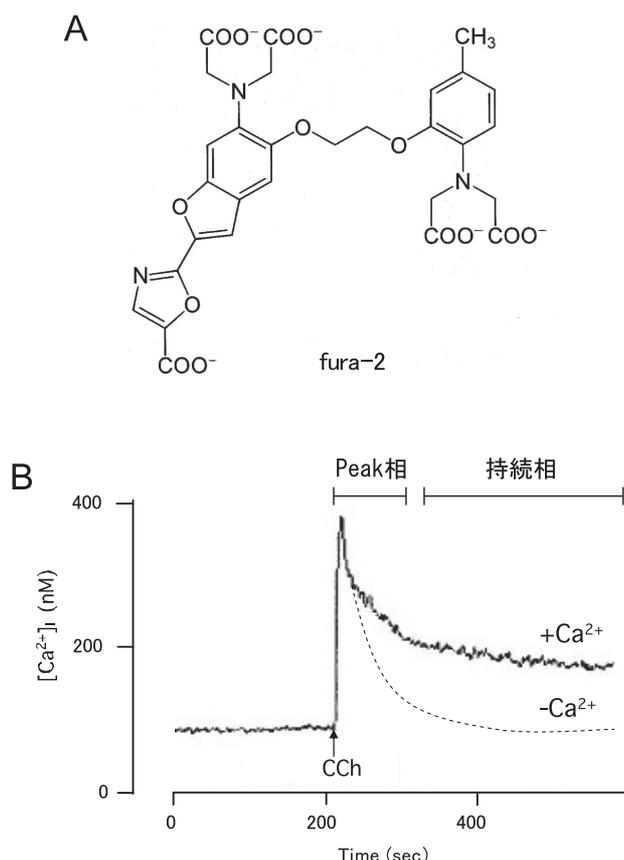


図4. Ca^{2+} 感受性蛍光試薬fura-2の構造 (A) とラット耳下腺細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応 (B). 単離した耳下腺細胞に fura-2 を取り込ませ、カルバコール (CCh) でムスカリン受容体を刺激すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はピーク相と持続相から成る二相性反応を示す。外液 Ca^{2+} の非存在下で刺激した時は持続相が消失し、ピーク相のみが残る (破線)。

アメリカの若手研究者によって開発された (Grynkiewicz et al., 1985)。この測定法の普及は Ca^{2+} シグナル研究の勃興期と軌を一にするものであり、この蛍光試薬がサイエンス全体に与えた影響は計り知れない。ある総説によると、JBC に発表された Tsien のこの論文は 15,000 回以上引用されたという (Petersen et al., 2005)。私は 2005 年の本学会誌に、「生命現象をリアルタイムで可視化することを可能にした Tsien の功績は極めて大きく、ひょっとするとノーベル賞も近いかも知れない」と書いた (東城, 2005)。彼は、fura-2 の開発後もクラゲの蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) の変異体を使った様々な蛍光プローブを開発し、私の予想通り、3 年後の 2008 年に日本の下村脩博士と共にノーベル化学賞を受賞した。私の予想がばっちりの時は実に爽快であった。

唾液腺細胞に fura-2 を取り込ませ、ムスカリン受容体刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を測定すると、刺激直後の大きなピーク相とその後の持続相が出現する (図 4 B)。しかし、二相性反応が現れるのは細胞外液に Ca^{2+} が存在

する時で、細胞外液の Ca^{2+} を除くと持続相は消失し、ピーク相のみが残る。すなわち、ピーク相は IP_3 をメッセンジャーとする Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出であるのに対し、持続相は細胞外からの Ca^{2+} の流入である。Putney は、fura-2 による測定法が一般化する以前から、唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は二相性になると考えていた (Putney, 1976; 1977)。彼の考えは、 ^{86}Rb (K^+ と同じ挙動を示すアイソトープ) を使った K^+ 流出実験のデータから得られた結論である。唾液腺細胞からの K^+ 流出は Ca^{2+} 依存的に活性化されることが明らかになっていたので、Putney は K^+ の流出パターンが Ca^{2+} の細胞内動態を反映していると考えたようだ。確かに、彼の当時の論文を見ると、 ^{86}Rb の流出パターンは fura-2 によって測定した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化とよく一致しており、改めて彼の洞察力の鋭さに感心する。

4. 「ストア作動性 Ca^{2+} 流入」とは？

細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出 (ピーク相) においては、 IP_3 がメッセンジャーとして主役を担っていることは疑いの余地がない。一方、細胞外からの Ca^{2+} 流入 (持続相) はどのように調節されているのか？ 1980 年代後半、それを説明するための様々な仮説が提唱された。 IP_3 が、 Ca^{2+} 放出だけでなく、 Ca^{2+} 流入のメッセンジャーとしても働くとする IP_3 説 (Kuno & Gardner, 1987)、 IP_3 のリン酸化産物である IP_4 が IP_3 と共同で働くとする IP_4 説 (Morris et al., 1987) などが代表的なものであるが、いずれも広い支持を集めることはできず、今ではこれらの説は消えてしまった。その頃現れた仮説が、Putney が提唱した capacitative Ca^{2+} entry (容量性 Ca^{2+} 流入)、別名 SOCE (ストア作動性 Ca^{2+} 流入) である。この説は、 Ca^{2+} 流入に “メッセンジャー” は必要ないという考えなので、“メッセンジャー” に固執していた当時の研究者は皆驚いた。

このモデルによると、 Ca^{2+} 流入は Ca^{2+} 放出と一体の現象であり、ストアからの Ca^{2+} 放出が起きなければ Ca^{2+} の流入も起きない。 Ca^{2+} 放出によってストア内の Ca^{2+} が枯渇する (Ca^{2+} レベルが低下する) と、それが引き金になって細胞外から Ca^{2+} が流入し、枯渇した Ca^{2+} ストアは流入した Ca^{2+} によって再充填される。また、ストアからの Ca^{2+} 放出が続く限り、 Ca^{2+} 流入も続く。 IP_3 や IP_4 などの膜リン脂質の代謝産物は、この Ca^{2+} 流入に直接的には関与していないという。Putney が命名した capacitative Ca^{2+} entry (容量性 Ca^{2+} 流入) という名称は、 Ca^{2+} ストアと細胞膜との関係が電気回路におけるコンデンサー (capacitor) と抵抗器 (resistor) との関係に似ていることから

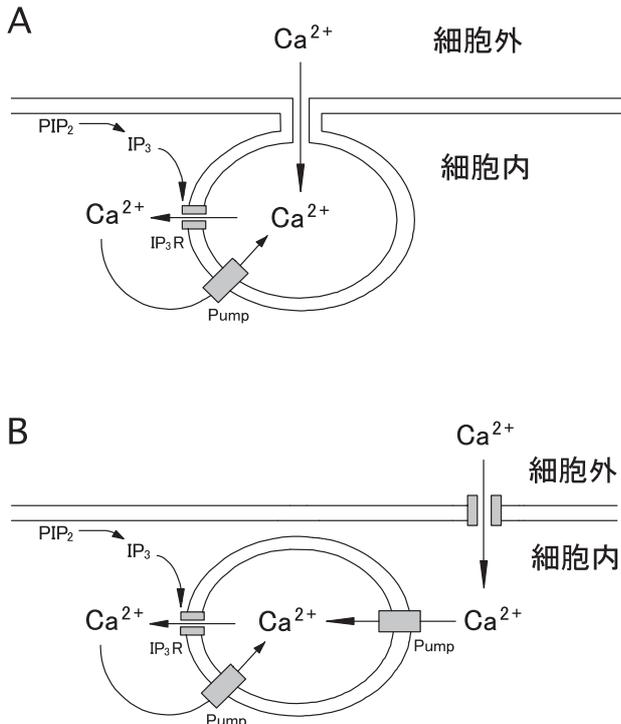


図5. Putneyが提唱した非興奮性細胞における Ca^{2+} 流入モデル。(A) 1986年のオリジナル版。(B) 1990年の修正版。

名付けられた。

1986年に発表されたSOCEモデルのオリジナル版(図5A)(Putney, 1986)では、細胞内 Ca^{2+} ストアは細胞外と直接繋がっており、ストアが枯渇すると、ストアと細胞外とを繋ぐ流入路が開き、細胞外からストア内に直接 Ca^{2+} が流入する。この仮説は、唾液腺を使った K^+ (^{86}R)放出実験の解析に基づいて組み立てられたモデルで、細胞内の Ca^{2+} の変化を直接モニターしたわけではない。その後、 Ca^{2+} 蛍光試薬fura-2による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定が行われるようになり、新たな知見が蓄積された。特に、Takemura and Putney (1989)は、枯渇した Ca^{2+} ストアが再充填する時、細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が通常より高くなる現象(オーバーシュート)が見られることを、ラットの耳下腺細胞を使って発見した(Takemura & Putney, 1989)。もし Ca^{2+} ストアと細胞外が直接繋がっているのなら、このようなオーバーシュートは見られないはずである。そこで、Putneyは、オリジナル版を一部修正し、SOCEの新モデルを1990年に発表した(図5B)(Putney, 1990)。修正版によると、 Ca^{2+} は一旦細胞質に流入し、その後ストアの膜上の Ca^{2+} ポンプ(Ca^{2+} -ATPase)によってストア内に取り込まれるという。

このSOCEモデルは、それまでに得られた非興奮性細胞の Ca^{2+} 流入実験の結果をほぼ矛盾無く説明することができた。しかし、未だ状況証拠のみであり、誰をも納得させるだけの確定的な証拠がそろったとは言えなかつ

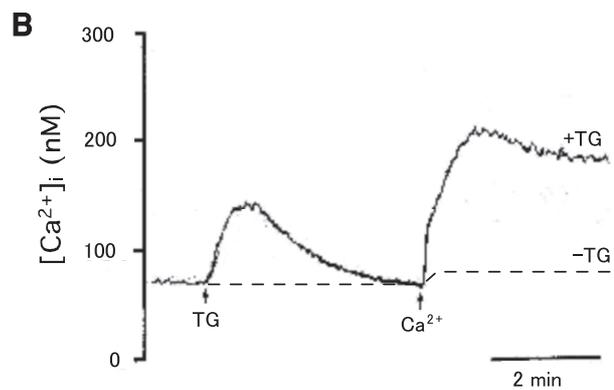
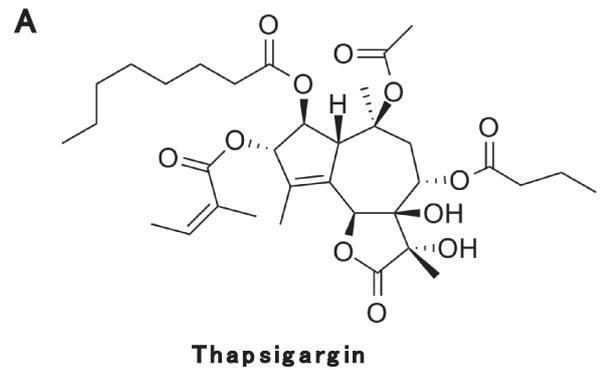


図6. 小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害薬タブシガルジン(thapsigargin)の構造(A)と Ca^{2+} 流入に対するタブシガルジン(TG)の効果(B)。単離したラット耳下腺細胞にfura-2を取り込ませ、外液 Ca^{2+} の非存在下でTGを作用させた。一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の後、外液に Ca^{2+} を加えると大きな Ca^{2+} 流入反応が起きた。TGを作用させずに Ca^{2+} を加えた時は Ca^{2+} 流入はほとんど起きない(破線)。

た。事実、当時一部の研究者からは「これまでに提唱された中で最もstupid(ばかげた)モデルだ」と批判されたという。空想の域を出ない怪しい仮説と見ていた研究者も多かったのではないだろうか。しかし、このモデルがその後、非興奮性細胞における Ca^{2+} 流入機構として広く受け入れられることになる。

5. タプシガルジンの作用

SOCE研究の歴史を振り返ると、タブシガルジン(thapsigargin(TG))という植物由来の化学物質(図6A)が極めて重要な役割を果たしたことがわかる。TGは*Thapsia garganica*というセリ科の植物から単離した発がんプロモーターである。発がんプロモーターとしては、PKCを活性化するホルボールエステルがよく知られているが、TGにはPKCを活性化する作用はない。デンマークのOle Thastrupのグループは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対するTGの興味深い作用を1987年と1988年の論文に発表した(Thastrup et al., 1987; Jackson et al., 1988)。それによると、TGは細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離を引き起こし、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上

昇させるという。この化合物は、イオノマイシンやA 23187の様なCa²⁺イオノフォアとしての作用はないし、イノシトールリン脂質代謝を刺激する作用もないので、この[Ca²⁺]_i上昇は全く別のメカニズムによる。Thastrupらはその後の研究で、TGが小胞体のATP-依存性Ca²⁺ポンプ(Ca²⁺-ATPase)を特異的に阻害することを明らかにした(Thastrup et al., 1990)。分子構造が異なる細胞膜のCa²⁺ポンプは阻害を受けないことも確認された。

小胞体のCa²⁺ポンプを阻害すると、なぜCa²⁺が遊離するのか？小胞体が細胞内のCa²⁺貯蔵庫(Ca²⁺ストア)として機能していることは既に述べた。小胞体内のCa²⁺濃度は数百μMと見積もられており、この濃度は細胞外のCa²⁺濃度(> 1 mM)よりはやや低いですが、細胞質のCa²⁺濃度と比べると数千倍高い。これは、Ca²⁺がCa²⁺ポンプによって能動的に小胞体内に取り込まれているからである。小胞体の内と外との大きな濃度差は、小胞体内から細胞質へのCa²⁺の漏れ出し(リーク)を生じさせる。リークしたCa²⁺は直ちにCa²⁺ポンプによって小胞体内に取り込まれるので、細胞質のCa²⁺は常に低い濃度に保たれている。しかし、TGがCa²⁺ポンプを阻害するとCa²⁺の再取り込み機構が失われ、小胞体からのCa²⁺のリークが続く。その結果、徐々に細胞質のCa²⁺濃度が上昇すると共に、Ca²⁺ストア内のCa²⁺が枯渇する。

TGのこの作用に注目したのがPutneyである。彼は早速ThastrupからTGの供与を受け、ラットの耳下腺細胞を使ってTGの効果を調べた。その結果、1) TGが作用するCa²⁺ストアと、IP₃が作用するCa²⁺ストアとは共通であること、2) TGはCa²⁺放出を起こすだけでなく持続的なCa²⁺流入をも起こすこと、3) TGによって起きるCa²⁺流入は、ムスカリン受容体刺激によって起きるCa²⁺流入と同じ経路(同じCa²⁺チャンネル)を介することなどが明らかになった(Takemura et al., 1989)。すなわちTGは、IP₃生成を刺激せずにSOCEを活性化する特異な試薬であることがわかった。ところで、この実験に最も深く関わったのは、当時Putneyのラボに留学していた札幌医科大学薬理の竹村晴夫博士である。耳下腺細胞を使ったSOCEの証明には竹村博士の貢献が極めて大きいといえる。私が丁度この時期にPutneyのラボを訪問し、竹村博士らの研究の様子を垣間見ることができたのは大変幸運であった。その後、TGによるSOCEの活性化は耳下腺以外の細胞でも次々に報告され、TGはSOCEの研究にとって無くてはならない薬理学的toolとして今日でも広く用いられている。

ここでTGがSOCEを活性化することを示した実験の1例を紹介する。図6Bは、ラット耳下腺細胞にfura-2を

取り込ませ、TG添加後の[Ca²⁺]_iの変化をモニターした結果である。Ca²⁺を含まない溶液中では、[Ca²⁺]_iはゆっくりと上昇し、数分後にはbasal [Ca²⁺]_iレベルに戻る。この一過性の反応は細胞内ストアからのCa²⁺遊離(Ca²⁺リーク)を示している。細胞外にはCa²⁺が存在しないのでCa²⁺が補充されず、ストアはやがて枯渇する。この一過性の[Ca²⁺]_i上昇反応の後、外液にCa²⁺を添加すると[Ca²⁺]_iが大きく上昇する。この上昇は細胞外からのCa²⁺流入を示している。TGを作用させずにCa²⁺を添加した場合は、この様な大きなCa²⁺流入は出現しない(図6B, 破線)。TGを作用させ、Ca²⁺流入の大きさをモニターする手法は、今ではSOCEのルーチンな解析法として確立している。

6. Ca²⁺流入因子(CIF)

1990年代に入るとSOCEは非興奮性細胞における主要なCa²⁺流入機構として広く認められるようになった。しかし、ストアが枯渇するとなぜ細胞膜のCa²⁺チャンネルが開くのかは謎であり、当時、ストアの枯渇の情報を細胞膜(Ca²⁺チャンネル)に伝える機序についていくつかの仮説が提唱された。代表的なのが拡散性メッセンジャー(diffusible messenger)説である(図7A)。ストアが枯渇するとある種の物質が拡散し、その物質の作用で細胞膜のSOCチャンネル(store-operated Ca²⁺ channel)が開くという仮説である。そのメッセンジャーの候補としては、cyclic GMP(Pandol and Schoeffield-Payne, 1990; Xu et al., 1994)、アラキドン酸やその代謝産物(Rzagalinski et al., 1996; Wolf et al., 1997)、チトクロムP450(Alvarez et al., 1991; Montero et al., 1991)、small Gタンパク質(Fasolato et al., 1993)などが提唱され、百家争鳴の感を呈していた。これらの物質の中には、SOCチャンネルとは異なるCa²⁺チャンネルの開口に関与するものがあるが、ストアの枯渇の情報を伝えるメッセンジャーとしては今日否定されている。

1993年、Ca²⁺ストアを枯渇させたJurkat細胞の抽出物中に、Ca²⁺流入を刺激する未知の物質が出現するという論文が発表された(Randriamampita and Tsien, 1993)。この未知物質はcalcium influx factor(CIF)と名付けられ、これこそがストアの枯渇によって遊離するメッセンジャー物質ではないかと考えられた。掲載された雑誌は天下のNature、著者はfura-2の開発者であるR. Y. Tsienである。影響が小さいわけではない。世界中でこの未知物質の探索が始まった。いよいよSOCEの分子メカニズムの解明も近いと思われるが、結果的には誰もCIFの正体を突き止めることはできず、CIFは幻に終わった。

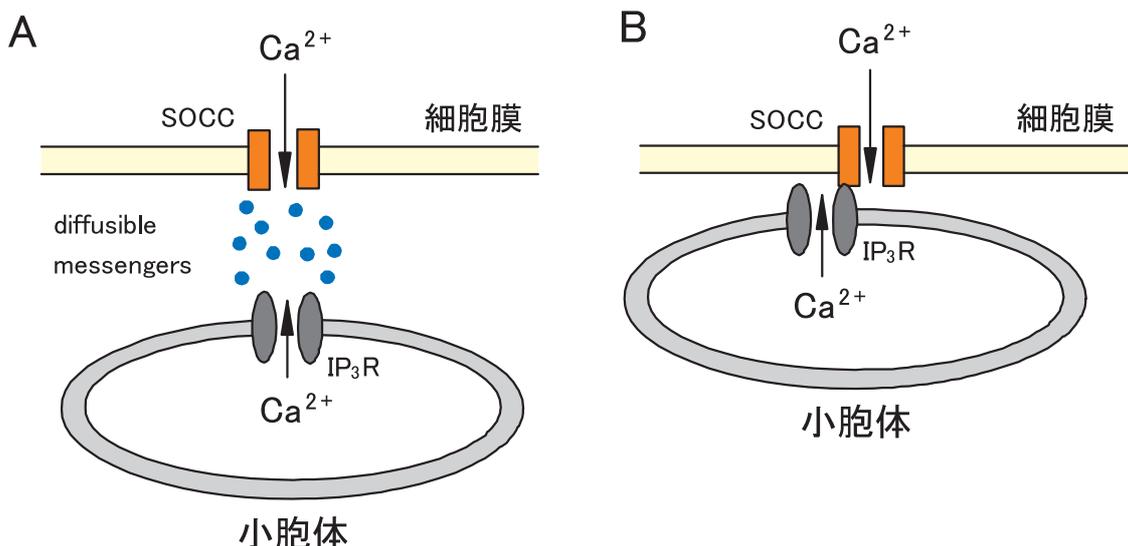


図7. Ca²⁺ストアの枯渇の情報を細胞膜に伝える機序. 拡散性メッセンジャー説 (A) と構造的連結モデル (B). SOCC, ストア作動性Ca²⁺チャンネル.

Putneyは当初からこのCIF説には懐疑的で、この説を否定する論文を発表している (Gilon et al., 1995). 彼は、Jurkat細胞の抽出物中に [Ca²⁺]_i上昇を起こすアセチルコリン様の活性因子が含まれている可能性を指摘している. PutneyのグループとTsienのグループがこのCIFの“真贋”を巡ってNature誌上で論争を行っており (Bird et al., 1995), CIFがこの時代のトピックの1つであったことをうかがわせる.

7. 構造的連結モデル

拡散性メッセンジャー説が注目を集めていた頃、それとは別に構造的連結モデル (conformational coupling model) という仮説を提唱する研究者もいた (Irvine, 1990; Berridge, 1995の総説). この仮説 (図7B) では、小胞体 (ストア) 膜にあるIP₃受容体と細胞膜上のCa²⁺チャンネルとが構造的に極めて近接した位置にあり、ストアが枯渇するとIP₃受容体の構造が変化して細胞膜のCa²⁺チャンネルと直接相互作用する. その結果、ストアの枯渇の情報が細胞膜に伝えられ、Ca²⁺チャンネルが開く. このモデルは、骨格筋T管膜のジヒドロピリジン受容体と筋小胞体膜のリアノジン受容体との関係を類似化したもので、大変魅力的な仮説であったが、実験的な証拠が少なく、拡散性メッセンジャー説ほどは注目されなかったと思う. しかし、歴史というのは皮肉なもので、今日確立されつつあるSOCEの分子メカニズムは、どちらかと言うとこの構造的連結モデルに近い.

8. TRPチャンネル

SOCEの分子機構の研究で、もう1つの解明すべき重

要課題は細胞膜Ca²⁺チャンネル (SOCチャンネル) の同定であった. 神経や筋肉などの興奮性細胞に存在する電位依存性Ca²⁺チャンネルは、高血圧や不整脈の治療に用いられるCa²⁺拮抗薬 (Ca²⁺アンタゴニスト) の標的分子であることから、その生理や薬理が比較的早い時期から詳細に解析されてきた. それに対してSOCチャンネルの正体は近年までほとんど不明であったと言っていい.

1992年、ショウジョウバエの光受容器に持続的なCa²⁺流入を起こすイオンチャンネルが存在することが報告され (Hardie & Minke, 1992), transient receptor potential (TRP) チャンネルと名付けられた. TRPチャンネルは哺乳類にも広く存在し、現在、少なくとも29種類のTRPチャンネル遺伝子が同定されている. この中のTRPCサブファミリーがSOCチャンネルの本体であるという考えが提唱され、その証明のためにこれまで多くの研究が費やされてきた. TRPCチャンネルは唾液腺細胞にも存在し、アメリカNIDCRのI. S. AmbudkarのグループがTRPC説に基づいて精力的な研究を繰り返している (Singh et al., 2001; Liu et al., 2007).

しかし、TRPC説にはいくつかの弱点がある. 1つは、このチャンネルはCa²⁺に対する選択性が必ずしも大きくないという点である. Ca²⁺以外の陽イオンも少なからずこのチャンネルを通るので、Ca²⁺チャンネルと言うより陽イオンチャンネルと呼ぶ方が適当かも知れない. また、パッチクランプ法という実験手技でイオン電流 (current) を測定すると、TRPCチャンネルの活性化によって生じる電流は、SOCEによる電流 (I_{SOCE}と呼ばれている) とは異なる特徴を持つことが示されている. 以上のことから、TRPCチャンネルがSOCチャンネルの本体であるという考え

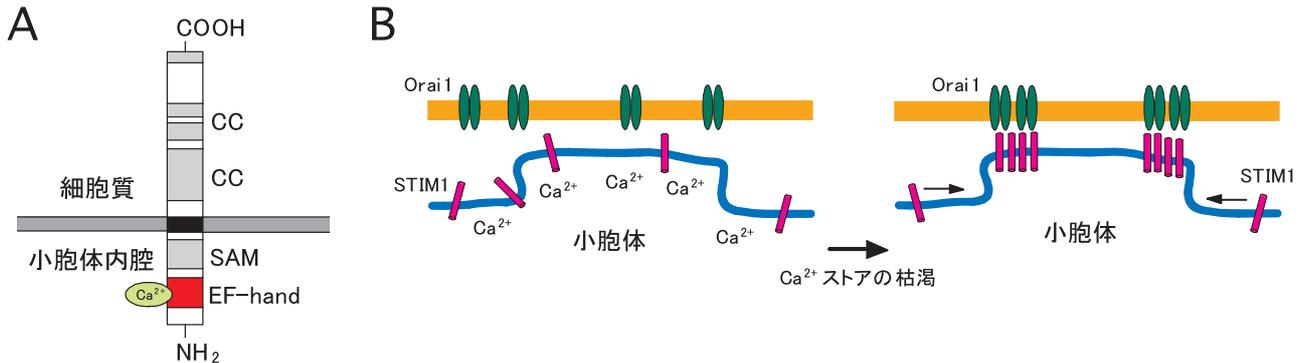


図 8. (A) STIM1の構造. N末端側には小胞体内の Ca^{2+} 濃度を感知するEF hand domainやsterile α -motif (SAM)が含まれる. 細胞質側にはSTIM1の凝集やOrai1の活性化に関与するcoiled-coil domains (CC)が含まれる. (B) STIM1の分布変化. 小胞体の Ca^{2+} が枯渇するとSTIM1が細胞膜の近傍に凝集し, 細胞膜のOrai1と相互作用する. その結果Orai1が活性化し, Ca^{2+} が細胞内に流入する.

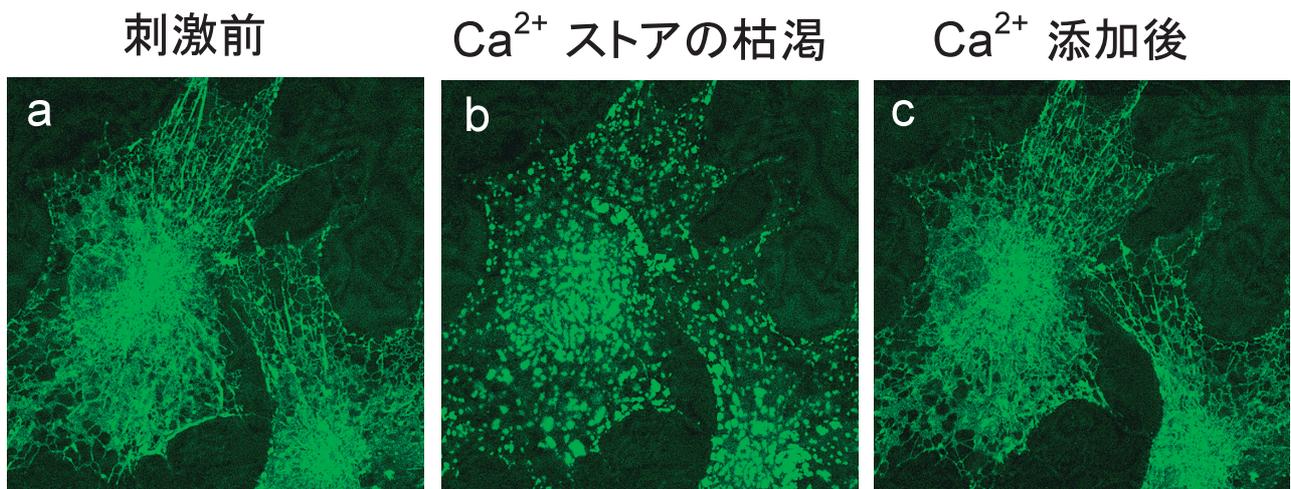


図 9. YFP-STIM1の細胞内分布の変化. COS-7細胞にYFP-STIM1を発現させ, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した. (a) 刺激前のYFP-STIM1の分布. (b) ATP刺激によって Ca^{2+} ストアを枯渇させた時のYFP-STIM1の分布. 多数の凝集像が出現した. (c) ストアを Ca^{2+} で再充填するとYFP-STIM1は刺激前の分布に戻る.

