

第60回松本歯科大学学会 (総会)

■日時：2005年7月2日(土) 8:50~12:30

■会場：講義館201教室

プログラム

特 別 講 演

10:30~11:30 201教室

座長 小澤英浩 学会長

活性型ビタミンDはいかにして発見され、臨床医学に導入されたか

須田立雄 博士 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター副所長)

評議員会・総会 (2005年度)

11:40~12:30 201教室

一 般 講 演

8:25 開会の辞 増田裕次 教授

8:30 座長 増田裕次 教授

1. 機械的侵害刺激による帯状回ニューロンの反応

○富田美穂子¹, 川上順子², 浅沼直和¹¹(松本歯大・口腔生理), ²(東京女子医大・第一生理)

2. スポーツマウスガード装着前後の顎頭点部ならびに切歯点部の運動様相

—超音波パルスランダム3次元計測法の応用—

○鷹股哲也 (松本歯大・口腔診断), 倉澤郁文 (松本歯大・歯科補綴Ⅱ)

正村正仁 (松本歯大・小児歯科), 宮沢裕夫 (松本歯大・小児歯科),

山下秀一郎 (松本歯大・総合診療)

8:54 座長 酒匂充夫 講師

3. 歯牙3次元モデルの作成 —ボクセルモデル—

○永沢 栄¹, 小幡明彦², 新井嘉則³, 吉田貴光¹, 伊藤充雄¹, 黒岩昭弘⁴¹(松本歯大・歯科理工), ²(松本歯大・歯科矯正),³(松本歯大院・病態評価), ⁴(松本歯大・歯科補綴Ⅰ)

4. 有限要素法によるチタンインプラントの応力解析

- 永沢 栄¹, 早野圭吾¹, 吉田貴光¹, 溝口利英², 寺島伸佳¹, 田村 郁³,
伊藤充雄¹, 矢ヶ崎 裕³, 久保田 修⁴, 好村昌之⁴
¹(松本歯大・歯科理工), ²(松本歯大・総歯研・生体材料),
³(松本歯大院・生体材料), ⁴(株・ヨシオカ)

9:18 座長 伊藤茂樹 講師

5. 糖尿病を有する歯周病患者の長期メンテナンス症例

- 上條博之 (あうる歯科医院)

6. 白虎加人参湯を用いた糖尿病性口腔乾燥症治療薬の探求

- 藤垣佳久, 近藤 武 (松本歯大・口腔衛生), 今村泰弘, 田村 集,
板井丈治, 前田幸宏, 王 宝禮 (松本歯大・歯科薬理)

9:42 座長 今村泰弘 講師

7. ヒト CD 14陽性細胞から破骨細胞への分化におけるカルシトニン受容体関連蛋白質 mRNA の発現変動およびヒト破骨細胞に対するカルシトニン作用の解析

- 山本洋平^{1,2}, 溝口利英³, 武 郁子⁴, 山内広世⁵, 野口俊英¹, 宇田川信之², 高橋直之⁴
¹(愛知学院大・歯科保存Ⅲ), ²(松本歯大・口腔生化),
³(松本歯大・総歯研・生体材料), ⁴(松本歯大・総歯研・機能解析),
⁵(旭化成ファーマ・医薬営業本部)

8. 破骨細胞における p 38 MAP キナーゼの活性化は破骨細胞の延命を促進する

- 山下照仁, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之 (松本歯大・総歯研・機能解析),
田中 栄 (東京大・医学部・整形外科)

9. 顎顔面領域における炎症・発痛関連遺伝子の同定

—cDNA マイクロアレイを用いて—

- 金銅英二, 姫野勝仁, 國分暁子, 田中丈也 (松本歯大院・生体調整),
島 麻子, 岩田幸一 (日本大・歯・生理学),
森本俊文 (松本歯大院・咀嚼機能)

講演抄録

特別講演 活性型ビタミンDはいかにして発見され、臨床医学に導入されたか

須田立雄（埼玉医科大学ゲノム医学研究センター副所長，特任教授）

活性型ビタミンDは、腎臓から分泌され小腸のCa吸収と骨の吸収を促進するホルモンである。私は、東京医科歯科大学で1960年に卒業後、同大学院に進学し1964年に同過程を修了した。その後、1968年～1971年にかけて米国ウイスコンシン大学生化学部 DeLuca 教授のもとに留学し、活性型ビタミンD₃ [1 α , 25(OH)₂D₃] の単離と構造決定に携わった。この留学時期は、ビタミンDが、生体内で更に代謝され活性型に変換されることがわかった時期と一致するものである。活性型ビタミンDの同定は、Kodicek 教授のグループ（英国）との熾烈な競争の中でなされたもので、同定にいたる歩みは、極めてドラマティックなものである。また、ビタミンDは肝臓（25位の水酸化）と腎臓（1 α 位の水酸化）で2度の水酸化反応を受けて活性化されることが明らかにされた。「腎臓で合成された1 α , 25(OH)₂D₃は、血行を介して小腸などの標的組織に運ばれ、そこで作用する。」という、今日の“ビタミンD代謝の常識”が確立したのである（図1）。