には疑問を持つ研究者もいた (Putney, 2007).

TRPC説が出てからの10年間はSOCE研究の焦点は主にTRPの機能解析に当てられていたように思う. しかし, 多くのエネルギーと時間 (そして研究費) を費やした割にはSOCEとTRPとの関係はクリアにはならなかった. 痒い足の裏を靴の底から必至になって搔いている様なもので, なかなか心地よくなる. このフラストレーションの解消には2005年と2006年に続けて発見された2種類のタンパク質の出現を待たなければならなかった.

9. STIM1とOrai1の発見

サイエンスの発展過程には2つの段階があると, ある高名な研究者の講演で聞いたことがある. 1つは, 同質の研究が平面的 (面積的) に広がる段階 (時期) で, この段階は研究内容が深まり, 細部が明瞭になるが, 質的な変化が際だって大きいわけではない. もう1つは, 研

究の質が飛躍的に変化する段階で, これによって研究は別の地平に達する. 言い換えれば, 研究過程にはプラトー相と跳躍相があるというのだ. STIM1 (stromal interaction molecule 1) とOrai1の発見は, SOCE研究の質を飛躍させた, 正に跳躍相 (breakthrough) であったと言える.

STIM1は元々ストローマ細胞の膜分子として同定されたタンパク質で, ショウジョウバエから哺乳類まで広く分布する. 2005年, STIM1がSOCEを制御する必須のタンパク質であることをアメリカの2つのグループがほぼ同時に報告した (Roos et al, 2005; Liou et al., 2005). いずれにおいても, RNAi (RNA interference) スクリーニングという方法を使ってSTIM1をノックダウンしたところ, SOCEが著しく抑制されることが示された. STIM1は主に小胞体膜に存在する一回膜貫通型のタンパク質であり, 小胞体内の Ca^{2+} 濃度を感知する Ca^{2+} センサーとして働いている (図 8 A). 小胞体内腔に位置するSTIM1

のN末端側にはEF-hand domainと呼ばれるCa²⁺結合部位があり、小胞体内腔のCa²⁺濃度の変化によってCa²⁺が結合したり遊離したりする。Ca²⁺ストアのCa²⁺濃度が低下するとEF-hand domainからCa²⁺が離れ、STIM1は小胞体膜上を移動して細胞膜近傍に集まる。さらにSTIM1分子同士が凝集して、punctaあるいはclusterと呼ばれる粒状構造を形成する(図8B)。この反応は可逆的で、Ca²⁺ストアがCa²⁺で再充填されるとpunctaは消失し、STIM1は元の分布に戻る(Liou et al., 2007; Smyth et al., 2008)。

このSTIM1のダイナミックな分布変化は、蛍光タンパク質でラベルしたSTIM1を培養細胞に発現させ、その分布変化を顕微鏡観察することによって容易に捉えることができる。図9に我々が観察した1例を紹介する。これはYFP(GFPの変異体)で標識したSTIM1(YFP-STIM1)を培養細胞(COS-7細胞)に発現させ、その分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した画像である。刺激前のYFP-STIM1は小胞体の網状構造に均一に分布しているが、アゴニスト(ATP)で刺激してCa²⁺ストアを枯渇させると、多数の凝集像(puncta)が出現する。ATPを洗い流した後、Ca²⁺を添加してストアを再充填すると、YFP-STIM1の分布は刺激前の状態に戻る。STIM1が小胞体のCa²⁺センサーであることは、これまで多くの実験的証拠が蓄積されていて(Zhang et al., 2005)、疑う余地はない。

さて、もう1つのkeyタンパク質であるOrailとは何か? このタンパク質こそが、これまで探しあぐねていたSOCチャンネルの本体であるという考えが現在有力である。未だTRPCに固執している研究者もいないわけではないが、私が見る限りでは大勢は決しているように思われる。Orailは2006年にアメリカの3つの研究グループによって別々に発見され(Feske et al., 2006; Zhang et al., 2006; Vig et al., 2006)、一時はOraiとCRACMという名称が並行して用いられたが、Stefan Feskeのグループの発表がわずかに早かったことから、現在ではOrailが定着している。Oraiという名称は、ギリシャ神話に出てくる天国の門を守る女神(the keepers of the gates of heaven)の名前から名付けられたとのことである。OrailはCa²⁺チャンネルの守り神である。

Feskeのグループは、重症複合型免疫不全症(severe combined immunodeficiency; SCID)という先天的な免疫欠損症の研究からOrailを発見した。彼らは、Orailを発見する前から、SCID患者のT細胞ではSOCEがほぼ完全に欠損していることを報告していた(Feske et al., 2005)。そこでSCIDの原因遺伝子を特定するため、全ゲ

ノム情報の網羅的解析とRNAiスクリーニングを行い、SCID患者で発現するSOCEの欠損がOrailの一塩基変異(271番目のシトシンがチミンに置換)によることを明らかにした。この変異は91番目のアミノ酸をアルギニンからトリプトファンに変えてしまう。SCID患者のT細胞に正常なOrailを強制発現すると、SOCEが回復することも確認された。Natureに発表されたこの論文(Feske et al., 2006)は、SOCEがヒトの生理や病態と深く結びついていること示したインパクトの大きい研究であり、セミナーで薬理の森田講師がこの論文を紹介した時は、SOCEの研究もここまで進展したのかと、強い感動を覚えた。

Orailは4つの膜貫通領域を有する細胞膜タンパク質で、4量体でチャンネル・ポア(pore)を形成する。細胞膜近傍でSTIM1が凝集(puncta形成)すると、STIM1とOrailとの相互作用によってOrailは活性化される(チャンネルの開口)。STIM1遺伝子に変異を加えてOrailとの相互作用ができないようにすると、Orailは活性化しない(Baba et al., 2006)。STIM1とOrailとの相互作用をモジュレートする調節因子の存在も示唆されているが(Varnai et al., 2007)、SOCEの活性化にはSTIM1とOrailの2つのkeyタンパク質があれば基本的に十分な様である。最近のSOCE研究はSTIM1とOrailとの相互作用の分子メカニズムが焦点になっており(Shaw et al., 2013)、近い将来この点についても全貌が明らかになると思う。また、STIM1の他にSTIM2、Orailの他にOrail2とOrail3という兄弟分子が存在することも分かってきた。これらの分子の役割についても解明が待たれる。

10. SOCEの欠損と病態

Orailの遺伝子変異の発見からやや遅れて、STIM1の遺伝子変異を持つ家族性疾患が見つかった(Picard et al., 2009)。この患者はSCID患者と同様の免疫不全を示すが、Orailの遺伝子は正常であった。STIM1遺伝子の塩基配列を調べると、380番目と381番目の塩基の間に余分なアデニンが挿入されており、その結果、フレームシフトによってSTIM1タンパク質は136番目以降のアミノ酸(C末端側)が欠失していることが分かった。この患者から採取した細胞を刺激してもSOCEは活性化されない。しかし、そのSOCE欠損細胞(患者の繊維芽細胞)に正常なSTIM1遺伝子を導入すると、SOCEが回復する。こうしてSTIM1とOrailの遺伝子変異の発見によって、これらのタンパク質がヒトの病態や疾患の原因になることが実証されたわけである。

STIM1の遺伝子変異を持つ患者は、免疫不全の他に、

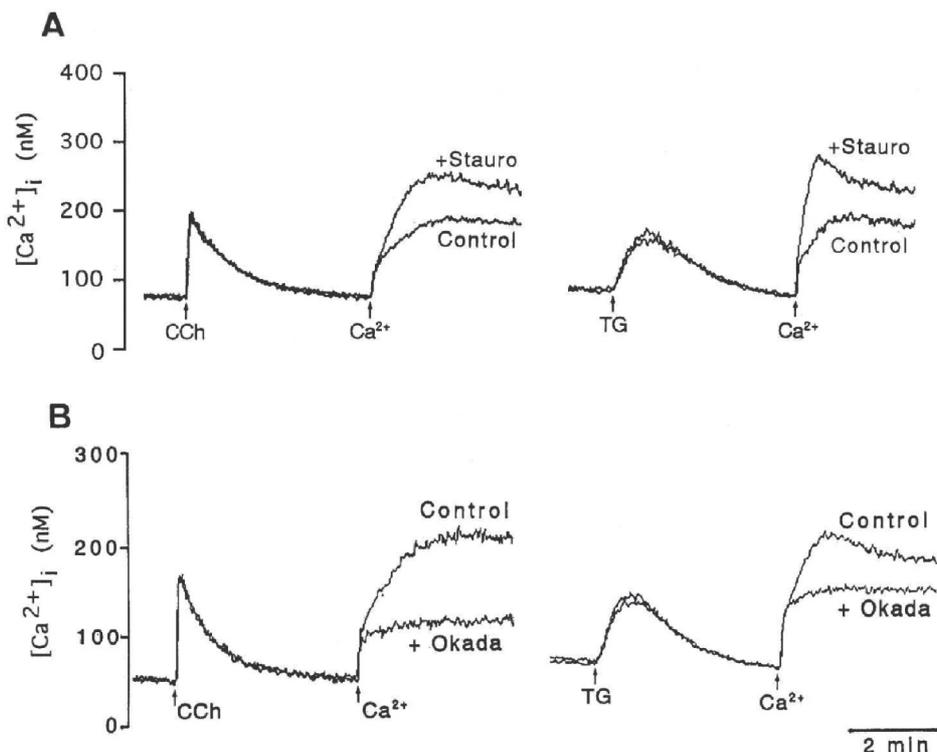


図10. ラット耳下腺細胞におけるストア作動性Ca²⁺流入に対するスタウロスポリン (Stauro) (A) とオカダ酸 (Okada) (B) の効果. StauroあるいはOkadaで前処理した細胞をカルバコール (CCh) あるいはタブシガルジン (TG) で刺激した. 一過性の [Ca²⁺]_i上昇の後, 外液にCa²⁺を加えたところ, Stauro処理ではCa²⁺流入が増強したが, Okada処理では流入が抑制された (Tojyo et al., 1995a; 1995b).

骨格筋の萎縮 (myopathy) やエナメル質の形成不全 (amelogenesis imperfecta) などの特徴的な表現型を示す. これは, 先のOrai1の遺伝子変異 (SCID) で見られる病態とほぼ同じであることから, 両遺伝子変異で現れる表現型は, いずれもSOCEの欠損が原因であると考えられている. 特に, 歯学部に着籍を置く者にとってはSOCEの欠損がエナメル質の形成不全を起こすことは大変興味深い. この患者では, 乳歯と永久歯のいずれにもエナメル質の石灰化不全が見られ, 軟弱なエナメル質は徐々に消失して, ついには象牙質が露出するという. SOCEの欠損がエナメル芽細胞の機能に障害を与えたのではないかと考えられているが, まだ確定的なことは分かっていない. マウスを使った動物実験であるが, Orai1遺伝子をノックアウトすると, 骨形成やエナメル質形成が抑制されることが最近報告された (Robinson et al., 2012).

ヒトのSOCE欠損と病態との関係については詳しい総説があるので参照してほしい (Feske, 2010).

11. リン酸化-脱リン酸化によるSOCEの調節

最後にSOCEに関係した私たちの研究を紹介したい. もう18年前になるが, 私たちは, タンパク質リン酸化酵

素 (キナーゼ) や脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) の阻害薬によって, ラット耳下腺細胞のSOCEが増強したり低下したりすることを見つけ, 2報の論文に発表した (Tojyo et al., 1995a, 1995b). 図10はそのデータの一部である. 細胞内ストアからのCa²⁺放出はこれらの酵素阻害薬によって全く影響を受けなかったが, Ca²⁺流入はキナーゼ阻害薬であるスタウロスポリンによって有意に増強され, セリン/スレオニン・ホスファターゼ阻害薬であるオカダ酸によって逆に抑制されることが分かった. 当時, 同様の現象をアメリカNIHのグループも報告しており (Sakai & Ambudkar, 1996), SOCEがこれらの酵素阻害薬によって影響を受けることは間違いのないと思われる. この結果は, SOCEがタンパク質のリン酸化-脱リン酸化による調節を受けていることを示唆するが, 残念ながらそれ以上に研究を進展させることはできなかった.

COS-7細胞はP_{2b}受容体アゴニストであるATPによく反応し, ピーク相と持続相から成る2相性の [Ca²⁺]_i上昇を示す. 数年前, 試しにCOS-7細胞を使ってスタウロスポリンの効果を調べてみたところ, 面白い現象を見つけた. 図11にその結果の一部を示す. 持続相でATPを除くと, コントロール細胞の [Ca²⁺]_iは速やかに刺激前のレ

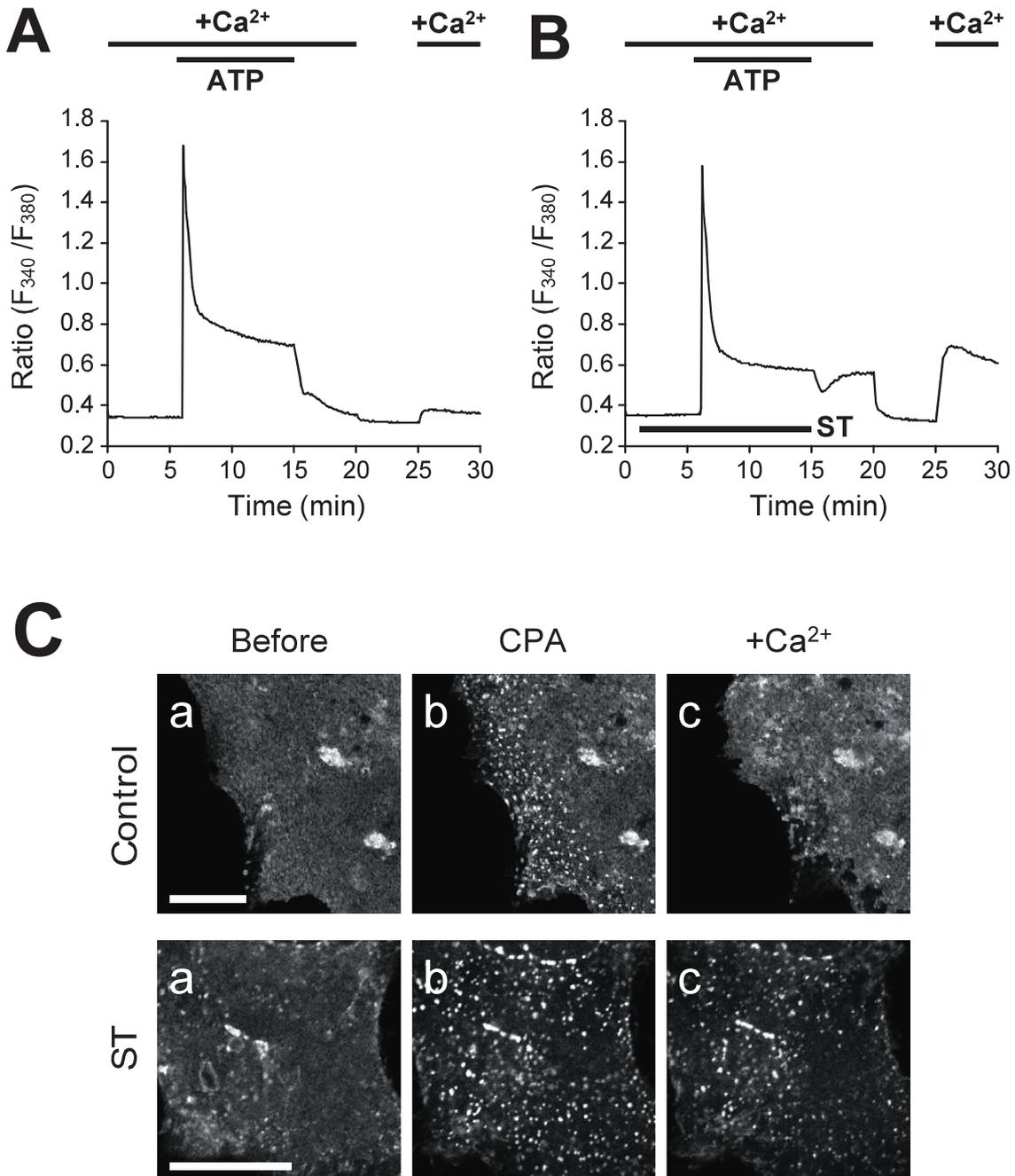


図11. COS-7細胞におけるストア作動性 Ca^{2+} 流入に対するスタウロスポリン (ST) の効果. Control (A) あるいはST処理細胞 (B) をATPで刺激した. ST処理した細胞ではATPを除いても Ca^{2+} 流入が続いた. (C) Venus-Orai1の細胞内分布の共焦点レーザー顕微鏡像. 小胞体 Ca^{2+} ポンプの可逆的阻害薬であるCPAで刺激するとVenus-Orai1の粒状構造が多数形成された. ST処理した細胞では, CPA除去後 Ca^{2+} を添加しても粒状構造は消失しなかった (Tojyo et al., 2013).

ベルに低下し, その後 Ca^{2+} を外液に添加しても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はほとんど上昇しなかった (図11A). ところが, スタウロスポリン (ST) の存在下で刺激した細胞ではATPを除いても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の高レベルが持続し, 外液 Ca^{2+} を除かない限り低下しなかった. しかも, その後に Ca^{2+} を添加すると, 再び $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した (図11B). この結果は, STで処理した細胞ではアゴニスト無しでSOCEが続いたことを示している. Ca^{2+} シグナルを研究する者には

理解不能な, 不思議な現象であった.

この結果の説明として, 私は, STがリン酸化阻害を介してOrai1の活性化 (開口) 状態を持続させたのではないかと考えた. そこで, 蛍光タンパク質でラベルしたOrai1 (Venus-Orai1) をCOS-7細胞に強制発現させ, 共焦点レーザー顕微鏡で細胞内の分布を観察した (図11C). 小胞体 Ca^{2+} ポンプの可逆的阻害薬であるCPA (cyclopiazonic acid) を使ってストアを枯渇させたところ,

Venus-Orai1の粒状構造 (puncta) が多数出現した。これはSTIM1との相互作用によってOrai1が活性化したことをうかがわせる。CPAを除いて Ca^{2+} を付加すると、ストアが Ca^{2+} で再充填されるので、コントロール細胞のpunctaはほぼ消失した。ところが、STで処理した細胞では Ca^{2+} を付加してもpunctaは消失せず、Orai1の活性化が続いていることを示していた。STの直接の標的分子がOrai1なのか、それとも他の付属関連分子なのかは不明であるが、私は、Orai1とSTIM1との相互作用が一部リン酸化-脱リン酸化によって調節されているのではないかと考えている。神戸大学のグループは、Orai1の機能がPKCによる調節を受けていることを報告しており (Kawasaki et al., 2010)、今後、SOCEの活性化とリン酸化との関係が研究の焦点になるかも知れない。

我々のCOS-7細胞を使った研究は、最近、Cell Calciumに掲載することができた (Tojyo et al., 2013)。これが私の最後の原著論文かと思うとそれなりに感慨深い。

別の研究だが、薬理の森田講師らは、ラットの顎下腺開口部からSTIM1の遺伝子を導入し、顎下腺細胞にSTIM1を強制発現させることに成功した (Morita et al., 2011)。さらに、STIM1を発現した顎下腺細胞では、SOCEが増大することも確認された (Morita et al., 2013)。この研究は将来、口腔乾燥症の治療に繋がる可能性もあり、これからの発展を期待したい。

12. おわりに

Ca^{2+} 流入のcapacitative modelが発表されたのは1986年である。掲載された雑誌はCell Calciumという、タイプされた原稿がそのまま印刷される、高級感に乏しいB級雑誌であった (現在はインパクトファクターが4.3の中堅雑誌である)。この仮説モデルがその後、最も普遍的な Ca^{2+} 流入機構として確立されるとは、当時何人の研究者がそれを予想したであろうか。このモデルの誕生直後からその研究の流れを知る者にとっては、今日のSOCE研究の爆発的な進展は驚きである。今ではその分子機構がほぼ解明され、ヒトの生理機能や病態ともドッキングされてきた。おそらく近い将来、SOCEは、治療や医薬品のターゲットとしても注目されるようになるだろう。

SOCE研究の歴史は、若い研究者の柔軟な発想がいかにより大きな可能性を生み出すかをよく示している。25年前にこのモデルを知った時、唾液腺の研究がそのベースになっていたこともあり、私は直感的に“これはおもしろい”と感じた。どうやらその時の“直感”は間違っていないようである。今ではSOCEが骨形成やエナメル質形成にも関わっていることが明らかになり、歯科臨

床とも無縁ではない。

SOCEは、私が最も関心を向け、且つ影響を受けた研究主題であり、研究生活も終わりに近づいたのを機に、SOCE研究の歴史を振り返ってみた。私がここで紹介したのは過去のSOCE研究のほんの一部に過ぎないが、SOCEを巡るダイナミックな研究の流れを感じ取っていただければ幸いである。SOCEを含む Ca^{2+} シグナルの研究には非常に高いレベルが求められ、競争も激しく、その中で独創性を出すのは至難の業である。後追いのような研究が多かったが、エベレストのような高みを眺めながらの研究生活は実に刺激的であったし、研究する喜びを味わうことができた。

謝 辞

本学会誌に総説を書く機会を与えてくれた編集委員長の田隈泰信教授に心から感謝申し上げます。また、これまで私と一緒に研究を担ってくれた薬理の谷村明彦教授、森田貴雄講師、根津顕弘講師にお礼申し上げます。

このゲラ刷りの校正中に、capacitative modelの確立に多大な貢献をされた札幌医大薬理の竹村晴夫先生の訃報が届いた。今日のSOCE研究の進展は先生の研究無しには語れない。これまでのご恩に心から感謝すると共に、ご冥福をお祈りしたい。

文 献

- Alvarez J, Montero M & Garcia-Sancho J. Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 274 : 193-197, 1991.
- Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M & Kurosaki T. Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 : 16704-16709, 2006.
- Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312 : 1-11, 1995.
- Bird G St J, Bian X, Puntney JW, Jr., Randriamampita C & Tsien RY. Calcium entry signal? *Nature* 373 : 481-482, 1995.
- Fasolato C, Hoth M & Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.* 268 : 20737-20740, 1993.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M & Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogat-

- ing CRAC channel function. *Nature* 441 : 179-185, 2006.
- Feske S, Prakriya M, Rao A & Lewis RS. A severe defect in CRAC Ca^{2+} channel activation and altered K^{+} channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J. Exp. Med.* 202 : 651-662, 2005.
- Feske S. CRAC channelopathies. *Pflügers Arch.* 460 : 417-435, 2010.
- Gilon P, Bird G St J, Bian X, Yakel JL & Putney JW, Jr. The Ca^{2+} -mobilizing actions of a Jurkat cell extract on mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 270 : 8050-8055, 1995.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 : 3440-3450, 1985.
- Hardie RC & Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8 : 643-651, 1992.
- Hokin MR & Hokin LE. Enzyme secretion and the incorporation of P^{32} into phospholipides of pancreas slices. *J. Biol. Chem.* 203 : 967-977, 1953.
- Irvine RF. "Quantal" Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates : a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263 : 5-9, 1990.
- Iwabuchi Y, Aoki C & Masuhara T. Effects of tachykinins on the secretion of fluid and glycoproteins from the submandibular glands of rat, mouse, hamster and guinea pig. *Jap. J. Pharmacol.* 51 : 428-431, 1989.
- Jackson TR, Patterson SI, Thastrup O & Hanley MR. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem. J.* 253 : 81-86, 1988.
- Kawasaki T, Ueyama T, Lange S, Feske N & Saito N. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca^{2+} level via the store-operated Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 285 : 25720-25730, 2010.
- Kuno M & Gardner P. Ion channels activated by inositol 1, 4, 5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 326, 301-304, 1987.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr, Meyer T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr. Biol.* 15 : 1235-1241, 2005.
- Liou J, Fivaz M, Inoue T & Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 9301-9306, 2007.
- Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC, Pani B, Dietrich A, Paria BC, Swaim WD, Beech D, Yildirim E, Singh BB, Birnbaumer L & Ambudkar IS. Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1 (-/-) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 17542-17547, 2007.
- Michell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415 : 81-147, 1975.
- Montero M, Alvarez J & Garcia-Sancho J. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem. J.* 277 : 73-79, 1991.
- Morita T, Tanimura A, Shitara A, Suzuki Y, Nezu A, Takuma T & Tojyo Y. Expression of functional Stim1-mKO1 in rat submandibular acinar cells by retrograde ductal injection of an adenoviral vector. *Arch. Oral Biol.* 56 : 1356-1365, 2011.
- Morita T, Nezu A, Tojyo Y & Tanimura A. Enhancement of muscarinic stimulation-induced Ca^{2+} release and entry by adenoviral-mediated gene transfer of Stim-mKO1 to rat submandibular acinar cells in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 439 : 433-437, 2013.
- Morris AP, Gallacher DV, Irvine RF & Petersen OH. Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating Ca^{2+} dependent K^{+} channels. *Nature* 330 : 653-655, 1987.
- Pandolf SJ & Schoeffield-Payne MS. Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 265 : 12846-12853, 1990.
- Petersen OH, Michalak M & Verkhatsky A. Calcium signalling : Past, present and future. *Cell Calcium* 38 : 161-169, 2005.
- Picard C, McCarl C-A, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, LeDeist F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A, Fischer A & Feske S. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* 360 : 1971-1980, 2009.
- Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7 : 1-12, 1986.
- Putney JW, Jr, McKinney JS, Aub DL & Leslie BA. Phorbol ester-induced protein secretion in rat parotid gland.