米国より帰国後、活性型ビタミンDの臨床応用を目指し、合成誘導体1 α (OH)D₃の合成に成功した。1 α (OH)D₃は、肝臓で速やかに1 α , 25(OH)₂D₃に代謝されることを明らかにし、臨床への道を開いた。現在、1 α (OH)D₃は慢性腎不全患者と骨粗鬆症患者の骨代謝異常改善薬として広く使われている。一方、1981年、活性型ビタミンDは生体内のCa代謝の調節に関与するのみならず、骨髄細胞のマクロファージへの分化や表皮細胞の分化を促進することを発見した。この発見により、活性型ビタミンDは細胞分化を調節する因子であるという概念が確立された。これらの研究が契機となり、活性型ビタミンDは、乾癬の治療薬として認可され広く使用適用されている。一方、血清Ca値上昇作用と副甲状腺ホルモン分泌抑制作用を分離したビタミンD誘導体の合成が試みられ、22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃が同定された。

22-oxa-1 α , 25(OH)₂D₃は、副甲状腺ホルモン分泌抑制作用が強いにも拘らず、血清Ca値上昇作用は低いため、2次性副甲状腺機能亢進症の治療薬として認可された。更に、活性型ビタミンDの類縁体は癌、免疫抑制、アルツハイマーなどの治療薬となる可能性も指摘され、臨床適応を目指した研究が進行している。

本講演では、活性型ビタミンDの発見に歴史を紹介し、更に活性型ビタミンDがどのようにして臨床応用されたかお話ししたい。

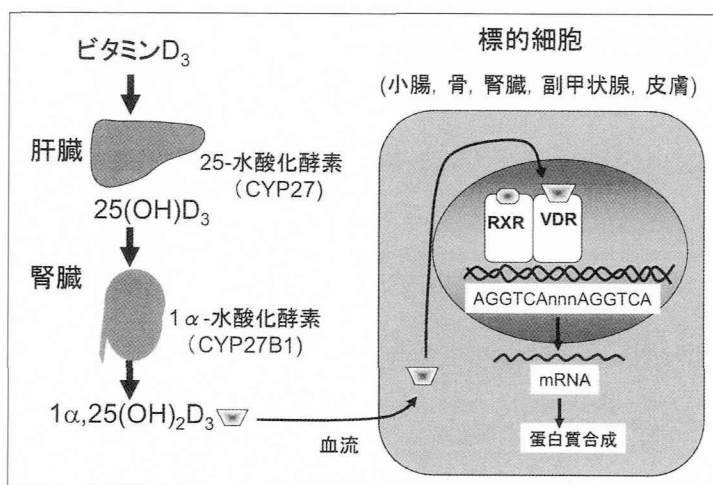


図1：ビタミンDの代謝と標的細胞での作用機構

1. 機械的侵害刺激による帯状回ニューロンの反応

富田美穂子¹, 川上順子², 浅沼直和¹

¹(松本歯大・口腔生理), ²(東京女子医大・第一生理)

【目的】

痛覚の主な中枢経路は腹側基底核群を経て大脳皮質体性感覚野に至る外側系経路と、視床髄板内核群から帯状回、島皮質、扁桃体へと投射する内側系経路である。しかし、この内側系経路に参与する帯状回の痛覚認知の役割は未だ不明な点が多い。そこで機械的侵害刺激を加えたラットの帯状回ニューロンの反応を組織学的手法、電気生理学的手法を用いて調べ、その性質および痛覚認知に関する特徴を検討した。

【方法】

侵害刺激に反応する帯状回ニューロンの確認には c-fos 免疫染色法を用いた。ウレタン麻酔下のラットの尾部に機械刺激装置を用いて侵害刺激を加え、これに反応を示す帯状回ニューロンを細胞外記録法で記録した。この記録から反応する神経の割合や反応状態を調べた。次に刺激強度を50, 100, 300 gと変化させた時の反応持続時間やスパイク頻度の変化を比較検討した。さらに脳室内に濃度の異なるモルヒネ (0.3, 3.0 or 30 μ g/3 μ l/10 min) を投与し、投与前後の侵害刺激 (300 g) に対する反応持続時間とスパイク頻度の相違からモルヒネの効果を調べた。