- Relationship to the role of inositol lipid breakdown and protein kinase C activation in stimulus-secretion coupling. *Mol. Pharmacol.* 26 : 261-266, 1984.
- Putney JW, Jr. Biphasic modulation of potassium release in rat parotid gland by carbachol and phenylephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 198 : 375-384, 1976.
- Putney JW, Jr. Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J. Physiol.* 268 : 139-149, 1977.
- Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11 : 611-624, 1990.
- Putney JW, Jr. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium* 42 : 103-110, 2007.
- Randriamampita C & Tsien RY. Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 364 : 809-814, 1993.
- Robinson LJ, Mancarella S, Songsawad D, Tourkova IL, Barnett JB, Gill DL, Soboloff J & Blair HC. Gene disruption of the calcium channel *Orai1* results in inhibition of osteoclast and osteoblast differentiation and impairs skeletal development. *Lab. Invest.* 92 : 1071-1083, 2012.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Liudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G & Stauderman KA. *STIM1*, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* 169 : 435-445, 2005.
- Rzagalinski BA, Blackmore PF & Rosenthal MD. Arachidonate mobilization is coupled to depletion of intracellular calcium stores and influx of extracellular calcium in differentiated U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1299 : 342-352, 1996.
- Sakai T & Ambudkar IS. Role for protein phosphatase in the regulation of Ca²⁺ influx in parotid gland acinar cells. *Am. J. Physiol.* 271 : C284-C294, 1996.
- Shaw PJ, Qu B, Hoth M & Feske S. Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 : 2637-2656, 2013.
- Singh BB, Zheng C, Liu X, Lockwich T, Liao D, Zhu MX, Birnbaumer L & Ambudkar IS. Trp1-dependent enhancement of salivary gland fluid secretion : role of store-operated calcium entry. *FASEB J.* 15 : 42401-42408, 2001.
- Smyth JT, DeHaven WI, Bird GS & Putney JW, Jr. Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J. Cell Sci.* 121 : 762-772, 2008.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ & Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306 : 67-69, 1983.
- Takemura H & Putney, JW, Jr. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem. J.* 258 : 409-412, 1989.
- Takemura H, Hughes AR, Thastrup O & Putney, JW, Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 264 : 12266-12271, 1989.
- Takuma T & Ichida T. Phorbol ester stimulates amylase secretion from rat parotid cells. *FEBS Lett.* 199 : 53-56, 1986.
- 谷村明彦, 東城庸介. 唾液分泌とシグナルトランスダクション. *日薬理誌* 127 : 249-255, 2006.
- Thastrup O, Foder B & Scharff O. The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 : 654-660, 1987.
- Thastrup O, Cullen PJ, Droran BK, Hanley MR & Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 2466-2470, 1990.
- 東城庸介. カルシウムシグナルと唾液分泌機能. *北医療大歯誌* 24 : 1-11, 2005.
- Tojyo Y, Matsui S, Tanimura A & Matsumoto Y. Relationship between cytosolic Ca²⁺ concentration and amylase release in rat parotid acinar cells following muscarinic stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1134 : 278-284, 1992.
- Tojyo Y, Tanimura A & Matsumoto Y. Evidence that substance-P receptors do not exist in mouse parotid and submandibular acinar cells. *Archs Oral Biol.* 38 : 269-271, 1993.
- Tojyo Y, Tanimura A, Matsumoto Y & Sugiya H. Staurosporine enhances Ca²⁺ entry induced by depletion of intracellular Ca²⁺ stores in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 17 : 32-40, 1995a.
- Tojyo Y, Tanimura A & Matsumoto Y. Suppression of ca-

- pacitative Ca^{2+} entry by serine/threonine phosphatase inhibitors in rat parotid acinar cells. *Jpn J. Pharmacol.* 69 : 381-389, 1995b.
- Tojyo Y, Morita T, Nezu A & Tanimura A. Staurosporine maintains the activation of store-operated Ca^{2+} entry even after the refilling of Ca^{2+} stores. *Cell Calcium* 53 : 349-356, 2013.
- Varnai P., Toth B, Toth DJ, Hunyady L & Balla T. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 complex. *J. Biol. Chem.* 282 : 29678-29690, 2007.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R & Kinet J-P. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science* 312 : 1220-1223, 2006.
- Wolf MJ, Wang J, Turk J & Gross RW. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A_2 . A novel mechanism underlying arachidonic mobilization. *J. Biol. Chem.* 272 : 1522-1526, 1997.
- Xu X, Star RA, Tortorici G & Muallem S. Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca^{2+} influx. *J. Biol. Chem.* 269 : 12645-12653, 1994.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA & Cahalan MD. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 437 : 902-905, 2005.
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang X H-F, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA & Cahalan MD. Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 : 9357-9362, 2006.



東城 庸介

昭和50年 3月 新潟大学理学部生物学科卒
 昭和52年 3月 新潟大学大学院理学研究科修士課程修了
 昭和52年 4月 新潟大学歯学部薬理学講座 助手
 昭和59年12月 東日本学園大学（現北海道医療大学）歯学部薬理学講座 助教授
 平成11年 6月 北海道医療大学歯学部（薬理学分野）教授
 平成11年 7月～現在 北海道医療大学大学院歯学研究科 教授併任
 平成23年 4月～現在 北海道医療大学歯学部（人間基礎科学）教授

〔原著〕

マラッセ上皮遺残細胞における細胞増殖の特異性

倉重 圭史¹⁾, 村井 雄司¹⁾, 首藤 かい¹⁾, 村田 佳織¹⁾, 山崎さや夏¹⁾,
林 良宣¹⁾, 永易 裕樹²⁾, 安彦 善裕³⁾, 齊藤 正人¹⁾

1) 北海道医療大学口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

2) 北海道医療大学生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野

3) 北海道医療大学生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

Specific properties of the cell proliferation in epithelial rests of Malassez.

Yoshihito KURASHIGE¹⁾, Yuji MURAI¹⁾, Kai SHUDOU¹⁾, Kaori MURATA¹⁾, Sayaka YAMAZAKI¹⁾,
Yoshinobu HAYASHI¹⁾, Hiroki NAGAYASU²⁾, Yoshihiro ABIKO³⁾, Masato SAITOH¹⁾1) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido.2) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology,
Health Sciences University of Hokkaido.3) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology,
Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

Fragments of Hertwig's epithelial root sheath persist in small clusters known as epithelial rests of Malassez (ERM) in periodontal ligaments. These ERM cells are unique epithelial cells that are present in periodontal tissue throughout the life of organisms, and play a role in the homeostasis of the periodontium through reciprocal interactions with other periodontal cells. However, the function and cell proliferation properties of ERM cells are not fully understood. This study investigated whether ERM cells have cell growth capabilities and primitive stem cell characteristics.

Undifferentiated epithelial markers and the G0 cell cycle marker of ERM *in vivo* were identified by immunohistochemical staining using anti-CK-19 and anti-p27^{kip1} antibodies. The ERM cells were isolated from porcine periodontal ligament and cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium with serum. Porcine gingival epithelium (GE) cells were also cultured in the same way as the ERM cells. The ability of the ERM cells to proliferate was examined by a cell proliferation assay

using CyQUANT GR dye, which produces fluorescence enhancement upon binding to cellular nucleic acids. Expressions of Nanog and Stat3 as pluripotent genes and TERT as the catalytic components of telomerase were observed in the ERM cells by RT-PCR.

As a result, localization of immunohistochemical staining for p27^{kip1} and CK-19 were detected in the cytoplasm, but for GE both were negative. The cell growth rates of the ERM cells were significantly higher than the GE cells *in vitro* ($p < 0.05$). The signal of the catalytic components of the telomerase, TERT, in the ERM cells was stronger than in the GE cells by RT-PCR. The ERM cells were expressed as pluripotent genes of Nanog and Stat3 by RT-PCR.

The results suggest that The ERM cells are unusual cells that exhibit the immaturity and cell growth arrest of ectoderm-derived epithelial cells. The ERM cells may also have the properties of a unique stem cell population.

Key words : epithelial cell rests of Malassez, stem cell, cell proliferation

緒 言

歯胚の内エナメル上皮と外エナメル上皮の癒合部であるcervical loopから伸びるヘルトヴィッヒの上皮鞘は、歯胚間葉の増殖と分化を誘導し歯根象牙質やセメント質形成を促す。歯根形成後は細かく断裂し、マラッセ上皮遺残として歯根膜セメント質側に残存することで歯根膜周囲組織の恒常性維持を担っている (Luan et al., 2006)。マラッセ上皮遺残は若年者の歯根根尖部付近に多く存在し、増齢に伴い減少傾向を示すため通常は細胞増殖を停止していると考えられるが、完全に消失することはない (Luan et al., 2006)。さらに、マラッセ上皮遺残細胞は何らかの刺激により増殖を開始し、歯根嚢胞の嚢胞裏層上皮や歯原性腫瘍などの由来となり、上皮幹細胞の特性を持つとの報告もある (Lin et al., 2006; Agostini et al., 2011; Oka et al., 2012)。

細胞増殖を調節する細胞周期は、DNA合成期 (S期)、核分裂期 (M期)、およびその間を埋めるGap期 (G期)があり、さらにM期からS期にかけてはG1期、S期からM期にかけてはG2期、そしてG1期間に細胞周期を脱し休止期に入った細胞をG0期に区分されている。細胞増殖は、G1期、S期、G2期およびM期の4つのステージを1方向のサイクルで進んでいる (Cobrinik, 2005)。細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼインヒビターの一つであるp27^{kip1}は、G1期で細胞周期を停止させる蛋白質として1994年にクローニングされた (Polyak et al., 1994; Suryadinata et al., 2010; Starostina & Kipreos, 2012)。p27^{kip1}はG0期において核内に蓄積し、細胞周期を促進するサイクリン依存性キナーゼを抑制しており、これまでにp27^{kip1}の強制発現により正常細胞の細胞増殖は停止することが報告されている (Sgambato et al., 1998; Yamamoto et al., 1999)。

テロメアは、染色体の両末端に存在する部分で6塩基 (-TAAGGG-) の反復配列からなる12kbpの塩基配列である (Blackburn, 2001; Blasco, 2005)。DNA複製の際に約50~150bpずつ短縮し (Harley et al., 1990; Iwama et al., 1998; Guan et al., 2007)、テロメアサイズが5000bpに近づくとサイクリン依存性キナーゼインヒビターなどの遺伝子群が発現上昇することにより、細胞増殖を停止させる (von Zglinicki et al., 1995)。Greider & Blackburn (1989) は、テロメア長と細胞の持つ分裂可能回数との間に密接な相関関係があることを明らかにした。生殖細胞、幹細胞およびガン細胞ではテロメラーゼの活性が高く、テロメアが短縮することなく細胞分裂を継続できるのに対し、体細胞ではテロメアは徐々に短縮し、その分

裂回数は規定されている (Bodnar et al., 1998)。

本研究では、歯根膜に存在するマラッセ上皮遺残細胞に細胞増殖傾向があるのか否かを確認し、マラッセ上皮遺残細胞と口腔粘膜上皮細胞を単離・培養して、細胞増殖能、テロメラーゼ活性、さらに幹細胞マーカーの発現を精査することにより、マラッセ上皮遺残細胞における細胞増殖の特異性について検証することを目的とした。

方 法

1. 組織標本の作製

マラッセ上皮遺残の組織標本は、生後6か月齢のブタ小臼歯部を用いた。下顎骨を摘出後、薄切機 (BS3000® Exact, Germany) にて厚さ5mmに薄切後、4%パラホルムアルデヒドにて1週間浸漬固定を行った。組織をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄し、10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて1か月間脱灰を行った後、通法に従いパラフィン包埋し、切片を作製した。切片の一部はマイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学, 東京) にて核染を行い、エオジンY (和光純薬, 大阪) にて染色を施し、他は免疫組織染色に用いた。

2. 免疫組織蛍光染色

パラフィン切片は通法に従い脱パラフィンを行い、10nmol/l, pH6.0のクエン酸ナトリウム緩衝液に浸水し、加圧および加熱して賦活化を行った。0.1Mウシ血清アルブミン (BSA, Invitrogen, OR, USA) 含有PBSにより洗浄し、3%ヤギ血清 (Dako, Denmark) により30分間ブロッキングを行った。一次抗体として1/150に希釈した抗ヒトcytokeratin (CK)-14 mouse monoclonal抗体 (Abcam, Cambridge, UK) および抗ヒトCK-19 mouse monoclonal抗体 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) と、1/250に希釈した抗ヒトp27^{kip1} rabbit polyclonal抗体 (Abcam) を4℃にてオーバーナイトで反応させた。標本は0.1M BSA含有PBSにて洗浄後、二次抗体としてAlexa Flour®488 goat anti-mouse IgGおよび546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) を加え、Dapi Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) にて封入し、共焦点レーザー顕微鏡DIGITAL ECLIPSE C1 (Nikon, 東京) を用いて観察、撮影した。

3. 細胞の単離および培養

マラッセ上皮遺残細胞は、生後6か月齢のブタ小臼歯歯根膜からBrunetteら (1979) の方法に従った。詳細として、細菌感染を回避するためブタ小臼歯および歯肉を5%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (関東化学, 東京) によ

り消毒し、歯肉剥離を行った。抜歯後、歯肉粘膜上皮の混入を防止するため、歯根膜の根尖側1/2を剥離し、outgrowth法にて培養を行った。歯肉も同様にoutgrowth法を行い、歯肉粘膜上皮の培養を行った。outgrowth法にて歯根膜に含まれていたマラッセ上皮遺残の上皮細胞と、同じく歯肉粘膜からの上皮細胞は、2%ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma, MO, USA), 5 µg/ml アムホテリシンB (Sigma), 10% 非働化ウシ胎児血清 (Gibco, NY, USA) 含有 Dulbecco modified Eagle medium (Gibco) で培養し、ディスパーゼ® (合同酒精, 東京) により数回酵素処理して線維芽細胞の完全な除去を行った。得られた上皮細胞はそれぞれマラッセ上皮様細胞、歯肉粘膜上皮様細胞として5回継代を行い、実験に使用した。

4. 細胞増殖能

マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能を測定するために、96穴プレート (AGCテクノグラフ, 静岡) に 1×10^4 個の細胞をそれぞれ播種し、24, 48, 72および96時間培養した。その後、CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit (Life technology, Carlsbad, CA, USA) を使用して、得られたDNA量をInfinite® F200 (Tecan, Seestrasse, Switzerland) で計測した。

5. 統計学的検討

得られた測定値はIBM統計解析ソフトウェアIBM SPSS Statistics (IBM, 東京) にて統計学的検討を行った。統計処理はスチューデントのt検定を用い、危険率が5%未満の場合に有意差ありとした。

6. RT-PCR

幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3と、テロメラーゼのサブユニットである逆転写酵素, Telomere reverse transcriptase (TERT) の発現を確認するためRT-PCRを行った。マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞からTRIZOL® Reagent (Invitrogen) にてtotal RNAを抽出した。その後、Oligo (dT)₁₂₋₁₈プライマー (Gibco) およびSuperScript® II Reverse Transcriptase (Gibco) による逆転写反応を行い、cDNAを作製した。作製したcDNAはAmpliQ Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、プロトコールに従って標的遺伝子の増幅を行った。Nanog, Stat3およびTERTのプライマーは表1に示す。TaKaRa PCR Thermal Cycler (タカラバイオ, 滋賀) を用い、至適条件の下で反応・増幅させた。得られた産物はMidori Green DNA Stain (Genetics,

表1 Stem cell makerの特異的primer配列

Nanog	sense	: 5'-CCGAAGCATCCATTTCCAGCG-3'
	anti-sense	: 5'-GGTATTCTGTACTGGCTGAGCC-3'
Stat3	sense	: 5'-GAAGGGTACATAATGGGCTTTATCAGT-3'
	anti-sense	: 5'-GGGCTTACCCTGATGTCCCTT-3'
TERT	sense	: 5'-GAGGTGCACTGCGACTATGC-3'
	anti-sense	: 5'-AGACTGTTACCTGCAGGTCC-3'

東京) 含有1.5%アガロースゲル (Genetics) にて電気泳動を行い、ライトキャプチャー (AE-6961, アトー, 東京) にて当該バンドを検出した。マーカーはHaeIII (タカラバイオ) を使用し、コントロールとしてハウスキープング遺伝子であるGAPDHの増幅も行った。

結 果

1. マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞におけるcytokeratinおよびp27^{kip1}の発現および局在

マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-14, -19およびp27^{kip1}の発現および局在の観察をするために、免疫組織蛍光染色を行った。CK-14は、歯肉粘膜上皮において錯角化層に特異的に局在を認めるものの、マラッセ上皮遺残では発現が認められなかった (図1 c, d)。一方、CK-19では、マラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞の発現はみられなかった (図1 e, f, g)。p27^{kip1}は、CK-19発現を認めたマラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞では発現しなかった (図1 h, i)。それぞれの組織はヘマトキシリン・エオジン染色にて確認した (図1 a, b)。

2. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能の比較

ブタ歯根膜組織より単離・培養したマラッセ上皮様細胞、およびブタ歯肉より単離・培養した歯肉上皮様細胞において、DNA量で測定するProliferation Assay Kitを使用して細胞増殖能の比較検討を行った。24, 48, 72および96時間で測定した結果、マラッセ上皮様細胞は歯肉上皮様細胞と比較して、24, 48, 72および96時間で有意な細胞増殖を認めた (図2)。

3. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞におけるTERT発現の比較

RT-PCRにてGAPDHのマラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞のバンドを確認後 (図3)、テロメラーゼのサブユニットであるTERTの発現をマラッセ上皮様細胞と歯肉上皮様細胞で比較した。TERTの発現は、歯肉上

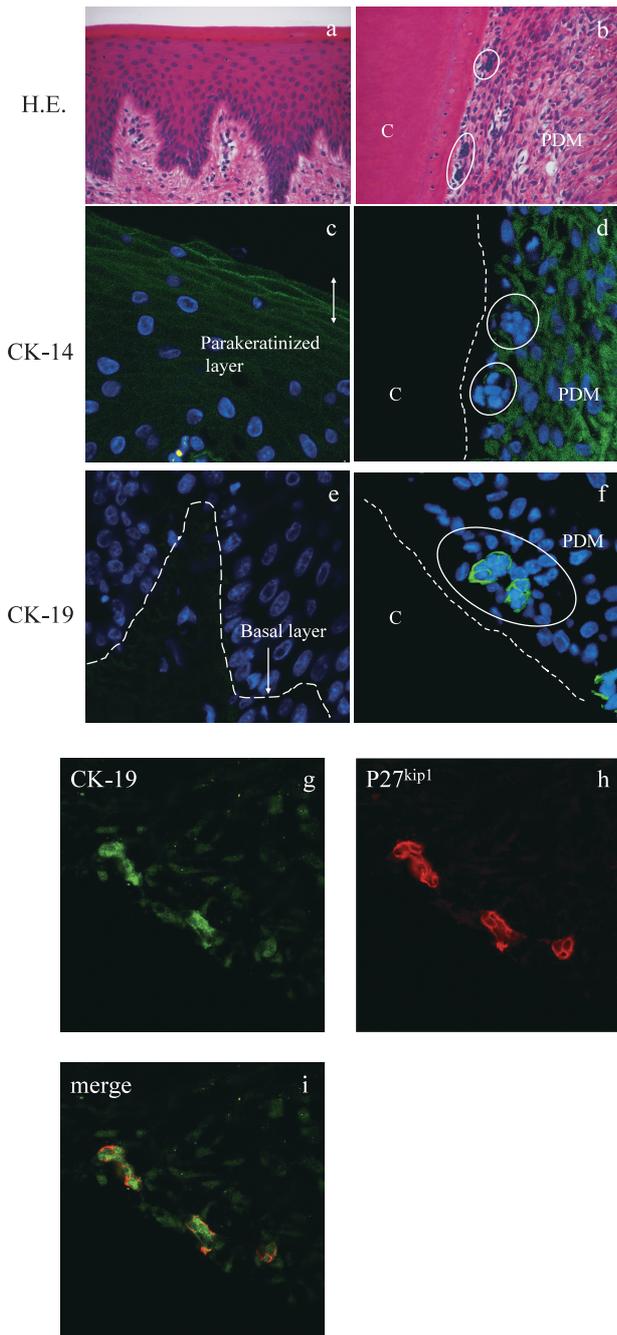


図1 歯肉粘膜上皮細胞およびマラッセ上皮遺残細胞におけるCK-14, -19およびp27^{kip1}の局在. CK-14は歯肉粘膜上皮細胞において錯角化層で発現を認めるものの、マラッセ上皮遺残細胞では発現を認めなかった(c, d). CK-19は歯肉粘膜上皮細胞において発現を認めなかったが、マラッセ上皮遺残細胞では強発現を認めた(e, f). P27^{kip1}はCK-19発現を認めたマラッセ上皮遺残細胞に局在を認めた(g-i). (a: 歯肉粘膜上皮細胞におけるH.E.染色像(×200), b: マラッセ上皮遺残細胞におけるH.E.染色像(×200), c: 歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-14局在, d: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-14の局在, e: 歯肉粘膜上皮細胞におけるCK-19の局在, f, g: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19の局在, h: マラッセ上皮遺残細胞におけるP27^{kip1}の局在, i: マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19(緑)およびP27^{kip1}(赤)の合成像. e-i: 1200倍拡大像)(b, d, f; C: セメント質, PDM: 歯根膜, 円部: マラッセ上皮遺残細胞, 点線: 歯根膜セメント質境界部)

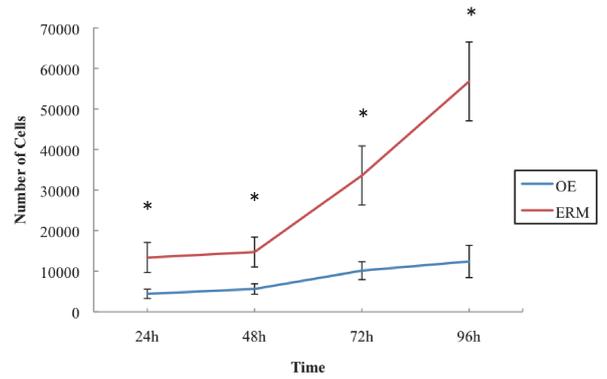


図2 細胞増殖能の測定. 歯肉上皮様細胞(OE)と比較し、マラッセ上皮様細胞(ERM)では全ての時間において有意な細胞増殖を認めた.
*: p<0.05

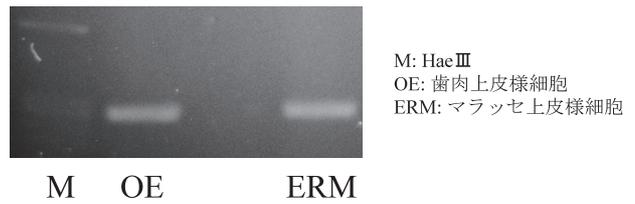


図3 GAPDHの遺伝子発現. OEおよびERMに同程度の発現を認めた.

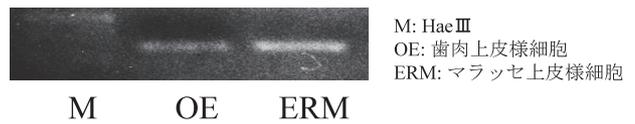


図4 TERTの遺伝子発現. ERMにおいてTERT mRNAの強発現を認めた.

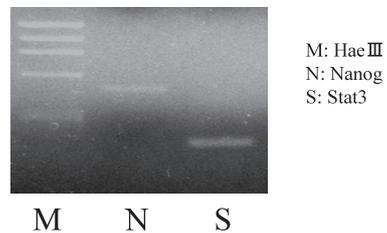


図5 幹細胞マーカーの遺伝子発現の分析. マラッセ上皮様細胞において幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3の発現を認めた.

皮様細胞と比較してマラッセ上皮様細胞で強いシグナルを認めた(図4).

4. マラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現
マラッセ上皮様細胞において、幹細胞マーカーであるNanogおよびStat3の発現についてRT-PCRで確認した。マラッセ上皮様細胞ではNanogおよびStat3の発現を認めた(図5)。

考 察

細胞増殖がみられないマラッセ上皮遺残細胞は、CK-19とp27^{kip1}を発現していた。単離・培養したマラッセ上皮様細胞では歯肉上皮様細胞よりも細胞増殖能が高く、テロメアーゼのサブユニットであるTERTの発現も強かった。また、マラッセ上皮様細胞は幹細胞のマーカーであるNanogおよびStat 3の発現を認めた。

1. マラッセ上皮遺残細胞におけるCK-19とp27^{kip1}の発現

CK-19は分子量40kDの低分子で、ほとんどの単層上皮と非角化扁平上皮に発現することが知られている (Jain et al., 2010)。本結果においてもマラッセ上皮遺残細胞にCK-19の局在が認められた。これまでに、マラッセ上皮遺残細胞がCK-5, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 19に陽性であるとの報告がある (Rincon et al., 2006)。そのため、マラッセ上皮遺残細胞は、様々なCKに陽性の特殊な細胞であることが示唆されている。歯と類似した発生過程を示す毛包細胞で、毛隆起部の基底細胞がCK-19陽性を示し (Demirkesen et al., 1995)、リボソームに富み未分化であることから毛隆起部細胞が幹細胞である可能性を示唆している (Akiyama et al., 1995)。Cotsarelisら (1990) は、マウスの皮膚組織に³H-thymidineを取り込ませ、成長期毛包において立毛筋付着付近の毛隆起部である毛包上皮突出部に³H-thymidine標識が長時間残留する細胞群をslow-cycling cellとみなした。また、Okaら (2012) は、マウスの歯胚形成過程にBromodeoxyuridineを投与し、マラッセ上皮遺残細胞において長期間残留していたことから、マラッセ上皮遺残細胞をslow-cycling cellとし休止期上皮幹細胞と位置づけている。slow-cycling cellは増殖が抑制された細胞群であり、何らかの影響を受けて活性化され増殖する幹細胞であると想定している。Yangら (1993) は、ヒト毛包細胞を組織培養し、毛隆起部からの上皮細胞の増殖が他の部位と比較して著しいことを示している。本結果において、毛包組織の毛隆起部上皮細胞と同様に、マラッセ上皮遺残細胞はCK-19を発現し、さらに細胞周期を制御するサイクリン依存性キナーゼインヒビターであるp27^{kip1}の発現も認めた。細胞質p27^{kip1}はRhoAの活性化阻害薬との報告がある (Assoian, 2004)。Rhoファミリーは、細胞形態の主な制御因子であり (Etienne-Manneville & Hall, 2002)、Rhoサブクラスの活性化の阻害は細胞分裂を抑制することがいわれている (Morii et al., 1992)。そのため、歯根膜で周囲と孤立し一塊で存在するマラッセ上皮遺残は、増殖傾

向を示さないことから、休止期であるG0期に停滞し、さらに幹細胞のようにslow-cycling cellであると考えられる。

2. マラッセ上皮様細胞の細胞増殖能とTERTの発現

本結果において、マラッセ上皮遺残より単離・培養したマラッセ上皮様細胞は、歯肉粘膜上皮から得た歯肉上皮様細胞と比較して高い増殖能を示した。歯肉などの口腔粘膜上皮は、基底細胞から表層まで分化し剥離脱落するターンオーバー期間が、通常9~12日である (下野, 2011)。歯の発生は、胎生期において口腔上皮の陥入から開始されるため、マラッセ上皮遺残細胞も本来は口腔上皮細胞由来であるが、これまでの歯肉粘膜上皮細胞とマラッセ上皮遺残細胞の比較において、それぞれ似て非なる細胞であると考えられている (Rincon et al., 2006; Kurashige et al., 2008)。生殖細胞や幹細胞はテロメアーゼ活性が高いため、細胞分裂を重ねてもテロメア長を維持することができる (Günes & Rudolph, 2013)。テロメアーゼは逆転写酵素であるTERT、内在性RNA鋳型およびDyskerinなどの関連タンパク質によりサブユニットを構成し、テロメアの安定化に寄与している (Smogorzewska & de Lange, 2004; Gu et al., 2009)。TERTの発現量はテロメアーゼ活性を反映し、多くの実験に用いられている。本結果では、マラッセ上皮様細胞は歯肉上皮様細胞と比較してTERTの発現量が高いため、幹細胞の特性を有している可能性が示唆された。

3. マラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現

マラッセ上皮様細胞において、RT-PCRによりNanogの発現が認められた。Nanogはホメオドメインタンパク質であり (Mitsui et al., 2003)、胚性幹細胞 (ES細胞) のマーカーの一つとして用いられている。Namら (2011) は、マラッセ上皮様細胞において上皮幹細胞マーカーおよびNanogを含むES細胞マーカーの発現を報告しており、マラッセ上皮遺残細胞は初期幹細胞を含んでいることを示唆した。マウスES細胞において多能性を維持するためには、Leukemia inhibitory factor (LIF)が必要であり、LIFを培地から取り除くとES細胞はたちまち分化を始めてしまう (Park et al., 2011)。LIFは幾つかのシグナル経路を介して、多能性を維持する転写因子であるSox2、NanogおよびOct3/4を制御していると考えられているが詳細は不明である (Griffiths et al., 2011)。近年、LIFの非存在下でも、NanogあるいはStat3を過剰発現することで、マウスES細胞の多能性を維持できることが明らかになった (Guo et al., 2009; Guo & Smith,

2010). 本結果において, マラッセ上皮様細胞はNanogおよびStat3を発現しており, マラッセ上皮様細胞の特異性が明らかとなった.

結 論

マラッセ遺残上皮細胞は, 口腔上皮が原基となり歯形成期間から長期間消失せずに存在している. *in vivo*において, マラッセ遺残上皮細胞はCK-19およびp27^{kip1}を特異的に発現しているため, 歯肉粘膜上皮とは異なった細胞分化および増殖過程にある. マラッセ遺残上皮細胞は, 通常増殖することなく歯根膜で周囲と孤立し一塊で存在しており, p27^{kip1}を発現しているため, 生体内においてG0期の細胞休止期にあることが示された. マラッセ遺残上皮細胞より単離・培養したマラッセ上皮様細胞は増殖傾向が強く, TERTの発現増強を認め, さらにNanogおよびStat3などの多能性維持遺伝子の発現を認めることから, マラッセ遺残上皮細胞は幹細胞の特性を有することが示唆された.

文 献

- Agostini T, Sacco R, Bertolai R, Acocella A, Colafranceschi M & Lazzeri D. Peri-implant squamous odontogenic tumor. *J Craniofac Surg* 22 : 1151-1157, 2011.
- Akiyama M, Dale BA, Sun TT & Holbrook KA. Characterization of hair follicle bulge in human fetal skin : the human fetal bulge is a pool of undifferentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105 : 844-850, 1995.
- Assoian RK. Stopping and going with p27kip1. *Dev Cell* 6 : 458-459, 2004.
- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106 : 661-667, 2001.
- Blasco MA. Telomeres and human disease : ageing, cancer, and beyond. *Nat Rev Genet* 6 : 611-622, 2005.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S & Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 : 349-352, 1998.
- Brunette DM, Heersche JN, Purdon AD, Sodek J, Moe HK & Assuras JN. In-vitro cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine rests of Malassez. *Arch Oral Biol* 24 : 199-203, 1979.
- Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24 : 2796-2809, 2005.
- Cotsarelis G, Sun TT & Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit : implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61 : 1329-1337, 1990.
- Demirkesen C, Hoede N & Moll R. Epithelial markers and differentiation in adnexal neoplasms of the skin : an immunohistochemical study including individual cytokeratins. *J Cutan Pathol* 22 : 518-535, 1995.
- Etienne-Manneville S & Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420 : 629-635, 2002.
- Greider CW & Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337 : 331-337, 1989.
- Griffiths DS, Li J, Dawson MA, Trotter MW, Cheng YH, Smith AM, Mansfield W, Liu P, Kouzarides T, Nichols J, Bannister AJ, Green AR & Göttgens B. LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease. *Nat Cell Biol* 13 : 13-21, 2011.
- Gu B, Bessler M & Mason PJ. Dyskerin, telomerase and the DNA damage response. *Cell Cycle* 8 : 6-10, 2009.
- Guan JZ, Maeda T, Sugano M, Oyama J, Higuchi Y & Makino N. Change in the telomere length distribution with age in the Japanese population. *Mol Cell Biochem* 304 : 353-360, 2007.
- Guo G & Smith A. A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development* 137 : 3185-3192, 2010.
- Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W & Smith A. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136 : 1063-1069, 2009.
- Günes C & Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell* 152 : 390-393, 2013.
- Harley CB, Futcher AB & Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345 : 458-460, 1990.
- Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, Toyama K, Hoshika A, Takasaki M, Mori M & Shay JW. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102 : 397-402, 1998.
- Jain R, Fischer S, Serra S & Chetty R. The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18 : 9-15, 2010.

- Kurashige Y, Saitoh M, Nishimura M, Noro D, Kaku T, Igarashi S, Takuma T, Arakawa T, Inoue T & Abiko Y. Profiling of differentially expressed genes in porcine epithelial cells derived from periodontal ligament and gingiva by DNA microarray. *Arch Oral Biol* 53 : 437-442, 2008.
- Lin LM, Huang GT & Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod* 33 : 908-916, 2006.
- Luan X, Ito Y & Diekwisch TG. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev Dyn* 235 : 1167-1180, 2006.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113 : 631-642, 2003.
- Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F & Narumiya S. A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J Biol Chem* 267 : 20921-20926, 1992.
- Nam H, Kim J, Park J, Park JC, Kim JW, Seo BM, Lee JC & Lee G. Expression profile of the stem cell markers in human Hertwig's epithelial root sheath/Epithelial rests of Malassez cells. *Mol Cells* 31 : 355-360, 2011.
- Oka K, Morokuma M, Imanaka-Yoshida K, Sawa Y, Isokawa K & Honda MJ. Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur J Oral Sci* 120 : 484-494, 2012.
- Park Y, Kim JH, Lee SJ, Choi IY, Park SJ, Lee SR, Sung HJ, Yoo YD, Geum DH, Choi CW, Kim SH & Kim BS. Human feeder cells can support the undifferentiated growth of human and mouse embryonic stem cells using their own basic fibroblast growth factors. *Stem Cells Dev* 20 : 1901-1910, 2011.
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P & Massagué J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78 : 59-66, 1994.
- Rincon JC, Young WG & Bartold PM. The epithelial cell rests of Malassez--a role in periodontal regeneration? *J Periodontal Res* 41 : 245-252, 2006.
- Sgambato A, Zhang YJ, Ciaparrone M, Soh JW, Cittadini A, Santella RM & Weinstein IB. Overexpression of p27^{Kip1} inhibits the growth of both normal and transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 58 : 3448-3454, 1998.
- 下野正基. 新編治癒の病理. 医歯薬出版, 2011.
- Smogorzewska A & de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73 : 177-208, 2004.
- Starostina NG & Kipreos ET. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol* 22 : 33-41, 2012.
- Suryadinata R, Sadowski M & Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep* 30 : 243-255, 2010.
- Yamamoto H, Soh JW, Shirin H, Xing WQ, Lim JT, Yao Y, Slosberg E, Tomita N, Schieren I & Weinstein IB. Comparative effects of overexpression of p27^{Kip1} and p21 Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18 : 103-115, 1999.
- Yang JS, Lavker RM & Sun TT. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *J Invest Dermatol* 101 : 652-659, 1993.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W & Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence? *Exp Cell Res* 220 : 186-193, 1995.



倉重 圭史

平成15年 3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成19年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成19年 4月 北海道医療大学口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野 助教

平成22年 4月 同上 講師

〔症例報告〕

腫瘍性病変を思わせた上顎骨巨細胞腫の1例

佐藤 惇¹⁾, 淀川慎太郎³⁾, 佐藤 健彦³⁾, 北所 弘行²⁾, 永易 裕樹²⁾,
柴田 考典³⁾, 有末 眞²⁾, 吉田 光希¹⁾, 西村 学子¹⁾, 安彦 善裕¹⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野
2) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野
3) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野

A case of Giant Cell Tumor of Maxilla considered to be neoplastic lesions

Jun SATO¹⁾, Shintarou YODOGAWA³⁾, Takehiko SATO³⁾, Hiroyuki KITAJYO²⁾, Hiroki NAGAYASU²⁾,
Takanori SHIBATA³⁾, Makoto ARISUE²⁾, Koki YOSHIDA¹⁾, Michiko NISHIMURA¹⁾ and Yoshihiro ABIKO¹⁾

- 1) Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
2) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
3) Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

A case of giant cell tumor of Maxilla in a 15 year-old is reported.

The patient was brought to our Hospital with chief complaint of swelling of maxillary gingiva. After various examinations, removal of tumor was carried out by resection of maxilla under general anesthesia. Histopa-

thologically, giant cell tumor was confirmed. No tumor recurrence has occurred during 1year 6months of follow-up.

In general, more than 75% of giant cell tumors of the bone are situated at or near the end of a long tubular bone so at the orofacial region it is a rare disease.

Key words : Giant Cell Tumor, Maxilla

緒 言

巨細胞腫は、一般的に長管骨の骨端部、特に大腿骨遠位端や脛骨近位端に好発する良性の腫瘍である (Andrew, 1979)。顎骨内での発生は極めて稀であり、多くは真の腫瘍というよりは巨細胞性修復肉芽腫の範疇に入ると考えられている (de Lange et al., 2000)。今回われわれは、15歳女性の上顎骨に発生した腫瘍性病変を思わせた巨細胞腫の1例を経験したので、その概要を報告する。

症 例

患者：15歳，女子。

初診：2012年4月中旬。

主訴：145部の歯肉腫脹。

受付：平成25年10月24日 受理：平成25年11月21日

既往歴：半月板損傷により、近医整形外科記念病院で全麻下にて手術を施行した。

家族歴：特記事項なし。

現病歴：2012年1月頃より、145部の歯肉腫脹を自覚していたが疼痛がなかったため放置していた。その後、徐々に同部の腫脹と軽度の疼痛を認めるようになり、近医歯科を受診したところ、X線写真において145部から上顎洞に達するX線不透過像を指摘され、精査加療を目的に当科初診となった。

現症：口腔外所見は、顔貌は左側上唇から鼻翼基部、頬部にかけて軽度の腫脹があり、鼻閉感はなく、左側眼窩下神経支配領域に知覚異常は認められなかった (図1)。また、頸部リンパ節の腫大や圧痛も認められなかった。口腔内所見は、145相当部の歯槽部に圧痛を伴う膨隆を認めたが、13, 4, 5, 6 (7は未萌出)の打診痛



図1 初診時顔貌写真

左側上唇から鼻翼基部，頬部にかけて軽度の腫脹があり，鼻閉感はなく，左側眼窩下神経支配領域に知覚異常は認められなかった。



図2 初診時口腔内写真（ミラー像）

┃45 相当部の歯槽部に圧痛を伴う膨隆を認めたが（矢印），┃3,4,5,6（7は未萌出）の打診痛や歯牙の動揺はなく，歯髄電気診ではいずれも生活反応を示した。

や歯牙の動揺はなく，歯髄電気診ではいずれも生活反応を示していた（図2）。全身所見は，栄養状態は良好であり，血液検査では異常は認められなかった。

画像所見：パノラマX線像では，┃45 相当部の歯槽骨より上顎洞にかけて類円形の不透過性病変を認め，病変による┃45 歯根離開を伴っていたが，歯根吸収はみられなかった（図3）。CT像では，上顎洞内の単房性病変は，内部は均一な軟組織様不透過像（CT値：35HU）を示しており，上顎洞底を挙上し，歯槽部では頬側，口蓋

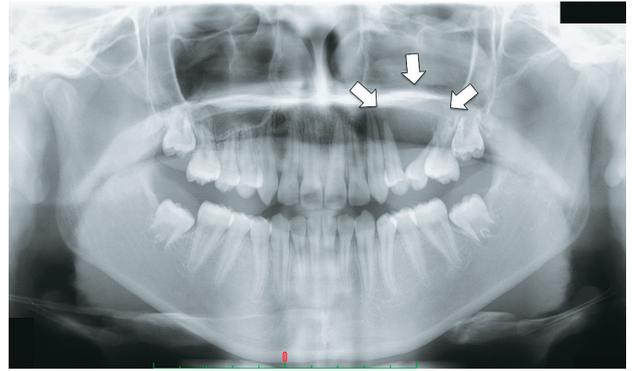


図3 パノラマX線写真

┃45 相当部の歯槽骨より上顎洞にかけて類円形の不透過性病変を認め，┃45 の歯根離開を伴っていたが，歯根吸収はみられなかった（矢印）。



図4 CT画像

左側上顎洞内に，単房性で内部が均一な軟組織様不透過像（CT値：35HU）がみられた。病変は周囲との境界は比較的明瞭であるが，一部，歯槽部口蓋側では病変に接する骨面は粗造であった。左側上顎洞前壁は病変により膨隆，菲薄化しており，一部に骨欠損が認められた（矢印）。また病変内部は，不均一な造影効果を認めた。

側ともに骨は菲薄化し膨隆しているとともに一部骨欠損を認めた。病変は周囲との境界は比較的明瞭であるが，一部，歯槽部口蓋側では病変に接する骨面は粗造であった。また，左側上顎洞前壁は病変により膨隆，菲薄化しており，一部に骨欠損が認められた。また病変内部は，不均一な造影効果を認めた（図4）。

胸部CT像では異常陰影は認めず，またFDG-PET検査においては左側上顎に異常集積を認めたが他臓器には異常集積像は確認されなかった。

臨床診断：左側上顎骨腫瘍

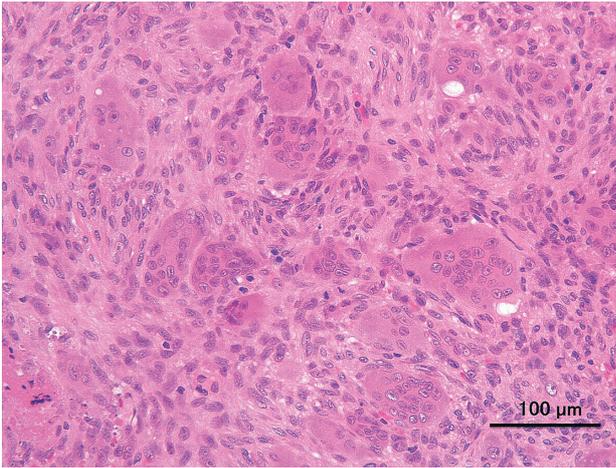


図5 生検時病理組織像 (H. E染色)

腫瘍内には多数の多核巨細胞の集積が認められる。間質には異型に乏しい単核の紡錘形細胞が密に増殖している。

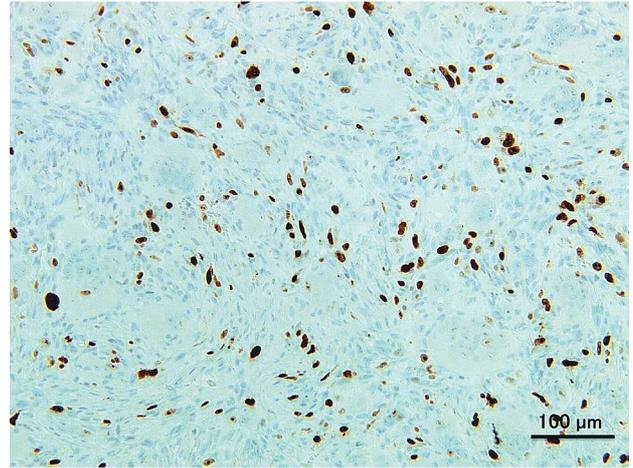


図7 生検時Ki67免疫組織化学染色像

巨細胞の周囲を占める単核で紡錘形の間葉性細胞の細胞核に、Ki67陽性のものが認められる。また一部の巨細胞の核においてもKi67に陽性反応を示しているものがみられる。

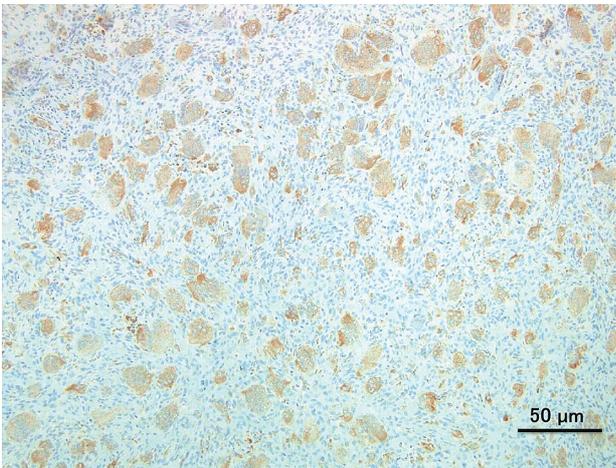


図6 生検時CD68免疫組織化学染色像

組織球のマーカーであるCD68に陽性の巨細胞が多数、かつ比較的均一に増殖している像が認められる。



図8 摘出標本写真

大部分が被膜に覆われた65×35mm大の充実性腫瘍で、弾性軟、褐色を呈していた。

生検時病理組織学的所見：左側上顎骨腫瘍の臨床診断にて生検を行ったところ、多核巨細胞と単核の紡錘形細胞が密に増殖している像が認められた(図5)。また免疫組織化学染色において、CD68に陽性の多数の巨細胞が均一にみられ(図6)、Ki-67では一部の巨細胞の核、および多数の単核の短紡錘形細胞に一致して陽性所見が認められたことから(図7)、巨細胞腫の病理組織学的診断を得た。

処置および経過：入院により、術前検査をした後、全身麻酔下に上顎骨部分切除術を施行した。1から6にかけて、横切開を、また3と6に縦切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離回転すると、4.5相当の歯槽部から上顎骨前壁にかけて一部骨欠損がみられ、同部より腫瘍が露出している状態であった。上顎洞方向では、腫瘍を周囲組織から剥離をすすめ、歯槽部では、病変周囲

の安全域を5mmと設定し、超音波切削器具にて骨切離を行った。その後、腫瘍は45を含めた歯槽骨と、上顎洞粘膜を含めて一塊として摘出された。摘出骨腔は、ラウンドバーにて一層の骨削を行い、粘膜骨膜弁を復位させて閉鎖創とし、手術終了とした。なお、対孔形成は行わず、口腔側にベンローズドレーンを留置した。摘出物は65×35mm大で、大部分が被膜で覆われた充実性腫瘍で、弾性軟、褐色を呈していた(図8)。術後1年6ヶ月が経過したが再発はみられない。

病理組織学的所見：腫瘍組織は、比較的均一に多数の多核巨細胞がみられ細胞間を埋めるように異型に乏しい単核の短紡錘形細胞の密な増殖が認められた。また巨細胞内の核数は極めて多く一つあたり30～40個を超えるものも多数みられ、明らかな炎症性変化はみられなかったこ

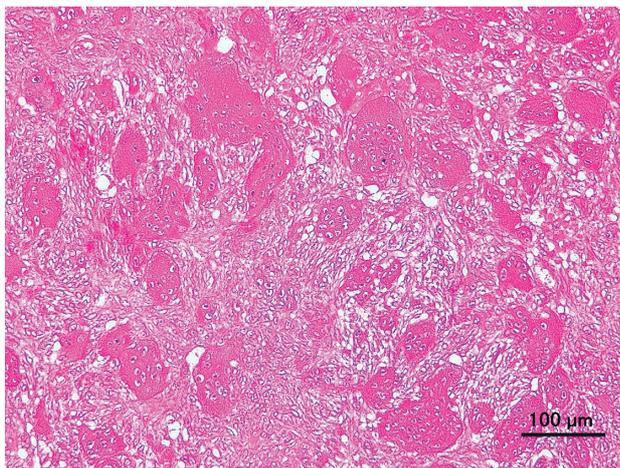


図9 摘出標本病理組織像 (H. E染色)

極めて多い核数を有する、多数の多核巨細胞が比較的均一にみられ、巨細胞の細胞間には異型に乏しい単核の短紡錘形細胞の密な増殖が認められる。

とから、腫瘍性病変の範疇と考えられた (図9)。

病理組織学的診断：巨細胞腫

考 察

顎骨に発生する巨細胞性病変は極めて稀であり、発生頻度は0.00011%と報告されている (de Lange et al., 2000)。巨細胞性病変には、巨細胞性肉芽腫、巨細胞腫、褐色腫およびケルビズムが挙げられる (de Lange et al., 2000)。褐色腫は副甲状腺機能亢進を伴い、血清カルシウムおよびアルカリフォスファターゼの増加、血清リンの減少を認める (Wilson et al., 2013)。本症例では、血液、生化学検査に異常は認められなかったことより、褐色腫は否定された。また、ケルビズムは小児期にみられ、家族性に発症しいわゆる“ケルビズム様顔貌”を特徴とするが (伊藤ら, 1980)、本症例はこれに当てはまらないことから、ケルビズムも除外された。腫瘍性病変である巨細胞腫と、巨細胞肉芽腫との鑑別はしばしば困難なことがある。巨細胞腫は腫瘍性病変で、顎骨よりも大腿骨や脛骨などに多く、好発年齢は20~40歳で、やや女性に多い傾向にあると言われている (Turcotte, 2006)。一方、巨細胞肉芽腫は、外傷や出血の修復過程に生じる反応性病変と考えられているが、成因は明らかにされていない。好発部位は下顎骨で、10~20歳代に多いと言われている (Motamedi et al., 2007)。巨細胞腫では、巨細胞肉芽腫よりも好発年齢がやや高い。組織学的には、いずれも線維芽細胞様の紡錘形細胞の増殖を背景に、多核巨細胞の出現を特徴とするが、巨細胞腫では、巨細胞肉芽腫に比べ巨細胞の外形が大きく、細胞数や核数も多く、分布が均一であると言われている。また、後

者では炎症性細胞浸潤や出血層、新生骨量の形成があることなどが鑑別となると言われている (Reid et al., 2002)。本症例では、生検においてマクロファージおよび破骨細胞に陽性反応を示すCD68免疫組織化学染色にて多数の巨細胞が比較的均一にみられたこと、細胞内の核数が30~40個を超えるものも散見されたこと、炎症性変化や出血層のみられなかったこと、また細胞増殖能のマーカーであるKi67免疫組織化学染色にて陽性細胞が多かったことから、肉芽腫性病変よりも腫瘍性病変とみなし、巨細胞腫の診断のもと検査、手術を行った。

骨巨細胞腫は、クーパーによって1818年に始めてその疾患概念が報告されたものであり、骨腫瘍の3~9%を占める良性腫瘍である。顎骨では下顎骨での報告が多く (Park et al., 2012)、上顎骨での報告は極めて少ない (Baker et al., 2008)。本腫瘍は良性であっても局所侵襲性であり、再発率が高く、まれに遠隔転移をきたすと言われている。局所再発率は10~40%で、遠隔転移率は数%程度と報告されている (Andrew, 1979; Reid et al., 2002)。治療法は原則、外科的切除を行う。部位的に切除困難な症例では、搔爬術などに放射線照射を併用する場合もある (Schwartz et al., 1989)。本症例では、腫瘍であるとの診断から全身精査を行ったが、転移はみられなかった。可能な限り広範囲な切除を行いながらも、年齢や性別を考慮し、口蓋骨を一層残した状態までの手術とした。

巨細胞腫は巨細胞肉芽腫との鑑別が容易ではない疾患であるが、巨細胞腫はしばしば侵襲性であることから、十分な全身精査と、可能な限り広範囲な切除とその後の注意深い経過観察が必要であると思われる。

結 語

15歳女性の上顎に発生した極めてまれな巨細胞腫の一例を報告した。

文 献

- Andrew G. Bone Tumors Diagnosis -Treatment and Prognosis. USA: W. B Saunders Company; 1979, p265-291.
 伊藤秀夫, 高橋庄二郎, 塩田重利, 宮崎 正. 硬組織の疾患. 口腔病変診断アトラス, 医歯薬出版: 1980, p 144.
 Baker SB, Parikh PM, Rhodes DN, Abu-Ghosh A, Shad AT. Aggressive central giant cell lesion of the maxilla: surgical management and the use of adjuvant interferon alfa-2a. *Plast Reconstr Surg* 122: 77e-79e, 2008.
 de Lange J, van den Akker HP, Klip H. Incidence and

disease-free survival after surgical therapy of central giant cell granulomas of the jaw in The Netherlands : 1990-1995. *Head Neck* 26 : 792-795, 2004.

Motamedi MH, Eshghyar N, Jafari SM, Lassemi E, Navi F, Abbas FM, Khalifeh S, Eshkevari PS. Peripheral and central giant cell granulomas of the jaws : a demographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103 : e39-43, 2007.

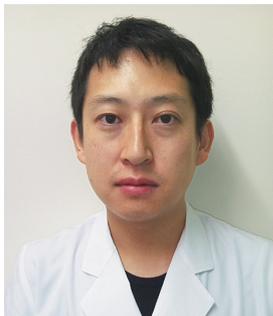
Park SR, Chung SM, Lim JY, Choi EC. Giant cell tumor of the mandible. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 5 : 49-52, 2012.

Reid R, Banerjee SS, Sciort R. Giant cell tumor. In : World health organization classification of tumours. Tumours of soft tissue and bone, Fletcher CD, Unni KK, Mertens F (Eds) : 310, 2002.

Schwartz LH, Okunieff PG, Rosenberg A, Suit HD. Radiation therapy in the treatment of difficult giant cell tumors. *Int Radiation Oncology Biol Phys* 17 : 1085-1088, 1989.

Turcotte RE. Giant cell tumor of bone. *Orthop Clin North Am* 37 : 35-51, 2006 .

Wilson JJ, Schwartz HC, Tehrani GM. Brown tumor of the posterior maxilla as initial manifestation of primary hyperparathyroidism : case report. *J Oral Maxillofac Surg* 71 : 886-890, 2013.



佐藤 惇

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

略歴

平成18年 3月 北海道医療大学歯学部卒業
 平成19年 4月 北海道医療大学大学院歯学研究科入学
 平成23年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了・学位取得
 平成23年 4月 北海道医療大学 特別研究員
 平成23年10月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野 助教
 平成25年 7月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野 講師
 現在に至る

〔症例報告〕

舌痛症患者に対して、若手歯科医医師が臨床心理士にスーパーバイズを受けながら認知行動療法を行い症状が軽快した1例

佐藤 英樹¹⁾²⁾, 松岡 紘史³⁾⁴⁾, 吉田 光希¹⁾²⁾, 森谷 満⁵⁾, 宇津宮雅史²⁾,
永易 裕樹⁶⁾, 川上 智史⁷⁾, 坂野 雄二⁸⁾, 千葉 逸朗³⁾, 安彦 善裕¹⁾²⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野
- 2) 北海道医療大学病院「口腔内科相談外来」
- 3) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野
- 4) 北海道医療大学病院医療心理室
- 5) 北海道医療大学個性差医療科学センター
- 6) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野
- 7) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系高度先進保存学分野
- 8) 北海道医療大学心理科学部

Cognitive behavioral therapy for glossodynia conducted by dentist :
a case report

Hideki SATOH¹⁾²⁾, Hirofumi MATSUOKA³⁾⁴⁾, Koki YOSHIDA¹⁾²⁾, Mitsuru MORIYA⁵⁾,
Masafumi UTSUNOMIYA²⁾, Hiroki NAGAYASU⁶⁾, Tomofumi KAWAKAMI⁷⁾, Yuji SAKANO⁸⁾,
Itsuo CHIBA³⁾, Yoshihiro ABIKO¹⁾²⁾

- 1) Division of Oral Medicine & Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Division of Oral Medicine Consultation, Health Sciences University of Hokkaido Hospital
- 3) Department of Oral Growth & Development, Division of Disease Control & Molecular Epidemiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 4) Division of Medical Psychology, Health Sciences University of Hokkaido Hospital
- 5) Institute of Personalized Medical Science, Health Sciences University of Hokkaido
- 6) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 7) Division of General Dental Sciences I, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 8) School of Psychological Science, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The present case study reports a case of a patient with burning mouth syndrome that was treated with cognitive behavioral therapy conducted by a dentist. The patient was a female aged in the 30s. The treatment was conducted by a dentist with two years clinical experience who was a non-specialist in cognitive behavioral therapy. The burning symptoms of the patient improved through treatment based on a program where

the effect on glossodynia was demonstrated in previous research conducted under the supervision of a clinical psychologist with specialized cognitive behavioral therapy. These results indicate that environmental coordination including a program to fully explicate and detail the therapeutic regimen and supervision allowed the dentist to conduct the cognitive behavioral therapy of glossodynia.

Key words : Glossodynia, Cognitive behavioral therapy, Dentist, Clinical psychologist

緒 言

舌痛症は、一般的に他覚的所見を否定されているにも

関わらず舌の痛みの持続する疾患とされる。国際的には口腔灼熱感症候群（Burning mouth syndrome）とよばれ、舌痛症を引き起こす局所および全身性の疾患が否定

受付：平成25年9月30日 受理：平成25年12月6日

される状態であると定義づけられている (Headache Classification Committee of the International Headache Society, 1999). 発症頻度は全人口の1~5%にまで及ぶといわれ (Lopez-Jornet et al., 2010; Matsman-Tsikhin et al., 2007), 口腔内に症状を訴える疾患の中では発生頻度の高い疾患である. 舌痛症の特徴として, 持続性の痛み以外に, 痛む場所が時間により移動する傾向や, 摂食や会話中に痛みが消失する傾向, 痛み以外のことに集中している場合に痛みが和らぐ傾向などがあげられる (豊福, 2006). 治療法としては抗うつ薬, 抗てんかん薬, カプサイシン, α リポ酸, 認知行動療法 (Cognitive Behavioral Therapy, 以下CBT) などが行われてきた (de Moraes et al., 2012; Zakrzewska et al., 2005). 当院では現在, 舌痛症患者への治療法の1つとしてCBTを取り入れている (安彦ら, 2009; Matsuoka et al., 2010; 松岡ら, 2012). CBTは, その実施に際して訓練を要するため, 主に精神科医や臨床心理士によって行われているが, 舌痛症患者の多くが歯科を受診することを考えると, 舌痛症患者においては歯科医師によりCBTが実施されることが望ましい. 今回われわれは, CBTを専門としていない, 歯学部卒業後, 続けて1年間の卒後研修を終了し, 2年の臨床経験のある歯科医師が, CBTを専門とする臨床心理士による定期的な指導・助言 (スーパーバイズ) を受けながら, 舌痛症患者に歯科医師自らCBTを行い, 疼痛の軽減がみられた症例を経験したので報告する.

症 例

患者: 30代女性, 主婦

初診日: H24年6月

主訴: 舌が痛い

患者背景・家族構成: H19年夫と離婚. 現在高1の娘と中3の息子と3人暮らし

既往歴: たび重なる夫のDVが原因で離婚調停中の6年前, 精神的に疲弊したため精神科に通院したところ, うつ病と診断された. この時大量の向精神薬が精神科より処方されたが, 量を見て服用が怖くなり全く服用しなかった. 精神症状は5年前の離婚成立で緩解したが, 子育ての責任感から苦悩が増し, めまいと胃痛が出現した. 耳鼻科および内科を受診しメニエール病, 逆流性食道炎の診断を受けたが, 薬物治療は行われなかった.

現病歴: 初診1ヶ月前から舌の両側の縁にピリピリとした痛みが出現した. 激痛ではなく, 神経に触る感じで, ピリピリした不快な痛みであった. 他院耳鼻科を受診したがカンジダ検査は陰性であり器質的な問題はみられな



図1 初診時の舌の写真

いと言われ未処置のまま放置していた. その後, 当院ホームページをみて, 舌の痛みは舌痛症ではないかと心配になり当科を来院した.

現症: 口腔外所見としては顔面は左右対称で, 発赤・腫脹はみられなかった. 口腔内所見において口腔内は湿潤しており, 口腔衛生状態は良好であり, 舌背部糸状乳頭もみられ, わずかに舌苔の付着を認めるのみで, 器質的な変化はみられなかった (図1). State-Trait Anxiety Inventory-JYZ (STAI: 肥田野ら, 2000) は状態不安67点, 特性不安67点, と非常に高い不安傾向がみられたが, 問診よりうつ病, 不安障害を疑わせる言動は認められなかった.

臨床診断: 心因性舌痛症

治療及び経過 (図2): 初診時には, 継続的な舌の痛みが認められ, 昼から夜にかけて灼熱感を伴った痛みがある, 舌の痛む部位は左の縁や右側の縁など変化し強さも日によって変化する, 舌の痛みは食事中や家事など何かに集中している時は感じないなど舌痛症の特徴を多く満

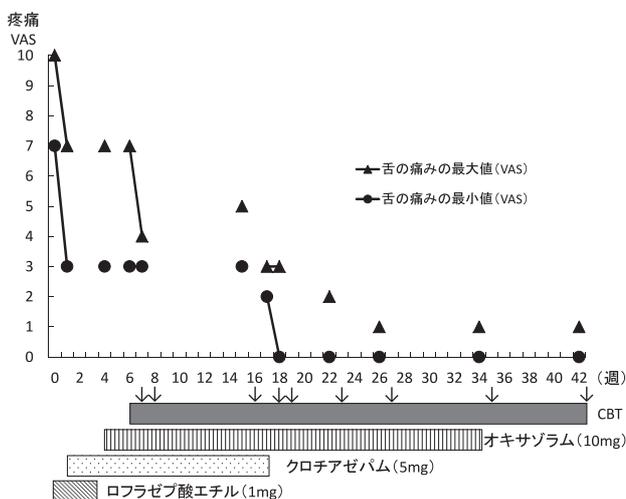


図2 症例の治療経過

注 「↓」は臨床心理士とスーパーバイズが行われた時期を示している.

たしていた。

精神面においては、人前に出ると緊張して手や声が震える、ネガティブで自分に自信がなく、他人に気を使いすぎて気疲れしてしまう、心配性で落ち込むと立ち直るのに時間がかかるなど不安傾向が強い性格であった。うつ傾向はほとんどみられなかった。

H24年3月より就職活動を開始したが、5月になって就職先が決まらない苛立ちや焦りで不安が増大していた。また就職活動中の4月より長女が遠方の高校に入学し、今までより1時間早く起床しなければならないストレスも加わっており、舌の痛みが出現したと考えられた。

問診、舌の器質的疾患は否定的であったこと、口腔内所見等を総合的に考え舌痛症と診断した。そこで器質的疾患は否定的であることを説明し、舌痛症の治療法として薬物療法とCBTがあることも説明に加えた。患者自身も自分の症状が舌痛症ではないかと思っていたため説明に納得している様子であった。

初診時は症状の緩和を期待し、ロフラゼブ酸エチル(1mg/日、1×夕食後)を処方し、眠気などの副作用が強い場合には半錠で服用するように指導した。

1週間後(H24年6月)、ロフラゼブ酸エチルを半錠服用し続けたことで、普段の舌の痛みはNumerical Rating Scale (NRS, Uki et al., 1998, 0:痛みなし-10:これ以上の痛みは考えられない)による評価で初診時の10点から3点に7ポイント減少していた。しかしながら舌の痛みの強さには波があり、痛みが悪化した時はNRSで7点程度の痛みであった。痛みの悪化は2日に1度みられた。そこでロフラゼブ酸エチル半錠に加え、痛みが悪化しやすい夜間にクロチアゼパム(5mg/日、1×寝る前に)を追加で服用してもらい経過観察とした。

3週間後(H24年7月)、舌の痛みの強さはクロチアゼパムを疼痛悪化時に服用するとNRSで3点まで和らぐが、2～3日に一度はNRSで7点程度の疼痛を変わず経験していた。患者自身が抗不安薬を長期服用することに抵抗感を持っていたため、治療の主体を薬物療法からCBTへと変更することとした。そこでロフラゼブ酸エチルを中止し、頓服でクロチアゼパムとオキサゾラムの処方へと変更し、2週間後の次回受診時からCBTを開始することとした。CBTは、過去の研究で一定の効果が示されているプログラム(松岡ら, 2012, 表1)の内容に基づき実施し、実施中は、来院のたびに認知行動療法を専門とする臨床心理士によるスーパーバイズを行った。スーパーバイズの際には、直近の診察内容を振り返り、歯科医師によって提案された治療内容を臨床心理士が確

表1 舌痛症に対する認知行動療法プログラム

治療内容
● 舌痛症に対する心理教育
● 筋弛緩法
● 症状のセルフモニタリング
● ディストラクション
● 自動思考の評価
● 適応的思考の生成

認し、修正が必要とされる場合は適宜治療法の提案を行った。

CBTは、患者の行動や認知に焦点を当てて問題の改善を図る方法であり、本症例の治療の初期では、症状のセルフモニタリング、リラクセーション(筋弛緩法)、ディストラクション、認知的再体制化(自動思考の評価、適応的思考の生成)の技法を用いながら、痛みが悪化する時の考え方と行動を修正することに焦点をあてて治療方針とした。

2週間後(H24年8月)、NRSは2週間前と変わらない状態であったため、処方は継続とし、CBTを開始した。まずは短期的に痛みを改善させる技法としてリラクセーション(筋弛緩法)を導入した。外来での練習の後1週間、家での実践をホームワークとした。また、症状のセルフモニタリングとして、1週間の生活と舌の痛みの変化の記録をホームワークとした。

1週間後(H24年8月)、家でのリラクセーションの実施により、普段リラックスできていないことに気づき、リラクセーションを行う事で痛みが悪化した際の強さがNRSで7点から4点に3ポイント減少した。抗不安薬の服用は1度もみられなかった。セルフモニタリングの結果、「朝から昼にかけては痛みが出ない、疲労が増してくると痛みが出てくる、何かに集中している時には痛みを感じていない、自分で思っていたよりも痛みが気にならない時間が長い、痛みが悪化する時間は家事が全て終わった後の一人での時間が多いことに気づいた。」と患者は述べていた。そこで痛みが悪化した時の対処法としてディストラクションを実践し、家で痛みの悪化した時に痛みから他のものに気をそらしていく形でさらなる痛みの改善を目指した。

前回来院から2ヶ月後のH24年10月に当科を再来院した。来院までの2ヶ月間は、家庭内の揉め事が原因で舌の痛みが悪化する時間が増え、睡眠も浅くなったが、ディストラクションとクロチアゼパムで疼痛を緩和でき、オキサゾラムで睡眠も深くなったためなんとか生活できている状態であった。家庭内の揉め事により、舌痛症が悪化させる要因であった就職活動は中断せざるを得ず、

家庭内の揉め事は解決したものの就職活動を再開する気持ちは持てないようであった。CBTではこうした出来事で症状が悪化した時の考え方や行動を修正していく事に主眼を置き、認知的再体制化を行う事とした。

患者本人が疼痛の緩和に効果的だと考えていたことは20年来の唯一の親友への電話での悩み相談であった。しかし、この頃は親友に電話をしたいと思う出来事があっても、親友への連絡を躊躇してしまい連絡できない事が多々あった。その原因は本人の考え方にあり、「自分が伝えたい内容を完璧に伝えられるようにまとめてからでなければ連絡できない」、「親友も忙しいから連絡をしたら迷惑ではないか?」と考えてしまうためであった。この電話ができないという悩みが孤独感と悩みをさらに助長し、舌の痛みをより悪化させていたと考え、行動実験として次の課題を実践してもらうこととした。課題は、帰宅後すぐに「相談したいことがあるので、電話をしても良い時間をメールで教えてください」と親友にメールをし、親友から返事が来たら指定された時間に電話することであった。また、電話で話す内容については、完璧にする必要はなく、時間が来たらその時点でまとまっている範囲で話すこととした。

2週間後（H24年10月）、患者は前回提案した行動実験の課題をきちんと実行しており、親友に電話を何度かかけることができていた。その際親友から「以前は相談される内容が一週間前のことなど昔のことが多かったが、最近は今日起こったことを相談されることが多くて嬉しい」と言われた事で、電話を躊躇していたことが不必要だったと気づくことができた。また、親友と定期的に電話をできるようになったことで、舌の痛みも緩和傾向にあった。この認知及び行動の変容により「親友から遊びに誘われる頻度が多くなり生活が充実した」と患者自身も生活面での変化を実感できているようであった。

前回来院時から今回の来院までの間、痛みはNRS 2で安定していたが、一度だけ痛みが悪化したことがあった。痛みの悪化がみられたのは、H24年4月から欠かさず毎朝5:30に起きて作ってきた長女のお弁当を寝坊のため作れなかった日であった。子供は「今お母さんが大変なものわかるし、コンビニで買えばいいから大丈夫だよ」と言ってくれていたが、本人は申し訳なさ寝坊したショックで自分を責めており、症状の悪化につながったと考えられた。この状況での認知の改善を目的として、次のような質問を交えながら認知の修正を行った。

「もし毎朝5時半に起きて親友が子どもにお弁当を作っていたとして、親友が一日だけ朝寝坊して弁当を作れなかったことで自分はダメだと落ち込んで相談してきたら

何と声をかけてあげますか?」と聞いた所、「1日位気にする事ないよ。そんなに心配しなくても大丈夫だよ。」と声をかけると述べた。その親友へのアドバイスを、自分へのアドバイスとして考えることを促した所、「そう考えたことはなかった。確かにそうかもしれない。自分の事をそのように客観的に判断したことがなかった。これからはそう考えてみたい。」と思考内容に変化が生じていた。

1週間後（H24年10月）、患者から「オキサゾラムもクロチアゼパムも服用していない。NRSは0の時間が多く、痛みは夜に出ても2か3で悪化することはなく、気にならないで生活できている」と報告があり、以前と違って悩んだり落ち込む出来事があっても親友への電話と自分へのアドバイスで解消できるようになっていた。

その後8ヶ月間、1~2ヶ月に1度のペースでCBTを継続している。精神的にストレスを感じる出来事がたびたびあるが、舌の痛みは悪化することなくNRS 0~2で安定している。H25年2月に1度、精神的・肉体的に抱えきれない程の辛い出来事があり一時的に舌の痛みの強さが悪化した。この時も親友への電話やオキサゾラムの頓用で対応でき、悪化した舌の痛みの強さもすぐに消失した。またH25年6月より仕事も始め、現在まで家事と仕事の両立を続けているが、痛みは再発していない。

考 察

近年、本邦では舌痛症は歯科外来を訪れる患者の約3%との報告がある。この頻度は口腔粘膜疾患で最も多いといわれている扁平苔癬の約1~2%（Carrozzo et al., 2008）と比較しても高い比率となっている。CBTは舌痛症の治療法の中の1つにあげられている。CBTは通常の歯科での治療を行った統制群よりも有意に症状の緩和が確認されたことから、その有効性が示唆されており（Bargdahl et al., 1995）、特に薬物の副作用のようなりスクも少ないことから、治療の選択肢の1つとして提案されている（Zakrzewska et al., 2005）。しかしながらCBTの実施にあたって問題になるのがCBTを実施できる施設や専門家の決定的な不足である（大野, 2012）。このことからCBTを行える専門家以外の人材の育成が急務と考えられる。他分野では、自殺対策に取り組んでいる地域の保健師や看護師を対象にしたCBTの講習会やフォローアップ研修会などが実施されているが、歯科医師においては現在までそのような試みはみられない。

CBTはうつ病や不安障害の治療の際に薬物療法の相互補完的な治療方法として用いられることが多い（大野, 2012）。舌痛症の治療として薬物療法を行っている

歯科医師がCBTを自ら行うことができれば、痛みに対する薬物療法の効果とCBTの効果を総合的に鑑みて、その都度治療方針を構築できる。このことから歯科医師が舌痛症の治療の一環としてCBTを行えることが望ましい。

本症例の若手歯科主治医はCBTプログラムに準拠し、患者の悩み・症状の増悪要因・緩和要因を聞き出し、認知や行動の変容に取り組むことで、舌の痛みの軽減に成功した。CBTでは、本来、患者の問題を詳細にアセスメントしながら患者にあった技法を選択していく必要があるが、多くの技法や理論が存在するため、CBTを専門としない治療者にとっては実施を難しくさせている原因の1つとなっている。本症例では、治療内容が明示された一定のプログラム内容にそって治療を進めることによって、こうした問題が生じることなく、CBTを専門としない歯科医師が効果的に治療を実践できることが明らかにされたと考えられる。

他分野においても、CBTを専門としていない経験年数の浅い医師によるCBTについての報告や、看護師によるCBTについての報告もみられる(岡田, 2013)が、本症例においてこのような経験の浅い歯科医師がCBTを行い舌痛症状の緩和をみる事ができた背景には、CBTを専門とする臨床心理士によって定期的にスーパーバイズが行われたことがあげられる。本症例では歯科医師によって提案された治療内容を臨床心理士が確認し、修正が必要な場合は適宜治療法の提案を行った。特に、舌痛症患者の認知の修正を行う際は、どのような内容を修正の対象とするか、またどのように修正を行うかについて重点的に話し合いがもたれた。医師においても、厚生労働省の研修事業をもとに、3年間以上の臨床経験のある精神科医を対象に研究を兼ねたCBTの研修を始めており、その研修においても指導者からのスーパーバイズを実施している(大野, 2012)。今後歯科医師が直接CBTなどの心理療法を行う必要性が増加していくと考えられる現状において、歯科医師がCBTを治療の一環として実践するためには、CBTの専門家によるスーパーバイズを定期的に受けることができる環境整備が重要であると考えられる。そのためには、臨床心理士をはじめとするCBTの専門家と歯科医師とが日頃から連携できる状態が必要である。

結 語

舌痛症患者に若手歯科医師が治療の一環としてCBTを行い、症状の緩解がみられた1例を報告した。また、歯科医師がCBTを治療の一環として実践するにあたり、治療のプログラム化などによって実施する治療内容を明確

化していくことやCBTの専門家である臨床心理士などによってスーパーバイズを定期的に行うことができる環境整備が重要であることが示唆された。

引用文献

- 安彦善裕, 松岡紘史, 畠山翔太, 佐藤淳, 吉田光稀, 齋藤正人, 豊福 明, 坂野雄二. 認知行動療法とミルナシプランの処方によって症状の消失をみた舌痛症の1例. 日歯心身 24 : 79-83, 2009.
- Bargdahl J, Anneroth G, & Perris H. Cognitive therapy in the treatment of patients with resistant burning mouth syndrome : A controlled study. J Oral Pathol Med 24 : 213-215, 1995.
- Carrozzo M. How common is oral lichen planus? Evid Based Dent 9 : 112-113, 2008.
- de Moraes M, do Amaral Bezerra BA, da Rocha Neto PC, de Oliveira Soares AC, Pinto LP, & de Lisboa Lopes Costa A. Randomized trials for the treatment of burning mouth syndrome : An evidence-based review of the literature. J Oral Pathol Med 41 : 281-287, 2012.
- Headache Classification Committee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders. Cephalalgia 24 (suppl.1) : 1-160, 2004.
- 肥田野直, 福原真知子, 岩脇三良, 曾我祥子, Spielberger CD. 新版STAIマニュアル. 東京 : 実務教育出版 ; 2000
- Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Andujar-Mateos P, Sánchez-Siles M, Gómez-García F. Burning mouth syndrome : An update. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 15 : e 562-568, 2010.
- Maltsman-Tseikhin A, Moricca P, & Niv D. Burning mouth syndrome : Will better understanding yield better management? Pain Pract 7 : 151-162, 2007.
- Matsuoka H, Himachi M, Furukawa H, Kobayashi S, Shoki H, Motoya R, Saito M, Abiko Y, & Sakano Y. Cognitive profile of patients with burning mouth syndrome in the Japanese population. Odontology 98 : 160-164, 2010.
- 松岡紘史, 齋藤正人, 安彦善裕, 千葉逸朗, 坂野雄二. Burning Mouth Syndromeを対象とした痛みに対する破局的思考に焦点を当てた短期的認知行動療法プログラムの開発. 日歯心身 27 : 56-61, 2012.
- 岡田佳詠. 看護師が行う認知行動療法の強みとその留意点. 精神科看護 40 : 4-9, 2013.
- 大野 裕. 定型的(高強度)認知行動療法と簡易型

（低強度）認知行動療法．心身医学 52：798-802, 2012.

豊福 明.“歯科心身症”としての舌痛症．日歯心身 21：43-48, 2006.

Uki J, Mendoza T, Cleeland, CS, Nakamura Y, & Takeda F. A brief cancer pain assessment tool in Japanese : The utility of the Japanese Brief Pain Inventory - BPI-J. J Pain Symptom Manag 16, 364-373, 1998

Zakrzewska JM, Forssell H, & Glenny AM. Interventions for the treatment of burning mouth syndrome. Cochrane Database Syst Rev 1 : CD002779, 2005.



佐藤 英樹

平成23年 3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成23年 4月 北海道医療大学病院 臨床研修歯科医

平成24年 4月 北海道医療大学大学院歯学研究科入学

〔学位論文〕

*Porphyromonas gingivalis*のLPSによるヒト歯根膜細胞への エピジェネティックな修飾について

植原 治

北海道医療大学大学院歯学研究科口腔生物学系 微生物学分野

Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces epigenetic modifications in human periodontal fibroblasts

Osamu UEHARA

Division of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

緒 言

エピジェネティクスは、DNAの塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、その代表的なものにDNAメチル化やヒストン修飾（アセチル化、脱アセチル化）がある。これらのエピジェネティックな遺伝子の修飾は、これまで悪性腫瘍発生に関わる研究について行われてきたが、最近になり、糖尿病、アレルギー、自己免疫疾患などでの関与も指摘されてきている。歯周組織をとりまく因子として、炎症性サイトカインやコラーゲンなどのエピジェネティックな修飾が報告されはじめているが、未だ歯周炎発症におけるエピジェネティックな修飾の関与は明らかにされていない。

一方、*P. gingivalis*などの歯周病原性細菌に含まれるLipopolysaccharide (LPS)は歯周組織の細胞にさまざまな作用を引き起こす。その一つに歯根膜細胞の骨芽細胞への分化能抑制作用があるが、このメカニズムの詳細については未だ不明である。

本研究では、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を用い、LPSによるHPDLの骨分化に関係する遺伝子へのエピジェネティックな修飾の関与について検討した。

材料および方法

1. LPS, DNAメチル化阻害剤および脱アセチル化阻害剤の影響

細胞は、HPDLを用い10% FBSおよび1% Penicillin-Streptomycin含有DMEMを用いて37℃、5% CO₂の条件

下で培養した。HPDLの増殖活性は、細胞増殖試薬WST-1を用い測定した。HPDLを96ウェルプレートに播種、0.1, 1, 10μg/mlのLPSおよび1, 10, 100μMの濃度で24時間培養した。その後、DMEMにLPSおよび5 Azaを共添加し12, 24時間培養した。培養後、細胞増殖をWST-1試薬で測定した。

2. LPSおよびDNAメチル化阻害剤による骨分化マーカーmRNAの発現

実験1で得られた至適濃度の条件下で各LPS, 5Aza, LPS + 5Azaを24時間培養後、Total RNAを抽出した。定量PCRは、骨分化マーカーであるRunx-related transcription factor (RUNX2), エピジェネティックな修飾に関与しているDNA methyltransferase 1 (DNMT1), ターゲット遺伝子の発現レベルは、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコントロール遺伝子として、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて比較した。

3. DNAメチル化の解析

DNAの精製は、LPS, 5Azaを24時間作用させたHPDLからゲノムDNAを抽出した。精製したゲノムDNAを調整し、bisulfite処理した。プライマーの設計は、RUNX2遺伝子の塩基配列から潜在的なCpGアイランドの領域を決定した後、bisulfiteによるDNAの変換パターンをシミュレーションを行い、DNAメチレーション検出プライマーの設計を行った。Real-time Methylation Specific PCR (MSP) は、SYBR GreenによるReal-time PCR法を用いた。Real-time PCRにより得られたデータからメチル化レベルと非メチル化レベルの割合 (%) を求めた。

4. ヒストン修飾解析

LPSを4時間作用させたHPDLは、1% FormaldehydeによりDNAとヒストンをクロスリンク後、ゲノムDNAの断片化を行い、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kitを用いてクロマチン免疫沈降 (Anti H3-Acetyl) を行った。Anti H3-Acetyl抗体により免疫沈降を行った試料 (ChIP) は、5M NaClによる脱クロスリンク処理後、DNAを抽出した。得られたDNAは、ChIP-DNAとしPCRに用いた。また、抗体による免疫沈降を行っていない試料についても同様に脱クロスリンク、DNA精製を行いコントロールDNAとしてPCRに用いた (input-DNA)。RUNX2遺伝子の塩基配列 (P2 promoter 領域) から、プライマーの設計を行った。DNAメチル化解析と同様にSYBR GreenによるReal-time PCR法を用いた。結果からCt値を算出し、Input画分をコントロールとし解析した。

結果および考察

P. gingivalis のLPS刺激により、HPDLのDNAメチル化転移酵素のmRNAの発現が上昇すること、およびヒストンアセチル化抑制酵素 (HAT) のmRNAの発現が減少することから、LPSによるエピジェネティックな修飾で、HPDLの遺伝子発現に関与していることが示唆された。P300などのHAT活性の低下により、ヒストンのアセチル化が抑制され、その後にDNMTによるDNAのメチル化により、RUNX2遺伝子発現の減少につながると考えられる。また、骨芽細胞転写因子であるRUNX2遺伝子のmRNAの発現低下に伴いメチル化が増加すること、ヒストンH3のアセチル化修飾をうけたDNAでは、LPS刺激によりRUNX2遺伝子の発現が低下したことから、*P. gingivalis* のLPSがHPDLの骨分化関連遺伝子にエピジェネティックな修飾を引き起こしていることも推察された。

近年、歯周炎の糖尿病や心臓血管疾患などの全身疾患

への影響についてエビデンスが報告され始めている。歯周病原菌は環境因子であり、歯周炎の発症をはじめとする全身疾患への影響にエピジェネティクスが関わっているものと考えられる。

結 論

P. gingivalis のLPSがHPDLのRUNX2遺伝子にDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾を引き起こしていることが明らかとなった。



植原 治

平成12年3月 茨城県立土浦第一高等学校 卒業
 平成14年4月 北海道医療大学歯学部 入学
 平成20年3月 北海道医療大学歯学部 卒業
 平成20年4月 北海道医療大学病院 臨床研修医
 平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究課博士課程 修了
 平成25年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能・発育学系保健衛生学分野 助教

〔学位論文〕

ナタマメエキスが口腔細菌とラット実験的歯周炎に及ぼす効果

中塚 侑子

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* on experimental periodontitis induced in rats by *Porphyromonas gingivalis* infection

Yuko NAKATSUKA

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of HokkaidoKey words : *Canavalia gladiata*, *Porphyromonas gingivalis*, alveolar bone loss

緒 言

ナタマメ【学名*Canavalia gladiata* (Sword Beans)】はアジア、アフリカの熱帯地方が原産のマメ科の植物で、排膿、消炎作用があるとされている。古くから中国では漢方生薬として、日本では民間療法でお茶として日常的に用いられてきた。しかし、ナタマメの排膿、消炎効果の詳細な作用機序はこれまでほとんど報告されていない。ナタマメの成分であるcanavanineはアルギニンの構造類似体であり、アルギニンと競合することによって、*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Burkholderia mallei*のアルギニン分解酵素を阻害することが報告されている。このことからナタマメは、ジンジパインに対する阻害作用を有することが予測される。本研究では、歯周炎に対する治療薬としてナタマメエキス (Sword Bean Extract : SBE) の応用を検討する目的で、ナタマメの口腔細菌に対する作用、口腔上皮細胞株に与える細胞傷害性、ジンジパインの活性に与える影響、および*Porphyromonas gingivalis*によるラット実験的歯周炎における歯槽骨吸収抑制効果について検討した。

方 法

本研究では、*in vitro*で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたcanavanineの定量、最小発育阻止濃度測定法 (MIC法)、最小殺菌濃度測定法 (MBC法) を用いたSBEとcanavanineの抗菌効果の測定、LDH活性

測定法、Trypan Blue染色法を用いたSBEとcanavanineの細胞傷害性の測定、合成基質を用いたSBEとcanavanineのジンジパイン活性 (Rgp活性, Kgp活性) を測定した。また、*in vivo*では、ラットに*P. gingivalis*を経口感染させ、ラット実験的歯周炎モデルを作製した。ラットにSBEを経口投与し、SBEがラット実験的歯周炎に及ぼす効果を歯槽骨吸収量を測定することにより評価した。

結 果

HPLC解析により、SBEはcanavanineを6.4%含有していることが明らかとなった。抗菌効果測定の結果、SBEは*P. gingivalis*と*Fusobacterium nucleatum*に対して、それぞれ59 µg/mL, 1,875 µg/mL、canavanineは、それぞれ1,094 µg/mL, 1,875 µg/mLのMIC値を示した。他の6菌種に対しては、抑制効果を認めなかった。CHXと比較して、SBEとcanavanineはMIC値が高い傾向を示した。MBC値もMIC値と同様の傾向を示し、SBEは*P. gingivalis*と*F. nucleatum*に対してそれぞれ59 µg/mL, 1,875 µg/mL、canavanineは、それぞれ1,094 µg/mL, 2,084 µg/mLのMBC値を示した。他の6菌種に対しては、抑制効果を認めなかった。MIC値と同様にCHXと比較して、SBEとcanavanineのMBC値は高い傾向を示した。細胞傷害性測定の結果、LDH活性測定法、トリパンブルー染色法のどちらとも、SBEとcanavanineはクロルヘキシジンと比較して細胞傷害性が有意に低い値を示した。ジンジパイン活性測定の結果、SBEは2 mg/mL以上、ca-

navanineは4 mg/mL以上の濃度でRgpとKgp活性を有意に抑制した。SBEは、*P. gingivalis*によるラット実験的歯周炎に対して有意に抑制効果を示した。

考 察

SBEとcanavanineは、*P. gingivalis*と*F. nucleatum*に対してのみ抗菌効果を示し、そのMIC値はCHXと比較して高い値であった。その一方、SBEとcanavanineの細胞傷害性は、CHXより有意に低い値を示した。このことは、CHXを洗口液として使用するのと同様に、SBEを抗菌効果のある濃度で日常的に使用することが安全なことを示している。SBEによる*P. gingivalis*に対する抗菌効果の一部は、*P. gingivalis*の病原因子の一つであるジンジパインの分解に関係している可能性が示された。本研究では、SBEの抗ジンジパイン活性は、MIC値に相当する濃度で観察された。canavanineはアルギニンの構造類似体であるため、Rgpによるアルギニンの切断を阻害することが報告されている。今回の研究では、SBEのアルギニン分解阻害剤としての*in vivo*における効果をラット歯周病モデルによって評価した。SBEの濃度は、*P. gingivalis*に対する抗菌効果、KB細胞に対する細胞傷害性、そしてRgp・Kgp活性抑制効果に関する*in vitro*の実験結果を参考に、2 mg/mLとした。今回の結果において、SBE投与が*P. gingivalis*による歯槽骨破壊を抑制したことから、SBEは、アルギニンの分解抑制をそのメカニズムの一部として、歯周病の発現・進行に抑制的に作用することが示唆された。しかしながら、今回の研究では、健康な歯周組織における歯周病の発現・進行への効果を評価したことから、既存の歯周病に対するSBEの効果は不明である。その検索のためには、今回の結果を参考に、SBEの投与時期を変更したプロトコルによる動物実験が必要とされる。

本研究では、SBEはジンジパインの酵素活性を抑制し、*P. gingivalis*が関与する歯周炎に対して抑制的に働

くことが示された。ロイペプチン、エチレンジアミン四酢酸、トシルフェニルアラニルクロロメチルケトンなど既知のプロテアーゼ阻害剤は、RgpとKgpを阻害するが、ジンジパイン阻害に有効な濃度では毒性も高いため、歯周病の予防や治療に使用するのには難しいとされている。今回の結果からSBEとcanavanineは、RgpとKgp活性を抑制する濃度で、KB細胞に対する細胞傷害性がほとんど認められず安全であることが示された。さらにSBEは、*P. gingivalis*によるラット実験的歯周炎に対する抑制効果が認められ、副作用も認められなかったことから、SBEは*in vivo*で*P. gingivalis*による歯周炎の発生、あるいは進行に対する予防薬として安全に応用できる可能性が示された。

CanavanineのRgpとKgpに対する抑制効果の詳細なメカニズムは、十分明らかになっていない。Canavanineは、ナタマメの主要な構成成分であると報告されている。今回の研究において、canavanineは、歯周病原菌とジンジパインに対してSBEと同様の挙動を示す一方で、本動物実験で有効とされたSBEに含まれるcanavanineの濃度では、*in vitro*においてRgpとKgpの酵素活性抑制効果を示さないことが明らかとなった。これらのことからSBEには、抗菌効果とジンジパイン活性抑制効果をもつcanavanine以外の成分が含まれていることも示唆された。

結 論

本研究結果から、SBEは、*in vitro*で口腔上皮細胞株に傷害性が少なく、*P. gingivalis*に対する抗菌効果、及びRgpとKgp活性に対する抑制効果を有し、*in vivo*で*P. gingivalis*によるラット歯周炎を抑制したことが明らかとなった。このことから、歯周炎に対する予防薬や治療薬としてSBEの応用が有効である可能性が示唆された。また、SBEにはcanavanine以外のさらなる他の有効成分が含まれ、相乗効果をもたらしている可能性が示唆された。



中塚 侑子

平成20年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成25年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了
平成25年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
歯周歯内治療学分野 任期制助手

〔学位論文〕

歯胚の発育過程におけるエピジェネティクス関連酵素HDACsと糖代謝関連因子の関与

佐々木 由希子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 小児歯科学分野

Regulation of Histone deacetylases and glucose transporters in mouse tooth development

Yukiko SASAKI

Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : 歯胚発生, エピジェネティクス, FOXO, GLUTs

緒 言

エピジェネティクスは塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現を制御する現象の総称であり、発生・分化の制御に関わる重要なメカニズムで、DNAメチル化やヒストン修飾がその代表である。ヒストン修飾では、アセチル化・メチル化・リン酸化などが知られ、なかでもヒストンのアセチル化・メチル化はエピジェネティクス制御の中心的な役割を果たすとされているが、その他にも脱アセチル化や脱メチル化など、多くの修飾が報告されている。

ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylases : HDACs) はヒトで18種類同定され、4クラスに分類されている。中でも、クラスIとIIは活性中心に亜鉛をもち、水分子を活性化してアミド結合を切断する加水分解酵素である。クラスIにはHDAC1/2/3/8が属し、ユビキタスに発現分布し組織特異性に劣る。クラスIIaに属するHDAC4/5/7/9は脳、心臓、骨格筋という高い糖代謝を示す臓器に発現する。これらクラスIIaのHDAC4/5/7によるグルコース代謝の調節が知られており、グルカゴンの作用により脱リン酸化して核内に移行し、クラスIのHDAC3およびForkhead box type O (FOXO) 転写因子の脱アセチル化を介して糖新生に関連する遺伝子の転写を誘導する。インスリン作用時には、リン酸化HDAC4/5/7

は核内への移行ができず、アセチル化FOXOはプロモーターへの結合親和性を減じて、糖新生関連遺伝子を転写することができなくなる。このように、HDACsを介してエピジェネティクスは糖代謝に関連する。しかしながら、歯胚の発育過程におけるエピジェネティクス関連因子の報告はない。

そこで本研究では、マウスの帽状期から歯根形成期までの歯胚発育過程6段階において、HDACsとそれに関連する転写因子であるFOXO、そして糖の細胞内への取り込みに関わるglucose transporters (GLUTs) の局在について免疫組織化学的に検証し、併せてグリコーゲンの蓄積をPeriodic acid-Schiff (PAS) 反応で検出した。

対象および方法

対象には、Jcl : ICRマウスを用いた。自家交配を行いプラグチェックし、胎生14日 (帽状期)、胎生17日 (鐘状期初期)、生後1日 (鐘状期中期)、生後5日 (鐘状期後期)、生後10日 (歯冠形成期)、生後17日 (歯根形成期) の胎仔マウスを摘出しパラホルムアルデヒドにて固定を行った。固定終了後、4%エチレンジアミン四酢酸にて30日間脱灰を行った。通法に従いパラフィン切片を作製し、抗HDAC3抗体、抗HDAC5抗体、抗HDAC7抗体、抗FOXO1, 3, 4抗体、抗GLUT1抗体および抗GLUT3抗体による免疫組織染色およびPAS染色を行っ

た。

結果および考察

マウス胎生14日の下顎第一臼歯帽状期歯胚では、歯堤においてHDAC5, HDAC7, GLUT3およびFOXOの発現とPAS陽性反応が一致して認められ、歯胚周囲間葉組織ではHDAC3, GLUT3, FOXOの発現とPAS陽性反応が一致して認められた。HDACsとグリコーゲンの局在が一致することが示され、歯堤と歯胚周囲間葉組織においてグルコース代謝とHDACsとの関与が推測される。

胎生17日の鐘状期初期歯胚では歯堤において、HDAC3, HDAC5, HDAC7, GLUT1, GLUT3およびFOXOの発現を認め、PAS反応も陽性であった。これらのことから、歯堤分化の時期にグルコース代謝やグリコーゲンの蓄積が確認でき、HDACsが同時期に働いていることが示唆された。星状網においても、HDAC3, HDAC5, GLUT1およびFOXOの発現が認められPAS反応も陽性であったことから、星状網でもグルコース代謝、グリコーゲンの蓄積にHDACsが何らかの働きをしていることが考えられた。歯堤と星状網においてGLUT1と同部位に局在を認めたHDACsとFOXOも歯胚の形態形成に関与が示唆された。また、歯乳頭におけるHDACsとFOXOの発現および歯乳頭の赤血球におけるGLUT1の発現から、エナメル器への栄養供給のためのグルコース代謝にもHDACsが働いていることが示唆された。

内エナメル上皮がエナメル芽細胞と中間層細胞に分化し、咬頭形成が始まる生後1日の鐘状期中期歯胚では、HDAC3やFOXOの反応は星状網歯堤側に限局的であり、これらの発現がみられなかった星状網歯乳頭側の中間層にGLUT1とGLUT3の発現およびPAS陽性反応を認め、グルコースやグリコーゲンの存在を示す部位とHDACsは共局在を示さなかった。このことから、生後1日の星状網歯乳頭側におけるグルコース代謝には既にHDACsは関与していないと考えられた。Pelletierらの報告(2012)によると、グリコーゲンの合成は低酸素状態で誘導されるが、GLUT1の発現により赤血球が豊富にあることが確認できた星状網歯堤側では血管から酸素や栄養が供給されるため、グリコーゲンの蓄積がみられなかったものと推測される。

生後5日では、生後1日までに比較してすべての発現および反応が弱く、生後1日で特徴的であった中間層の発現も減弱を認めた。生後10日と15日では、歯髄にHDAC3, FOXO, GLUT3の発現およびPAS陽性反応を認めた。歯髄に神経線維がみられるようになるのが生後10日であるとのChiego Jrらの報告(1995)や、歯髄にグ

リコーゲン含有細胞が出現する時期と神経が歯髄内に侵入する時期が一致するとのOhshimaらの報告(1999)と今回の結果が合致するものであった。またFOXOがグルコース代謝に関与するというKodamaらの報告(2004)もあることから、歯髄の成熟にFOXOも関与していることが示唆された。FOXOはエナメル質の成熟に必須であるとの報告もあり、生後10日のエナメル芽細胞においてFOXOとHDAC3も発現が認められ、エナメル芽細胞の成熟にHDAC3も何らかの役割を担っていることが推測される。

以上のように、エピジェネティクス関連酵素HDACsが歯胚発育初期の形態形成に、発育後期の歯髄の成熟において、時期・組織特異的な遺伝子発現の調整に何らかの関与があることが示唆された。

結 論

本研究より、マウス歯胚において帽状期に歯堤と歯胚周囲間葉組織にHDACsとグルコース代謝関連因子の局在が一致して認められ、鐘状期初期になると星状網と歯乳頭でもHDACsとグルコース代謝関連因子の局在が一致していることが確認された。生後の歯冠形成期および歯根形成期には、歯髄組織とエナメル芽細胞においてHDAC3とグルコース代謝関連因子の局在の一致が認められた。また、細胞分化に必要とされるグルコース代謝にHDACsが関与していることが示唆されたが、時期によってその部位も異なることが明らかとなった。また、歯胚発生過程においてGLUT1の反応を示す赤血球が星状網歯乳頭側に認められず、GLUT3およびPAS陽性反応が星状網中間層細胞にみられることから、血管の侵入が乏しい星状網歯乳頭側では、酸素の乏しい環境であり、低単糖環境下でグルコースを選択的に細胞内に輸送するGLUT3が強発現し、グリコーゲンの蓄積を認めた星状網中間層細胞はHDACsに依存しないエネルギー代謝で生存していることが示唆された。

以上のように、エピジェネティクス関連酵素HDACsが歯胚発育初期の形態形成に、発育後期の歯髄の成熟において、時期・組織特異的な遺伝子発現の調整に関与していることが示唆された。



佐々木 由希子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

平成18年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

〔学位論文〕

フェニトインによる歯肉線維芽細胞のCa²⁺動態と機能の解明

林 良宣

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 小児歯科学分野

Alteration of intracellular calcium signaling
in human gingival fibroblasts with phenytoin application

Yoshinobu HAYASHI

Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Key words : フェニトイン, 線維芽細胞, カルシウムシグナリング

緒 言

フェニトイン (PHT) は抗てんかん薬として、神経細胞のナトリウムイオン (Na⁺) チャンネルを阻害し、神経細胞体へのNa⁺流入を抑え、細胞の脱分極を抑制することが知られている。しかし、PHTは歯肉増殖症の副作用を持ち、使用者の約50%に歯肉増殖をもたらすことが知られている。これまでの研究では、PHTによる歯肉増殖症は歯肉線維芽細胞 (HGF) のコラーゲン産生、及び分解に影響をおよぼすが、その詳細なメカニズムは不明な点が多く、個体差も大きい。in vivoにおいてPHTは、HGFの増殖を上昇させるが、これは炎症性サイトカインなどの相互作用により生じるとの報告がある。

体内の生理活性物質や薬物刺激が、細胞内Ca²⁺濃度の変化を介して様々な細胞機能を調整する。このようなCa²⁺をメッセンジャーとする情報伝達系をカルシウムシグナリングという。これまでに、カルシウムシグナリングが筋肉の収縮、エキソサイトーシス、免疫機能、視覚機能、受精、発生、増殖、遺伝子発現制御、細胞骨格制御などの多彩な働きに関与することが知られている。

本研究はPHTによりHGFのカルシウム動態がどのような影響を与えるのかを明らかにし、さらにPHTの作用によるカルシウム動態の変化が細胞増殖や遺伝子発現等の機能調節に関与するかについて検討した。

方法と材料

1. 細胞

正常ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF, プライマリーセル) を使用した。

2. 試薬

PHT (和光純薬) はDimethyl Sulfoxide (DMSO, 和光純薬) にて調整した。controlはDMSOのみとした。細胞内のCa²⁺動態を観察するためカルシウム蛍光指示薬として、Fura2アセトキシメチルエステル (Fura2/AM, 同仁化学研究所) を用いた。また、小胞体内のCa²⁺を枯渇状態にするためタブシガルギン (ThG, SIGMA), 小胞体からCa²⁺を放出させるためm3-M3FBS (M3, SIGMA) および細胞成長因子でありGタンパク共益型受容体を介したCa²⁺の放出を確認するためEpidermal Growth Factor (EGF, Roche applied science) を使用した。

3. 緩衝液

HBSS-H balanced salt solution (HBSS-H, 同仁化学研究所), Ca²⁺ free HBSS-H balanced salt solution (Ca²⁺ free HBSS-H, 同仁化学研究所)

4. Fura2/AMの導入

Fura2/AMは細胞膜を通過してFura2に変化するとCa²⁺濃度により、340nm励起の蛍光強度が上昇し、380nm励起の蛍光強度が低下する性質をもつ蛍光性Ca²⁺指示薬である。ファイブロネクチンでコートした室温測定用チャンバーに細胞を播種し、培養したHGFを、HBSS-Hにて

リンスし、Fura2/AMを含有したHBSS-Hにて室温で20分間培養して細胞内へ導入した。

5. 蛍光顕微鏡を用いた細胞内遊離カルシウム濃度測定および微分干渉像の取得

Fura 2を取り込ませた細胞は、倒立型顕微鏡を含むイメージングシステムで測定を行った。340および380nmの励起を照射し蛍光をEM-CCDカメラにて捉え、蛍光強度比からCa²⁺濃度を計算し画像解析をした。

6. 細胞増殖能

PHT添加による細胞増殖能の変化を確認するため24, 48および72時間において、CyQUANT[®] Cell Proliferation Assay Kit (CyQUANT) を使用し、DNA量を蛍光プレートリーダーにて計測し比較した。

結 果

1. PHT添加による細胞内Ca²⁺濃度の変化

HGFにPHTを作用させると細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こった。このHGFの細胞内Ca²⁺濃度の上昇を認めた細胞の数は、PHTの濃度依存性に増加し、100あるいは200 μMのPHTでcontrolに対し統計的有意差が認められた。またPHTを10, 30および100 μM添加した細胞はHBSS-Hによる洗浄によって無刺激状態に回復した。

2. 細胞外液Ca²⁺非存在下でのPHT添加による細胞内Ca²⁺動態

PHTが細胞外から細胞内へのCa²⁺を流入させる可能性を調べるために、緩衝液をCa²⁺ free HBSS-Hに交換してCa²⁺流入が起こらない条件で100 μMのPHTを添加した。その結果、HGFの細胞内Ca²⁺濃度の上昇が認められた。また、細胞外にCa²⁺が存在し、細胞内Ca²⁺流入が起こる条件で100 μMのPHTを添加した結果と反応した細胞数を比較したが、細胞数に有意差は認められなかった。

3. 小胞体内Ca²⁺ポンプ阻害剤ThGによるHGFの細胞内Ca²⁺濃度上昇とPHTの増強作用

HGFに小胞体Ca²⁺ポンプ阻害剤のThGを添加し、ポンプを阻害してストアを枯渇させた状態でのPHTの作用を調べた。2 μMのThGを添加したところ、HGF細胞で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。その後、Ca²⁺濃度変化の平衡状態を確認し、続けて100 μMのPHTを共添加した結果、ThG単独よりもさらに細胞内Ca²⁺濃度の上昇が認められた。反応した細胞数を定量的に調べると、ThGは単独で全てのHGFの細胞内Ca²⁺濃度の上昇を起こした。さらにPHTはそのうち93.8%のHGFの細胞内Ca²⁺濃度の上昇を増強した。

4. PLC活性化薬M3によるHGFの細胞内Ca²⁺濃度上昇とPHTの増強作用

HGFに10 μMのM3を作用させたところ、IP3受容体を介する細胞内ストアからのCa²⁺放出によって細胞内Ca²⁺濃度の上昇が認められた。また、その2分後に100 μMのPHTを共添加すると、細胞内Ca²⁺濃度がさらに上昇した。反応した細胞数を定量的に調べると、M3を作用させたHGFの72%で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。さらにその後のPHTの添加によって、M3に反応した全てのHGFの細胞内Ca²⁺濃度がさらに上昇した。

5. EGFによるHGFの細胞内Ca²⁺濃度上昇とPHTの増強作用

サイトカインによる刺激時の細胞内Ca²⁺動態を観察するため、200 ng/mlのEGFを添加したところ、EGFによってHGFの細胞内Ca²⁺濃度上昇が認められた。また、その2分後に100 μMのPHTを共添加すると、細胞内Ca²⁺濃度が大きく上昇した。反応した細胞数を定量的に調べると、200 ng/mlのEGFを作用させたHGFの34%で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。さらにその後のPHTの添加によって、EGFに反応した全てのHGFの細胞内Ca²⁺濃度がさらに上昇した。反応細胞数においては、EGF単独添加に比較し、PHTおよびEGFの共添加に有意な増加が認められた。しかし、PHT単独添加に比較し、PHTおよびEGFの共添加では有意な差は認めなかった。一方、EGFによる細胞内Ca²⁺濃度上昇が認められなかった細胞でも、その71%がPHTによって細胞内Ca²⁺濃度が増加した。

6. 細胞増殖能の測定

細胞増殖の測定では、controlであるDMSO, 200 ng/ml EGF, 100 μM PHTおよび200 ng/ml EGFと100 μM PHTの共添加における細胞増殖能を24, 48および72時間で比較した。72時間において、controlに比較しEGF単独添加に有意な増殖が認められた。しかし、他の条件下では有意な差は認められなかった。

考 察

PHTは細胞内Ca²⁺動態における細胞膜からのCa²⁺排出を阻害することにより、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させることが示唆された。PHTに対する反応性の違いは個人の遺伝性素因に起因するとの報告があるが、歯肉増殖症がプラークコントロールで症状を改善することから、その発症にはプラークを始めとした外部環境が大きく影響を与えているものと考えられる。本実験では、PHT単独でHGFの65.5%がCa²⁺濃度上昇を示し、外部から刺激を受けた条件下ではすべての細胞のCa²⁺濃度が上昇していた。このことは、PHT誘発性歯肉増殖症の発症にはPHT単独ではなく外部環境が影響しているとの考えを支持するものと思われた。本研究ではPHT単独でのin vitroでの

HGFの細胞増殖能の亢進は認められなかったが, in vivo ではPHTが歯肉線維芽細胞に直接働きかけ増殖を促す報告があることから, 今後さらにサイトカイン等による Ca^{2+} 応答と増殖能へのPHTの作用を検討することでPHTによるHGFの増殖能への影響を解明できる可能性が示唆された. 細胞内カルシウムの濃度変化は様々な細胞の変化, 遺伝子発現制御に関与している事が報告されている.

また, PHTによるHGFにおける Ca^{2+} 濃度の上昇のメカニズムとして, 細胞膜カルシウムポンプ, ナトリウムカリウムポンプ, ナトリウムカルシウムエキスチェンジャー等の抑制が考えられた.

結 論

本研究により, PHTによりHGFの細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを明らかにし, さらにその作用機序は, PHTがHGFの細胞膜において Ca^{2+} の排出阻害に関与していることを明らかにした.

以上より, PHTは歯肉線維芽細胞の Ca^{2+} 動態に重要な役割を担っており, 歯肉増殖症の発症メカニズム解明の一助になることが示唆された.



林 良宣

平成19年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

平成25年4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

〔学位論文〕

マウスiPS細胞のゼラチンコート上での培養による 表皮角化細胞およびエナメル上皮細胞への分化

吉田 光希

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野

Differentiation of keratinocyte and ameloblast on gelatin-coated culture in mouse iPS cells

Koki YOSHIDA

Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : mouse iPS cells, keratinocyte, ameloblast

緒 言

人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は多分化能を有しES細胞に代わるものとして, 再生医療への応用が期待されている。これまで神経や心筋などへの分化誘導についての報告は多いものの, 上皮系細胞への分化誘導に関する報告は僅かである。最近になり, ES細胞と同様に, フィーダー細胞を用いたiPS細胞をレチノイン酸およびBMP-4を添加することにより表皮角化細胞へと分化することが報告された。さらに, マウスiPS細胞をラット由来歯原性上皮細胞と共培養するとエナメル上皮細胞へと分化することが報告され, 歯の再生医療への応用の可能性が示されている。しかしながら, いずれの研究もフィーダー細胞を用いる為, 異種細胞の混入が避けられず臨床応用には難がある。フィーダー細胞の代用としてゼラチンコートディッシュを用いた研究も行われているが, iPS細胞の上皮系およびエナメル上皮細胞への分化にフィーダーレス培養を試みた報告はみられない。そこで本研究では, ゼラチンコートディッシュを用いてマウスiPS細胞の表皮角化細胞とエナメル上皮細胞への分化誘導を試みた。

材料及び方法

1. 細胞: マウスiPS細胞 (iPS-MEF-Ng-178B-5株) および, ブタマラッセ上皮様細胞 (epithelial cell rests of Malassez; ERM) を用いた。
2. マウスiPS細胞の多能性 (未分化状態) の確認: マウスiPS細胞の多能性は, Alkaline Phosphatase染色および未分化マーカーのNanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA発現を半定量的RT-PCR法により確認した。
3. 胚様体の作製: 胚様体の作製は, 96ウェルプレート法により行った。
4. 表皮角化細胞への分化誘導: 分化誘導効率を上げる為の前処置として胚様体作製時に, ①Control (Dimethyl sulfoxide; DMSO, 添加) 群, ②25 ng/ml BMP-4単独添加群, ③0.1 μ M all-transレチノイン酸および25 ng/ml BMP-4の共添加群, を各条件下で添加し胚様体の作製を行った。ゼラチンコート処理したディッシュに胚様体を移し, 2% ペニシリン-ストレプトマイシン, 10% FBS含有DMEM培地を使用し, 再度上記①~③の条件下で分化誘導試薬を添加し, 37°C, 5% CO₂下で最長で14日間接着培養を行った。表皮角化細胞への分化状態の確認は, 定量的RT-PCR法により各細胞におけるKeratin14および Δ Np63 mRNA発現量を定量的に比較した。分化誘導された表皮角化細胞の免疫組織化学的観察は, 接着培養14日目の細胞を用いた。
5. エナメル上皮細胞への分化誘導: ERMがBMP-2, -4を発現しているか確認するために, 培養ERMから

total RNAを抽出しブタBMP-2, -4のプライマーおよび内在性ControlとしてブタGAPDHを用いた半定量的RT-PCR法にてmRNA発現を確認した。ゼラチンコート処理したディッシュに胚様体を移し、2% ペニシリン-ストレプトマイシン, 10% FBS含有DMEMにて37°C, 5% CO₂下で最長で14日間接着培養を行った。培養条件は、①Control (DMSO添加) 群, ②胚様体とERMとの共培養群, ③ERM上清で培養した群とし、さらにBMP-2, -4による影響を調べる為にBMP InhibitorであるNogginを添加した培養条件として、④胚様体とERMとの共培養に25 ng/ml Nogginを添加した群, ⑤ERM上清培養に25 ng/ml Nogginを添加した群も加えた。エナメル上皮細胞への分化状態の確認は、定量的RT-PCR法により各細胞におけるKeratin 14, AmelogeninおよびAmeloblastin mRNAの発現量を定量的に比較した。分化誘導されたエナメル上皮細胞の免疫組織化学的観察は、接着培養14日目の細胞を用いた。

結 果

1. マウスiPS細胞はAlkaline Phosphatase陽性であり、未分化マーカーであるNanog, Oct3/4, Sox2, Klf4 mRNA発現が認められ、多能性が確認された。
2. ゼラチンコートディッシュでBMP-4単独添加もしくはレチノイン酸とBMP-4の同時添加によって、 Δ Np63およびKeratin14 mRNA発現が上昇し、ゼラチンコートディッシュを用いたフィーダーレス条件下でのマウスiPS細胞の表皮角化細胞への分化誘導が確認された。
3. 抗Keratin抗体を用いた免疫組織化学染色により、BMP-4単独添加もしくはレチノイン酸とBMP-4共添加による培養14日目の細胞にKeratin蛋白陽性細胞が多数みられ、表皮角化細胞への分化が蛋白レベルでも確認された。
4. ERMとの共培養、もしくはERM上清培養により、AmelogeninおよびAmeloblastin mRNAの経時的な発現上昇が認められ、マウスiPS細胞のエナメル上皮細胞への分化誘導が確認された。特にERM上清により培養するフィーダーレス培養条件下の方が、よりエナメル上皮細胞へ分化し易いことが確認された。
5. 抗Amelogenin抗体を用いた免疫組織化学染色により、ERM共培養あるいはERM上清により培養した14日目の細胞に、Amelogenin蛋白陽性細胞が多数みられ、エナメル上皮細胞への分化が蛋白レベルでも確認された。
6. BMP InhibitorのNogginの添加により、培養14日目の細胞にエナメル分化マーカーAmelogenin, Ameloblastin mRNAの有意な発現低下が認められ、エナメル上皮細胞への分化にBMPの関与していることが確認された。

結 論

以上のことから、マウスiPS細胞はフィーダーレス培養条件下において表皮角化細胞への分化が可能であることが示唆された。また、フィーダーレス条件下でのエナメル上皮細胞への分化にはERM培養上清を用いた培養が有効であることが示唆された。また、iPS細胞のエナメル上皮細胞への分化にはERMによって産生されたBMP-2, -4が少なくとも一部に関与していることが示唆された。



吉田 光希

平成18年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成25年4月 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野 助教

[最近のトピックス]

Plant products : Strategy for the prevention of dental caries

Herastuti SULISTYANI and Futoshi NAKAZAWA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

The use of plant extracts, as well as other alternative forms of medical treatments, gained great popularity in the late 1990s. Actually, plant extracts have been used to prevent or treat diseases since several thousand years both in Western and Eastern societies. The term “plant products” is usually refers to secondary metabolites produced by plants. In many cases, these substances serve as the plant’s defence mechanisms against predation by microorganisms, insects, and herbivores. Secondary metabolites can be simply classified in three main groups : (i) phenolic compounds, which are made from simple sugars, containing benzene rings, hydrogen and oxygen ; (ii) terpenoids, which are made from mevalonic acid, composed almost entirely of carbon and hydrogen ; and (iii) alkaloids, which are nitrogen-containing compounds.

Dental caries, resulting from interactions of oral bacteria and their metabolic/virulence products with salivary constituents and dietary carbohydrates that are present on the surface of susceptible teeth. Biofilms formed in vivo comprised mixed microbial flora, although mutans streptococci are recognized as the primary producers of the extracellular polymeric substance (EPS) -rich matrix. *Streptococcus mutans* plays a key role in the development of virulent biofilms. Therefore, inhibition of the viability and biofilm formation of these bacteria is one of the strategies for the prevention of dental caries.

Chlorhexidine is generally accepted as the gold standard antibiofilm agents in the field of dentistry owing to its clinical efficacy on a wide range of microorganisms occurring in the oral cavity. However, the use of chlorhexidine as an anticaries agent not only remains controversial but also has adverse effects, including the staining of the tooth and tongue. As a result, there is a considerable interest in the development of new agents for the control of dental caries. Recently, several plants have been studied for their potential in the prevention of dental caries (Table 1).

Although plant products as traditional medicine are generally not expected to have acute toxicological effects, comprehensive safety studies of these agents need to be evaluated. Clearly, there is a great potential for the development of novel antibiofilm/anticaries using plant products.

References

1. Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.
2. Jeon, J.G., 2011. Natural Products in Caries Research : Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Res* 45, 243-263.
3. Song, J.H., 2007. In vitro effects of a fraction separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 419-425.

Table 1. Plant products with potential use as prevention of dental caries

Component	Plants	Activity
Catechin-based polyphenols	Green tea (<i>Camellia sinensis</i>)	1, 3, 4, 5, 6
Oleic acid, linoleic acid, epicatechin polymer	Cacao bean husk	1, 4, 5, 6, 8, 9
Proanthocyanidins, phenolic acids, flavonols	Cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	2, 3, 4, 5, 6, 8
Cineole, terpinen-4-ol	Essential oil from <i>Melaleuca alternifolia</i>	1, 9
Terpinene, piperitenone oxide, piperitone, pinene	Essential oils from <i>Mentha piperita</i> and <i>Rosmarinus officinalis</i>	1, 7
Allicin	Garlic (<i>Allium sativum</i>)	1, 9
Funoran	Seaweed (<i>Gloiopeltis furcata</i>)	4, 6, 7
Gallotannins	Neem (<i>Azadirachta indica</i> , <i>Melaphis chinensis</i>)	7, 10, 11
Lenthionine, disulfide derivative, oligosaccharides	Shiitake (<i>Lentinus edodes</i>)	1, 6, 8, 10
Unknown	Miswak (<i>Salvadora persica</i>)	1, 9

1 : Antimicrobial activity against planktonic cells of *S. mutans* ; 2 : Antimicrobial activity against biofilm cells of mutans streptococci ; 3 : Inhibitory effect on glucosyltransferase (Gtf) activity ; 4 : Inhibitory effect on *S. mutans* adherence ; 5 : Inhibitory effect on acid production ; 6 : Reduction in caries development in rats infected with mutans streptococci ; 7 : Inhibitory effect on human biofilm accumulation ; 8 : Reduction of formation of *S. mutans* biofilms ; 9 : Reduction in human salivary mutans streptococci counts ; 10 : Inhibitory effect on water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococci ; 11 : Induction of bacterial aggregation of various oral streptococci.

[最近のトピックス]

消化器系上皮細胞におけるニュートリゲノミクス

佐藤 惇

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

ニュートリゲノミクスは、食品成分のnutrition（栄養）を摂取したときに起こる生体内の代謝活動を、遺伝子（mRNA）発現レベル等のgenomics（遺伝情報）で解析する研究である¹⁾。食品成分が生体にどのように作用したかを、遺伝子発現やタンパク質、代謝産物などをDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、その機能を解明することを目的としている。これまでにカテキンをはじめとするポリフェノール類や、ゴマのリグナンなどのさまざまな食品由来の成分の研究が進められ、利用されてきている。

消化管におけるニュートリゲノミクスの例では、プロバイオティクス発酵乳としてのヨーグルトの摂取により、腸管上皮細胞において、腸管の蠕動運動に関与するL-glutamate transporterやL-glutamate decarboxylase遺伝子の発現亢進が認められることが報告されているように²⁾、摂取した成分が消化管の機能に直接かわることが知られている。消化管のがんに対する作用においても、ビタミンAの前駆体であるβ-カロテンは、大腸がんの発がんに関与するCOX-2の発現抑制とPGE2の生成を阻害することにより、大腸がん細胞の増殖抑制とアポトーシスの誘導にはたらくことが報告されている³⁾。また皮膚への発がん物質の曝露において、柑橘類に含まれるフラボノイドがCOX-2・iNOS誘導を抑制することによりその発がんを61%抑制することや、胃がんの転移・浸潤の抑制作用においても、フラボノイドが胃がん細胞におけるMMP-1, 9の発現を抑制することによるものであることが示唆されている⁴⁾。

これらのように消化管の上皮細胞におけるニュートリゲノミクスは、その機能調節・がんに対する作用など様々な報告があるが、同じく消化器系の一部である口腔粘膜上皮についての研究はまだ多くはなされていない。

我々の研究室では、口腔におけるニュートリゲノミクスとして、ビールの原材料であるホップや、キノコに含まれるアミノ酸の一種であるエルゴチオネインの、口腔粘膜上皮に対する作用に関しての研究を行っている。これまで、培養細胞へのエルゴチオネインの添加により、

創傷治癒や結合組織の安定化に関わる、フィブリン安定化因子やフィブリノゲン遺伝子の発現が上昇することが見いだされ（図1）、エルゴチオネインの摂食が直接、口腔上皮と歯周組織の安定化に関与していることが考えられた。今後も食物摂取時に口腔内で起きている種々の現象を解明するため、さらなる検討を進めている。

【文献】

1. Müller M, Kersten S. Nutrigenomics : goals and strategies. Nat Rev Genet 4 : 315-322, 2003.
2. Hooper LV, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science 5055 : 881-884, 2001.
3. Palozza P, et al. beta-Carotene downregulates the steady-state and heregulin-alpha-induced COX-2 pathways in colon cancer cells. J Nutr 135 : 129-136, 2005.
4. Murakami A, et al. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. Cancer Res 60 : 5059-5066, 2000.

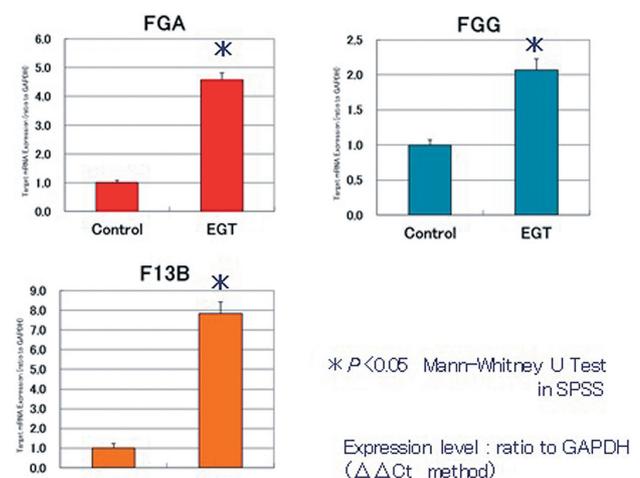


図1 エルゴチオネインの添加による各遺伝子発現の上昇
ヒト歯肉上皮前駆細胞の培養液へのエルゴチオネイン（EGT：1 mM）の添加により、フィブリノゲン遺伝子（FGA、FGG）およびフィブリン安定化遺伝子（F13B）の有意な発現上昇が確認された。

[最近のトピックス]

リアルタイムイメージングと可視化実験法による幹細胞研究

田巻 玉器

北海道医療大学歯学部口腔構造機能発育学系組織学分野

Tamaki YOKOHAMA-TAMAKI

Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, Health Science University of Hokkaido

生物の体を形成する細胞はたえず新しい細胞と入れ替わっている。体性幹細胞は生涯に渡って老化や損傷により機能しなくなった細胞の代替細胞を供給している。体性幹細胞は胚性幹細胞とは異なり、細胞系譜に有る一定の臓器特異的な制限がある。これまでに骨髄、脳、肝臓、脾臓、皮膚、歯、筋、生殖器など体の様々な臓器で体性幹細胞の存在が示されている。幹細胞の発生や維持は細胞や細胞外マトリックスが形成する特殊な微小環境によって調節されていると考えられているが、その詳細は明らかでは無い。近年、リアルタイムイメージング技術を使って幹細胞の複雑な挙動を生組織内で観察する試みが行われている。特に造血系幹細胞や神経幹細胞をターゲットにした幹細胞生物学研究では遺伝子改変マウスを使った解析が進み、幹細胞の存在部位や分化調節機構が明らかになりつつある。これらの先行研究の多くは組織内の目的の細胞を可視化するために、臓器特異的な幹細胞マーカーや目的タンパク質のプロモータ領域に蛍光もしくは発光タンパク質を挿入した遺伝子改変マウスを使用している。しかし立体的な構造内部で特定の細胞を観察する場合は顕微鏡の焦点深度の限界が問題となる。この問題に対する1つの手段として薄切化した胚や組織を共焦点レーザー顕微鏡上で培養しつつタイムラップ撮影を行う手法がとられている。Boisset JCらはLy6a (Sca-1) promoterの下流にGFPを結合させた遺伝子改変マウス (Ly-6 A-GFP mice: すべての造血系幹細胞でGFPが発現するマウス) の胎仔を使用して胎生期の造血幹細胞の発生を観察し、大動脈腹側内腔の内皮細胞から実際に造血幹細胞が出芽する様子を捉えている(1)。またMiyataらはコラーゲンゲルに埋没したマウスの大脳スライス培養を行い、神経幹細胞が非対称分裂を行う瞬間を捉えている。さらに連続撮影を行った結果、分裂後の娘細胞のうち神経繊維が維持されたものは、そ

うではない細胞にくらべて脳壁内部を素早く遊走してニューロンに分化することが明らかになった(2)。組織内ライブイメージング法では従来の固定サンプルや細胞培養による実験では捉えきれなかった三次元的な空間と時間軸を加えた解析が出来るため、従来考えられてきた幹細胞のモデルとは異なる幹細胞の振る舞いが報告されている。我々はマウスの切歯に存在する歯の上皮系幹細胞を調節する仕組みを解析している。今後非侵襲的なライブイメージング技術を使ってより詳細な歯の幹細胞の維持や分化調節機構の解明に取り組みたい。

参考文献

1. Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C. Nature. 2010, 4; 464 (7285): 116-120. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium.
2. Miyata T, Ogawa M. Curr Biol. 2007, 23; 17 (2): 146-151. Twisting of neocortical progenitor cells underlies a spring-like mechanism for daughter-cell migration.

[最近のトピックス]

インプラント周囲炎への外科的対応

白井 要, 古市 保志

口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

インプラント治療は、歯の喪失による失われた咬合機能の回復に有効な治療法として日常的なものとなりつつある。しかしながら、インプラント治療により咬合機能が回復する一方で、インプラント周囲疾患が多く認められるようになってきている。インプラント周囲疾患には、インプラント周囲炎とインプラント周囲粘膜炎がある。インプラント周囲炎は骨破壊を伴う炎症性疾患で、インプラント周囲粘膜炎は周囲粘膜組織に限局した骨吸収を伴わない可逆性炎症と定義されている¹⁾。適切な診断のもとで埋入されオッセオインテグレーションの獲得によって咬合機能が可能となったインプラントでもメンテナンスが十分に行なわれなければ、インプラント周囲疾患を引き起こす。インプラント周囲疾患は、インプラント周囲の細菌感染によりインプラント周囲軟組織の炎症（インプラント周囲粘膜炎）が惹起され、それに引き続きインプラント周囲の骨破壊（インプラント周囲炎）が認められる疾患の総称である。インプラント周囲疾患の罹患率には様々な報告がある。インプラント周囲疾患に罹患したインプラントを1本以上有している患者はインプラント埋入患者の約80%いると言われている²⁾。また、インプラント周囲炎はインプラントを埋入した患者の約30%が罹患しているという報告もある³⁾。このように、インプラント周囲疾患は罹患率の高い疾患で今後も増加する傾向にある。しかしながら、インプラント周囲炎に対する治療法については未だ確立されていないのが現状である。

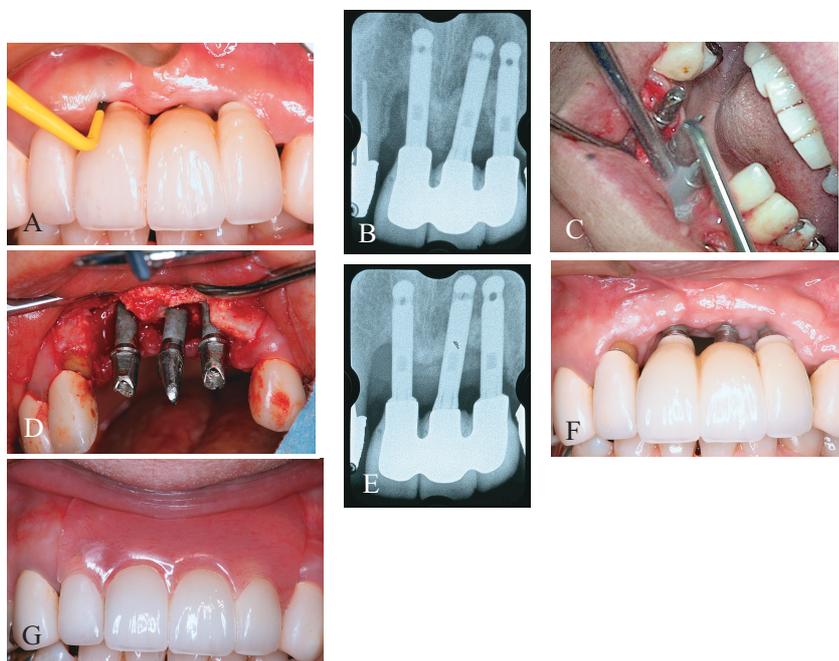
インプラント周囲炎はインプラント周囲粘膜炎と異なり、周囲組織破壊が周囲骨まで波及していることから治療には外科的処置を行うことが多い。動物研究や臨床研究結果として、インプラント周囲炎に罹患した周囲組織には、非外科的処置より外科的処置を行ったほうが臨床

成績が良いことが報告されている^{4),5)}。さらに、累積的防御療法（CIST）¹⁾から、インプラント周囲骨がエックス線写真で3mm以上吸収していれば外科処置の適応となることから、インプラント周囲炎には外科処置が必要なケースが多い。

インプラント周囲炎に対する外科処置として、粘膜弁根尖側移動術を用いた切取的外科療法と自家骨/骨補填材料を用いた骨再生療法が行なわれている。良好な予後を得るために重要なことは、両手法においてインプラント体表面の汚染物除去を徹底的に行うことである。下記に、粘膜弁を剥離翻転することによって汚染したインプラント体を露出させ、インプラント体表面にエアアブレーション（図-C）を行った症例を紹介する（図A-G）。この方法によってインプラント体表面の汚染物は肉眼的には効果的に除去されていた（図-D）。また、粘膜弁を根尖側に移動することによってポケットの除去が確実に行なわれ、患者による清掃が容易になった（図-F）。周囲軟組織治療後はポケット深さとBOPの減少を認めたことから、周囲軟組織の再付着が促され健康な周囲軟組織の回復に至ったと考えられる。今後は、確実な除染と周囲粘膜への適切なマネージメントを行うことによってインプラント周囲炎における炎症の消退と、健康なインプラント周囲組織の回復・維持が可能か症例を重ねながら検討してゆく予定である。

<参考文献>

- 1) Mombelli A & Lang P. 1998 Periodontology 2000 17 : 63-76
- 2) Roos-Jansäker, et al. 2006 J Clin Periodontol 33 : 929-935.
- 3) Fransson C, et al. 2005 Clin Oral Implant Res 16 : 440-446.
- 4) Schwarz F, et al. 2006 J Clin Periodontol 33 : 584-595.
- 5) Renvert S, et al. 2009 J Clin Periodontol 36 : 604-609.



図：インプラント周囲炎に対する外科処置
 A：術前の口腔内写真（上部構造装着後 14年、プロービングデプス 9 mm）
 B：術前のエックス線写真
 C：術中のエアアブレーション
 D：インプラント体表面の汚染物除去後
 E：術後1年後のエックス線写真
 F：術後1年後の口腔内写真
 G：オーラルスクリーン装着後

[最近のトピックス]

誤った折りたたみ

尾西みほ子

北海道医療大学歯学部生化学分野

アミロイド病は、タンパク質が誤った構造に折りたたまれ、繊維状の不溶性凝集物、アミロイドへ転換すること起因する病気の総称であり、現在、ヒトのアミロイド病に関連するタンパク質が20種類以上認められている(表1)。それらの中には、アミロイドが脳に沈着するAlzheimer病の β -アミロイド、Parkinson病の α -シヌクレイン、海綿状脳症の異常プリオンがあり、重篤な神経障害を引き起す。誤った構造に折りたたまれたタンパク質は通常分解される。しかしこれらの病気では、誤った構造に折りたたまれたタンパク質やその部分的分解物が細胞質に蓄積する。

タンパク質はアミノ酸配列の情報のみにしたがって自然に本来の二次構造、三次構造をとる。三次構造が完成した後、各サブユニットは自発的に集合して四次構造を形成する。ポリペプチド鎖の折りたたみは、短いポリペプチド鎖領域で α -ヘリックス、 β -シート、ループ、ベント、 β -ターンなどの二次構造が形成されることにより始まる。側鎖同士の非共有結合(疎水性相互作用、水素結合、静電的相互作用、van der Waals力)による相互作用により、部分的に折りたたまれたポリペプチド鎖が三次構造を形成していく過程で、中間体としてモルテングロビュール(molten-globule)状態になる。この状態は二次構造領域が非常に動きやすく、二次構造のない状態と平衡状態にある。モルテングロビュール状態で側鎖同士の相互作用により構造の再構成が起き、次いでジスルフィド結合の形成が起き、最終的にGibbsの自由エネルギーが最も低い安定な折りたたみ構造をとる。

細胞には、折りたたみの過程を促進するシス-トラン

ス-プロリルイソメラーゼ、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、シャペロンタンパク質がある。タンパク質は折りたたまれない状態でミトコンドリアや小胞体の脂質二重層を通過し、その後再び折りたたまれる際にそこに局在しているシャペロンタンパク質が必要とされる。

細胞内のタンパク質濃度は、合成速度と変性速度とによって制御されている。タンパク質を分解する酵素や細胞小器官は、変性したタンパク質を認識し、速やかにそれを除去する。真核細胞ではユビキチン-プロテアソーム経路とリソソームによるタンパク質分解の二つの経路が、誤って合成されたタンパク質の分解を担っている。ユビキチン-プロテアソーム経路は選択的なタンパク質分解の主要経路であり、ユビキチンで標的タンパク質に目印を付し、プロテアソームにより素早くタンパク質を分解する。リソソームによるタンパク質の分解経路には、自己の細胞質成分を分解するオートファジーがある。小胞体から生じた膜に細胞質の小領域やミトコンドリアのような細胞小器官が囲まれてオートファゴソームが生じ、これがリソソームと融合し、ファゴリソームができ、リソソームの分解酵素により内容物が分解される。

Alzheimer病についてミトコンドリアの機能不全、 β -アミロイド、ガングリオシド、タウ、ユビキチン化されているがプロテアソーム分解に抵抗性を示す成分の存在、カルシウムイオンによる制御、 α -シヌクレインの影響など多方面からのアプローチがなされている。「アミロイドがなぜ生じ、なぜ分解されないのか」、現在、最も完全な解明が待たれているテーマの一つである。

表1 主なアミロイドーシスと関連タンパク質、ペプチド

Diseases	Main aggregate component
Alzheimer's disease	Amyloid β peptides, tau protein
Spongiform encephalopathies	Prion
Parkinson's disease	α -Synuclein
Primary systemic amyloidosis	Ig light chain
Secondary systemic amyloidosis	Serum amyloid A
Front-temporal dementias	Tau
Senile systemic amyloidosis	Transthyretin
Familial amyloid polyneuropathy I	Transthyretin
Hereditary cerebral amyloid angiopathy	Cystatin C
Haemodialysis-related amyloidosis	β_2 -Microglobulin
Familial amyloid polyneuropathy III	Apolipoprotein AI
Finnish hereditary systemic amyloidosis	Gelsolin
Type II diabetes	Amylin
Medullary carcinoma of the thyroid	Calcitonin
Atrial amyloidosis	Atrial natriuretic factor
Hereditary non-neuropathic systemic amyloidosis	Lysozyme
Injection-localised amyloidosis	Insulin
Hereditary renal amyloidosis	Fibrinogen α -A-chain, transthyretin, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, lysozyme, gelsolin, cystatin C
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase I
Huntington's disease	Huntingtin
Spinal and bulbar muscular atrophy	Androgen receptor
Spinocerebellar ataxias	Ataxins
Spinocerebellar ataxia 17	TATA box-binding protein

[最近のトピックス]

メタルに代わる審美的な補綴装置を目指して -カタナジルコニアMLを用いた臨床例-

赤沼 正康, 石川 昌洋, 越智 守生

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系クラウンブリッジ・インプラント補綴学分野

ジルコニアは高強度、高靱性のセラミックス材料であり、審美的な観点からも金属に代わり広く臨床応用されてきている。多くの製品では、ジルコニアでフレームワークを製作し、そこにポーセレンを築盛し審美的な補綴装置を製作している。しかし、ジルコニアへ築盛したポーセレンはチッピングや剥離を起こす場合があると報告されている (Fischer J et al., 2009)。そこで本講座では、チッピングや剥離を防ぐ目的で開発されたカタナジルコニアMLを用いたフルジルコニアブリッジ症例を経験したので報告する。

カタナジルコニアMLの特徴は、優れた耐水熱劣化を有し、高透光性で歯冠色をしたジルコニアである。さらに、ボディ (デンチン) からエナメルを表現する4層構造になっていることである。色調はA Light (A1.5~2), A Dark (A2.5~3.5), B Light (B1.5~2.5) の3シェードのディスクから選択する。本症例ではA Darkを用いた (図1)。また、ポーセレン築盛の必要がないため、支台歯の形成量も0.5~1.2mm程度とメタルによる補綴装置の条件に近く、生活歯への適応も広まると考えられる (図2, 3)。

本症例では、審美的に修復されたことで患者の満足が得られた。しかし、ジルコニアによる補綴装置は硬質であるため、金属修復物と比較して対合歯の摩耗に注意しなければならない。そのため専用のポイントや研磨剤を用いて滑沢な研磨面に仕上げ装着した。今後、長期的な経過観察を行っていく必要がある。

文献

Fischer J, et al. Impact of thermal misfit on shear strength of veneering ceramic / zirconia composites. Dent Mater. Apr ; 25(4) : 419-23, 2009



図1 カタナジルコニアML



図2 初診時



図3 カタナジルコニアML ⑦6⑤ Br装着後

北海道医療大学歯学会会則（2006年12月15日現在）

第1章 総 則

（名 称）

第1条 本会は北海道医療大学歯学会（The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido）と称する。

（目 的）

第2条 本会は北海道医療大学歯学部（以下本学部と略す）を中心に、会員相互の緊密な協力により、学術研究の推進・専門技術の錬磨を計り、歯学の進歩・発展に寄与するとともに、会員の親睦を図ることを目的とする。

第2章 会 員

（会 員）

第3条 本会は以下の会員よりなる。

1. 正会員
歯学の研究に従事し、本会の目的に賛同する者、本学部教職員・大学院生・研究生・臨床研究生・歯科臨床研修医・卒業生および本学部元教育関係者で理事会の承認を得た者。
2. 名誉会員
本会の設立または発展に、特に功勞のあった者で、常任理事会が推挙し、理事会、評議員会の議を経た者。なお、名誉会員には名誉会員証を贈るほか会員の権利を保有し、年会費一切の費用を徴収しない。
3. 準会員
歯学教育・診療関係者で理事会の承認を得た者。
4. 学生会員
本学部専門課程の学生で理事会の承認を得た者。ただし、学生会員は卒業後正会員に移行するものとする。
5. 賛助会員
本会の目的および事業に賛同し、協力・支援する個人・団体等で、理事会の承認を得た者。

（入 会）

第4条 本会に入会を希望する者は、所定の申し込み書に必要事項を記入の上本会事務局に申し込むものとする。

（退 会）

第5条 会員で退会を希望する者は、速やかにその旨を本会事務局に通知すること。ただし、納入済み会費の返還はこれを行わない。

（会員資格喪失）

第6条 会員は以下の事由によりその資格を喪失する。
1. 2年以上会費の未納、所在不明または連絡のつかない者。

2. 本会の名誉に反する言動のあった者については、会長は理事会、評議員会の議を経て退会を勧告または除名することがある。

（再入会）

第7条 会費未納により会員資格を喪失した者が再入会を希望する場合は、2年分の未納会費を納入後入会手続きをとるものとする。

第3章 役員および運営

（役 員）

- 第8条 本会に以下の役員をおく。
会長1名、専務理事1名、常任理事若干名、理事若干名、監事2名、評議員若干名、および常任委員若干名
1. 会長は本学部教授の中より、理事会が推薦し、評議員会の議を経てこれを決める。会長は本会を代表し、会務を統括する。
 2. 専務理事は理事会の議を経て会長が委嘱する。専務理事は会務の運営処理を推進する。
 3. 常務理事は理事の中より選出し、会長が委嘱する。常任理事は常任理事会を組織し、会務を分担し、執行する。分担する会務は、庶務、会計、編集、企画、その他とする。
 4. 理事は本学部教授、ならびに3名以上の理事の推薦を受け理事会の承認を得た者とする。理事は、理事会を組織し、役員の推薦など会務に関する重要事項を審議する。
 5. 監事は理事会の議を経て会長がこれを委嘱する。監事は会計およびその他の会務を監査する。また必要に応じ、理事会に出席する。
 6. 評議員は本学部教授、助教授、専任講師で構成するほか、会長の推薦により理事会の承認を得た者とする。評議員は評議員会を組織し、会長の諮問に応じて必要事項を審議する。
 7. 常任委員は理事会の議を経て、会長がこれを委嘱する。常任委員は常任理事を補佐し、会務の分掌処理にあたる。

（会議の成立条件）

第9条 理事会、評議員会は構成員の2分の1以上の出席（委任状を含む）をもって成立し、議事は出席者の過半数によりこれを決する。

（任 期）

第10条 各役員は任期は2年を原則とする。ただし、再任を妨げない。

第4章 事 業

第11条 本会は第2条の目的を達成するために以下の事

業を行う。

1. 総会

総会は会長の召集により年1回学術大会を開催し、会務等について報告する。また、必要に応じ会長は臨時総会を開催することがある。

2. 学術大会

学術大会は年1回以上開催し、会員の研究発表、その他学術発展に関する行事を行う。

3. 学術講演会、研修会

4. 会誌

本会は機関誌“北海道医療大学歯学雑誌 (The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido)”を年2回発行し、会員に配布する。会誌は逐次増刊することが出来る。北海道医療大学歯学雑誌の投稿規定ならびに論文査読規定については別に定める。

5. その他

本会の目的達成に必要と認めた事業。

附 則

1. 本会則は昭和61年8月1日より施行する。
2. 本会則は平成7年3月1日より施行する。
3. 本会則は平成8年4月1日より施行する。
4. 本会則は平成17年4月1日より施行する。

第5章 会 計

(運営経費、会計)

第12条 本会の運営経費は会員の納入する会費、寄付金、その他の収入をもってこれにあてる。

2 各会員の会費は以下の通りとする。

イ 正会員

入会金 3,000円 年会費 5,000円

ロ 準会員、学生会員

年会費 3,000円

ハ 賛助会員

入会金 10,000円 年会費 30,000円

ただし新入会員（正会員、賛助会員）で、会費3年以上を前納した者に対しては入会金を免除する。なお事業の目的に応じ、臨時会費を徴収することがある。

3 本会の会計年度は1月1日より12月31日とする。

(会計報告)

第13条 本会の収支決算については、理事会、評議員会の承認を得て、総会において会員に報告しなければならない。

第6章 雑 則

(事務局)

第14条 本会の事務局は本学部内におく。

(会則の改廃)

第15条 この会則に定めるもののほか、本会則の実施に必要な内規は理事会の議を経て別に定めるものとする。

第16条 本会則の改廃は理事会、評議員会の承認を得て、会長は会員に報告しなければならない。

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2012年6月30日現在）

1. 投稿資格

著者は、原則として共著者を含め、本会会員に限る。ただし、非会員が共著者となる場合には、1年分の会費を徴収する。

2. 生命倫理への配慮

- 1) 臨床研究は、ヘルシンキ宣言の主旨にそったもので、「北海道医療大学倫理委員会」の承認を得たものとする。
- 2) 人の遺伝子解析を含む場合は、本学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画および実施に関する倫理規程」に基づき、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする。
- 3) 動物実験は、「北海道医療大学動物実験規程 (Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals in Health Sciences University of Hokkaido)」に基づき、「動物実験センター管理運営委員会」の審査を経たものとする。

なお、本学以外の研究機関等で行われた研究については、当該研究機関等の倫理委員会等で承認を得たものとする。

3. 論文の種類及び内容

- 1) 論文の種類は、原著論文 (Original)、症例報告 (Clinical report)、総説 (Review)、解説 (Comment)、システマティックレビュー (Systematic review)、臨床統計 (Clinical statistical survey) とする。
- 2) 論文の内容は、他の刊行物に未発表のものに限る。
- 3) 本誌はその他に、ミニレビュー、最近のトピックス、歯学情報、本学会講演抄録、学会関係記事、学位論文などを掲載する。

4. 査読および採否

- 1) 投稿論文は、編集委員会および編集委員会の依頼する専門家により査読される。
- 2) 採否については、査読の結果に基づき編集委員会が決定する。

5. 投稿論文の作成

- 1) 投稿論文は、投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること。
- 2) 投稿論文は、表紙、チェックリストシート、英文抄録 (300語以内)、本文、表、図および図表説明文の順番にまとめる。
- 3) 投稿原稿は、2部 (正1部、コピー1部) とする。最終的に論文掲載を認められた際には投稿原稿とともにUSBメモリー (USBメモリーは印刷終了後にお返しします) を提出すること。
- 4) 和文論文の本文については、原則として、緒論 (緒言)、方法 (材料および方法)、結果、考察、結論 (結語)、謝辞 (必要な場合のみ)、文献の順に記載するものとする。
- 5) 英文論文の本文については、原則として、Abstract (300語以内)、Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Ac-

knowledgment (必要な場合のみ)、Referencesの順に記載するものとする。

- 6) 投稿論文のヘッダーに右詰めで、名前、所属さらに初稿なのか修正論文なのかがわかるように記載する。
- 7) 投稿時、著者全員が編集委員会に当該論文の共著者である旨の承諾許可をメールで送信するものとする。

6. 最近のトピックスの作成

- 1) 最近のトピックスは、投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること。
- 2) 最近のトピックスは、作成した文書ファイル (Microsoft Word) をe-mailの添付文書として編集委員会まで送信すること。e-mailでの送信が不可能な場合は、作成した文書ファイルをUSBメモリーに保存して提出すること。

メールアドレス: takuma@hoku-iryo-u.ac.jp

件名: 歯学雑誌, 最近のトピックス

ファイル名: 最近のトピックス, 講座名, 著者名

- 3) 最近のトピックスは、原則1トピックスにつき1ページでの掲載とする。
- 4) 最近のトピックスは、全角文字で1800字程度にまとめること (参考文献リストを含む)。原稿に図・表を添える際は、以下の例に従って、片段サイズの図・表1つにつき本文の文字数を500文字程度削減すること。

例: 本文のみ1800字程度

(第28巻/第1号 35頁 参照)

本文1300字程度+片段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

(第27巻/第1号 37頁 参照)

本文800字程度+片段サイズの図・表2つ+それぞれの図・表の説明文

(第27巻/第2号 109頁 参照)

本文800字程度+両段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

7. 投稿論文の校正

- 1) 投稿論文に対する著者校正は原則として1回とする。
- 2) 修正論文は、特別な事情がない限り一週間以内、校正は48時間以内に返却するものとする (返却、連絡が無い場合は、投稿を取り下げたものと判断する)。

8. 証明書等の発行

- 1) 投稿原稿の受付日は、編集委員会に到着した日付とする。
- 2) 受理証明が必要な場合には、掲載が決定した後に受理証明書を発行する。

9. 掲載料および別刷料

- 1) 掲載料は、刷り上がり10頁まで無料とする。これを超過した場合には、編集委員会が依頼したものを除き、1頁1万円の著者負担とする。

- 2) カラー頁は、無料とする。
- 3) 別刷料については、50部まで無料とし、これを超過する場合（50部単位）には著者の実費負担とする。

10. 著作権の帰属

本誌に掲載された著作物の著作権は東日本歯学会に帰属する。本会はこれら著作物の全部または一部を、ネットワーク媒体を含む媒体に掲載・出版することが出来る。ただし、論文の内容については、著者が全ての責任を負う。

11. 著者のプロフィール

巻末に著者のプロフィールを記すので、著者のスナップ写真と経歴を提出すること。

12. 原稿の送付および本誌に関する問い合わせ

住所：〒061-0293 北海道石狩郡当別町字金沢1757番地
北海道医療大学歯学部・口腔生物学系・生化学分野
北海道医療大学歯学雑誌編集委員会（田隈 泰信）

Tel：0133-23-2394

e-mail：takuma@hoku-iryo-u.ac.jp

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2012年6月30日現在）

本誌の体裁を統一するために、「投稿の手引き」に準拠して、ご執筆下さいませようお願い致します。

原稿はすべてA4版とし、下記の項目1)~7)のすべてを、2部提出して下さい。査読後、論文掲載が認められた際には、論文原稿を収めたUSBメモリー（USBメモリーは、印刷終了後にお返しします）をプリントした最終原稿1部とともに提出して下さい。

- 1) 投稿原稿表紙
- 2) チェックリストシート
- 3) 英文抄録
- 4) 本文
- 5) 文献
- 6) 図、表
- 7) 図表説明文

1. 投稿原稿表紙

表紙には以下の事項を和文および英文で記入する。

- 1) 原稿の種類
- 2) 表題
- 3) 著者名および所属
- 4) キーワード（5語以内）
- 5) 別刷数（50部単位）
- 6) 連絡先（郵便番号、住所、電話、e-mail）

1) 表題

- (1) 一般固有名詞として通用していない商品名は用いない。
- (2) 和文表題には、原則として略号以外の英文字を用いない。別にスペースも含めて35字以内のランニングタイトルを付ける。
- (3) 英文表題は和文表題の内容と一致させる。文頭のみ大文字とし、他は小文字とする。また、別にスペースも含めて45字以内の英文ランニングタイトルを付ける。
- (4) 副題はできる限り用いない。ただし、必要な場合は次の例に準拠する。続報、第2報などの表記は認めない。

和文・英文：-□□□□□□□□-

2) 著者名および所属

- (1) 氏名の英文表記では、姓は大文字、名は先頭のみを大文字とする（例：Akira YAMADA（山田 昭））。
- (2) 著者の所属が2ヶ所以上の場合には、所属の著者に¹⁾、²⁾、³⁾を付ける。

3) キーワード

5語以内のキーワードを付ける。英文の場合は、キーワードの先頭のみを大文字とし、他は小文字とする（例：Impression materials, Bone morphogenetic proteins）。

2. チェックリストシート

チェックリストの指示に従い、投稿原稿を確認する。著者全員のサインを取り、連絡先を記載する。

3. 英文抄録

300語以内の英文抄録を付ける。

4. 本文

- 1) 原稿はA4判用紙（縦）にワードプロセッサなどによる横書きとする。書式は以下に従うこと。

・ Windows Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁35文字×26行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

・ Macintosh Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁30-35文字×22-25行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

- 2) 原稿の下段中央にページ番号を記す。
- 3) 論文の原則的な構成は、緒論（緒言）、方法（材料および方法）、結果、考察（結果および考察）、結論（結語）、謝辞、文献、図の説明、図表とする。
- 4) 見出しを用いるときは次の順に項目をたてる。
3 → 3) → (3) → a → a) → (a)
- 5) 文章は、専門用語を除いて、常用漢字、新かなづかい、ひらがなは口語体とする。
- 6) 数字はアラビア数字とし、単位の記号はJIS・Z8202およびZ8203に準じ、国際単位系(SI)を使用するよう努める。また単位にピリオドをつけない。
（例：GHz, MPa, kW, cm, mV, μm, nA, pF, mL, mmol, N (kgf), K, °C, min）
- 7) 学術用語は、原則として「文部省学術用語集」に準拠する。
- 8) 商品名、器械名などは、可能な限り一般化されている「カタカナ書き」とする。英文字で表す場合は、かしら文字のみ大文字にする。
- 9) 外国の人名などの固有名詞は原則として原綴とする。
- 10) 連続した数値は「,」でつなぎ、最後に単位をつける。（例：10, 20, 30°C）
- 11) 製造社の表記法は（ ）内に会社名のみを記し、社製および製作所、工業社製、株式会社などを入れない。
例：（型式名、製造会社名）、（略号、製造会社名）
（X-3010、日立）（EPMA、日本電子）
- 12) 図表の挿入場所を本文右欄外に朱書きする。

5. 文献

- 1) 文献リストは、アルファベット順（A, B…Z順）で作成する。また本文中の引用箇所以下に以下の体裁に従い、文献内容を記載する。

例：単著者（Izumi, 1999）（和泉, 1999）、2名（Izumi & Ito, 1998）（和泉, 伊藤, 1998）、3名以上（Izumi et al., 1970）（和泉ら, 1970）、2編以上（Sato et al., 1988; Izumi,

1999) (佐藤ら, 1988; 和泉, 1999) (Izumi, 1999a, b)

※「,」や「;」の様な記号は, 日本文の場合は全角, 英文の場合は半角を使用する。

- 2) 文献として不適当なもの, 例えば未公表のデータや私信などは文献として引用しない。
- 3) 文献の著者または編集者が複数の場合にはet al., 他などとせず, その全部を記載する。
- 4) 著者名が欧字綴の場合は姓の後に名前の頭文字をつけ, また著者が複数の場合は最後の著者の前に&を入れる。
※ 著者間の「and」は記号「&」を使用すること。
- 5) 文献の記載方法の基本は次のとおりとする。

(1) 雑誌の場合

著者名 (複数の場合, 氏名を「,」で区切る.)。表題-サブタイトル-雑誌名 巻: 引用ページの始めと終わり, 発行年。

例: Izumi H, Ito Y, Sato M, Karita K & Iwatsuki N. The effects of inhalation anesthetics on the parasympathetic reflex vasodilatation in the lower lip and palate of the cat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273: R 168-R174, 1997.

(2) 単行本の場合

i) 章を参考にしたとき

例: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms.

In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974, p457-472.

ii) 個人または複数の著者の場合

例: Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd ed. London: S. Paul; 1986.

iii) 編集者, 監修者が著者の場合

例: Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York: Springer-Verlag; 1988.

iv) 団体, 組織が著者で, かつ出版社の場合

例: Virginia Law Foundation. *The medical and legal implications of AIDS*. Charlottesville: The Foundation; 1987.

v) 会議録全体を参考にした場合

例: Vivian VL, editor. *Child abuse and neglect: a medical community response*. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect; 1984 Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association; 1985.

(3) 分担執筆の場合

分担執筆者名: 分担執筆の表題, 書名 巻など, 発行所名: 発行年, 引用ページの始めと終わり。

例: 山田早苗: 橋義歯の力学-傾斜歯ブリッジの形成と設計について-。新臨床歯科学講座 3, 医歯薬出版: 1978, 157-165.

(4) 翻訳書の場合

著者 (翻訳者): 書名 (原著書名), 発行所名: 発行年, 引用ページの始めと終わり。

例: Davidge RW (鈴木弘茂, 井関孝善): セラミックスの強度と破壊 (*Mechanical behavior of ceramics*). 共立出版: 1982, 34-55.

6. 図

- 1) 用紙はA 4版 (縦) とし, 1枚ずつ別葉にする。
- 2) 各葉杖に, 図の番号, 著者名, 片段あるいは両段の指定, カラー印刷の有無を明記する。
- 3) 図の大きさは, 片段か両段一杯になることがのぞましい。刷り上がりを想定して, 図の大きさが片段で横幅45-68 mm, 両段で100-150 mmになるように縮小コピーし, 文字, 記号の大きさ, 線の太さなどをチェックする, 棒グラフなどのハッチングは識別可能なものにする。
- 4) 図中の文字は, 刷り上がりで本文とほぼ同じ10-13級 (7-9ポイント), 線の太さは0.15-0.3 mmになるよう原図を作成する。
- 5) 図や表はA 4縦で作成する。一ページに一つの図あるいは表とする。図のタイトルや表の説明 (Figure legends) は図の印刷を希望する位置に記載する。図と表の挿入箇所は投稿論文中の右余白に示すこと。
- 6) 組図の原稿は, 貼込み間隔や角度を正確にする。
- 7) 写真は, A 4判の用紙に貼り, 必要な文字, 記号などを記入する。写真の拡大率は, 単位長さのバーで表す。
- 8) 患者の顔や特徴ある身体の一部の写真を使用する場合は, 目隠し等により個人が特定できないように配慮するとともに, 患者本人あるいは後見人から文書により許可を得ること。
- 9) 記号は中心の明確な○●□■◇などを使用する。
- 10) 記号を使用する場合の凡例は, 脚注に置かず図中に入れる。

7. 表

- 1) 罫線はできる限り入れない。
- 2) 標準偏差は, () もしくは±とし, 信頼区間との混同を避けるために説明を入れる。
- 3) 表題が英文字の場合は書き出しのみを大文字にし, それ以後は小文字とする。しかし略号はこの限りではない。
- 4) 単位などの表記は同一言語に統一する。単位 (unit), 平均 (mean), 標準偏差 (SD)

(例：)

Table1 Mechanical properties of specimen

Specimen	Tensile strength Mpa	Elongation %
A	500 (20)	10.2 (3.3)
B	300 (15)	5.4 (2.3)

() : SD

表1 試料の力学的性質

試料	引張強さ Mpa	伸び %
A	500±20	10.2±3.3
B	300±15	5.4±2.3

平均±標準偏差

8. その他

本規定ならびに「投稿の手引き」に規定されていない事項については、編集委員会にお尋ね下さい。
 投稿の手引き、投稿規定、チェックリストのファイルは、ホームページ (<http://www.hoku-iryu-u.ac.jp/~dental-society/>) からダウンロード出来ます。

北海道医療大学歯学会会員 各位

北海道医療大学歯学会第32回学術大会一般演題募集のご案内

第32回学術大会・平成26年度歯学会総会ならびに講演会を開催致します。

記

日時： 平成26年3月1日(土) 午前10時 - 午後5時 (予定)
会場： アスティ45 12階 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス
札幌市中央区北4条西5丁目 (電話：011-223-0205)

講演会：「Translation on Biomedical Devices」

講師： 歐 耿良 (Keng-Liang Ou) 先生 (台北医科大学 教授)

演題・抄録申込み要領

申込み期限：平成26年1月17日(金) 必着

抄録作成方法と提出先

MS-Word形式 (A4サイズ, 明朝体, 12p, 余白：上下左右30mm) で記載

*裏面の原稿作成要領を参照

抄録はkaoruk@hoku-iryu-u.ac.jp宛に送信して下さい。原則として、同一講座・機関から2演題までとします。発表者(共同研究者含む)はすべて北海道医療大学歯学会会員および準会員に限ります。また、今年度のみの会員制度(5000円)もあります。

発表スライド提出期限と発表形式

[提出期限] 平成26年2月27日(木)

発表スライドをCD-Rに入れて歯科麻酔科学分野(金澤)までご持参下さい。事前提出できない方は、発表1時間前までに提出し、プロジェクターで試写して下さい。

発表補助(スライド進行係)を必要とされる方はご自身で手配をお願いします。

[発表形式] 口演のみ：発表7分、質疑応答3分(予定)

発表はプロジェクター1台と会場で用意するPCを使用

OS：Windows 7 Power Point 2010使用

北海道医療大学歯学会 抄録原稿作成要領

MS-Word形式（A4サイズ，明朝体，12p，余白上下左右30mm）で記載

1. 演題名
2. 発表者氏名：演者の前に○印をつける.
3. 所属：発表者の所属が2つ以上の場合，アスタリスク（*）で所属を区別する.
4. 本文：一般発表の場合 【目的】，【方法】，【結果および考察】，【結論】
5. 本文：症例発表の場合 【目的】，【症例】，【結果および考察】あるいは【経過および考察】

<p>LL-37は・・・・・・・・・・抗菌ペプチドである</p> <p>○奥村一彦*，平 博彦**</p> <p>*北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野，</p> <p>**顎顔面口腔外科学分野</p> <p>【目的】・・・</p> <p>【方法】・・・</p> <p>【結果】・・・</p> <p>【結論】・・・</p>

* 歯科医師生涯研修カードをお持ちの方はご持参下さい。

発表・抄録に関するお問い合わせ・申込み先
 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系学系
 歯科麻酔科学分野
 第32回学術大会事務局：金澤 まで
 〒061-0293石狩郡当別町金沢1757番地
 TEL：0133-23-1445
 E-mail：kaoruk@hoku-iryu-u.ac.jp

編 集 後 記

平成25（2013）年は、歯学会員の皆様にとりまして、どんな年だったでしょうか。異次元の金融緩和に始まったアベノミクスにより、日本経済は久しぶりに明るさを取り戻しつつあるようです。「じぇじぇじぇ」「今でしょ！」「お・も・て・な・し」など、流行語も笑顔と躍動感を含み、ロゲIOC会長の「TOKYO 2020」で大いに盛り上がりました。残念ながら村上春樹氏は今年もノーベル文学賞をのがしましたが、医学・生理学賞に膜融合タンパク質「SNARE」の研究者が選ばれ、同学の徒としては記憶に残る年となりました。ただし、浮かれ気分もここまで、キャロライン・ケネディ大使の着任を待っていたかのように、突如「防空識別圏」を重ねてきた巨大な隣国と一触即発の危機です。来年の日本がどうなっているか、とても心配です。

さて32巻2号の巻頭総説として、東城教授に大河の流を彷彿とさせるライフワーク「唾液腺におけるストア作動性Ca²⁺流入の活性化機構」を執筆して頂きました。岩清水のように滴り流れ出た研究の源流は、大小の滝や急流を下り、左右に大きく蛇行しながら、赤い夕日に染まる河口で静かに海と融合し、みごとに完結しました。奇妙な説だなと思いつつ、堤防の土手からこの大河を親しく眺めていた者の一人として、きわめて感慨深いものがあります。今後も、諸先生の貴重なライフワークを巻頭総説として掲載させて頂きたく、ご投稿をお待ちしております（田隈記）。

次号（第33巻、第1号）の発行は平成26年6月30日です。

投稿原稿募集の締め切りは平成26年3月31日必着と致します。期日厳守の上、ご投稿をお願いします。本誌投稿規定は、2013年第32巻、第2号の巻末をご参照ください。

編集委員会

委員長 田 隈 泰 信

越 智 守 生・斎 藤 隆 史・柴 田 考 典

東 城 庸 介・溝 口 到

(アイウエオ順)

北海道医療大学歯学雑誌 第32巻 第2号

平成25年12月31日

発行者 有 末 眞

編 集 北海道医療大学歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地

北海道医療大学内

電 話 0133-23-1211(内線2563)

電話/FAX 0133-23-1345(直通)

メールアドレス：iryodsh@hoku-iryodsh-u.ac.jp

印刷 山藤三陽印刷株式会社

札幌市西区宮の沢1条4丁目16番1号

電話 011(661)7163(代)

Dent J Health Sci Univ Hokkaido

REVIEW

- 1 **Mechanism of activation of store-operated Ca²⁺ entry in salivary gland**
Yosuke TOJYO (105)

ORIGINAL

- 17 **Specific properties of the cell proliferation in epithelial rests of Malassez.**
Yoshihito KURASHIGE, Yuji MURAI, Kai SHUDOU, Kaori MURATA, Sayaka YAMAZAKI,
Yoshinobu HAYASHI, Hiroki NAGAYASU, Yoshihiro ABIKO, Masato SAITOH (121)

CLINICAL REPORT

- 25 **A case of Giant Cell Tumor of Maxilla considered to be neoplastic lesions**
Jun SATO, Shintarou YODOGAWA, Takehiko SATO, Hiroyuki KITAJYO, Hiroki NAGAYASU,
Takanori SHIBATA, Makoto ARISUE, Koki YOSHIDA, Michiko NISHIMURA, Yoshihiro ABIKO (129)
- 31 **Cognitive behavioral therapy for glossodynia conducted by dentist : a case report**
Hideki SATOH, Hirofumi MATSUOKA, Koki YOSHIDA, Mitsuru MORIYA, Masafumi UTSUNOMIYA,
Hiroki NAGAYASU, Tomofumi KAWAKAMI, Yuji SAKANO, Itsuo CHIBA, Yoshihiro ABIKO (135)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

- 37 **Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces epigenetic modifications in human periodontal fibroblasts**
Osamu UEHARA (141)
- 39 **Inhibitory effects of *Canavalia gladiata* on experimental periodontitis induced in rats by *Porphyromonas gingivalis* infection**
Yuko NAKATSUKA (143)
- 41 **Regulation of Histone deacetylases and glucose transporters in mouse tooth development**
Yukiko SASAKI (145)
- 44 **Alteration of intracellular calcium signaling in human gingival fibroblasts with phenytoin application**
Yoshinobu HAYASHI (148)
- 47 **Differentiation of keratinocyte and ameloblast on gelatin-coated culture in mouse iPS cells**
Koki YOSHIDA (151)

DENTAL INFORMATION

- 49 **Recent topics** (153)