【結果】

侵害刺激を加えたラットの帯状回でニューロンの賦活マーカーである c-fos が発現した。帯状回領域1208箇所からのユニットを記録した結果、刺激に反応するニューロンが242箇所 (全体の約20%) から同定され、その中の82%は刺激に対して興奮性を示し残りの18%は抑制性を示した。刺激に興奮性を示すニューロンは反応様式の異なる NS (nociceptive specific neurons) と WDR-L (wide dynamic range-like neurons) の両タイプであった。WDR-L では刺激強度の増加に伴い反応持続時間とスパイク数の増加がみられそれらは相関関係を示した。また NS の反応持続時間とスパイク頻度はモルヒネ投与により抑制され、抑制の割合はモルヒネの濃度に依存傾向を示した。

【考察】

帯状回には機械的刺激に反応する NS と WDR-L の両タイプのニューロンが存在し、WDR-L は刺激強度を識別することが示唆された。NS の反応はモルヒネ投与により濃度依存性に抑制されることから、内側系伝達経路におけるオピオイド受容体、特に μ 受容体の分布が示唆される。内側系経路は情動面に関与しているという報告があることから、今後扁桃体の刺激により痛み情報の修飾が誘発されるかどうかを確かめる必要があるだろう。さらに痛み認知を抑制するような生体内変化、たとえば内因性オピオイドの分泌を促進させるような状態を確立する方法を検討していく予定である。

2. スポーツマウスガード装着前後の顎頭点部ならびに切歯点部の運動様相

——超音波パルスランダム3次元計測法の応用——

鷹股哲也 (松本歯大・口腔診断), 倉澤郁文 (松本歯大・歯科補綴Ⅱ),

正村正仁 (松本歯大・小児歯科), 宮沢裕夫 (松本歯大・小児歯科),

山下秀一郎 (松本歯大・総合診療)

【目的】

口腔領域のスポーツ外傷を予防する方法としてマウスガードの装着は有用であることが知られている。一方、マウスガード装着時の運動能力向上効果に関しては現在のところ明確な結論は出していない。スポーツの種類によってはマウスガード装着時の咬合の安定が運動能力向上効果に影響を与えとも考えられ、運動能力向上効果とどのような関係にあるかを調査する前段階として、マウスガードに対合歯咬合面形態を付与・非付与した時の咬合の安定を切歯点部・両側顎頭点部の運動範囲から調べた。

【方法】

被験者は安定した咬頭嵌合位を有し、顎機能に異常を認めない健康成人男性1名を対象とした。通法に従い対合歯の咬合面形態付与・非付与マウスガードを製作・装着し、超音波パルスランダム3次元計測装置（超音波動作解析器 CMS-20 S, Zebris 社製）にて、習慣性開閉口運動を行わせた時の切歯点部ならびに左右側頭頭点部の運動領域を測定した。

【結果】

矢状面における切歯点部と両側頭頭点部の運動範囲は、マウスガード装着前と咬合面形態非付与マウスガードでは有意な差はなく、咬合面形態付与マウスガードとの比較では有意に運動範囲が狭く観察された ($p \leq 0.01$)。

【考察】

今回、矢状面における運動範囲の結果から、咬合面形態付与マウスガード装着では咬合の安定が示唆されたが、今後、水平面・前頭面における測定結果をも参考とし詳細な分析を行う所存である。また、被験者数を増やすと共に、咬合挙上量との関係、マウスガード材料の弾性との関係、筋電図学的検討も考慮に入れ、咬合の安定と運動能力向上効果との関係を調査する予定である。

3. 歯牙3次元モデルの作成

——ボクセルモデル——

永沢 栄¹, 小幡明彦², 新井嘉則³, 吉田貴光¹, 伊藤充雄¹, 黒岩昭弘⁴

¹(松本歯大・歯科理工), ²(松本歯大・歯科矯正),

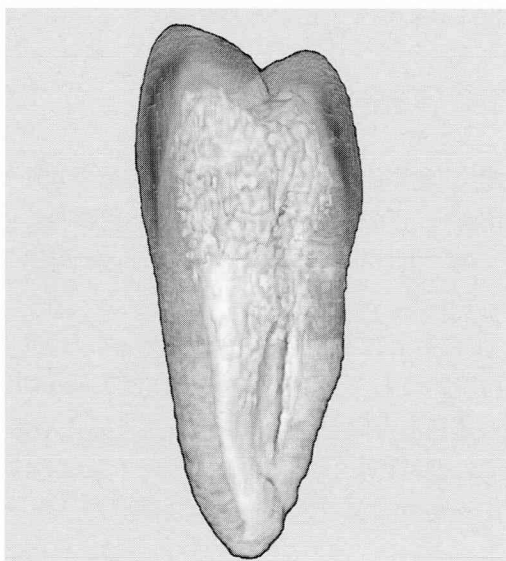
³(松本歯大院・病態評価), ⁴(松本歯大・歯科補綴 I)

【目的】

現在コンピューター技術の進歩はすばらしく、各種解析やシミュレーションがパーソナルコンピューター上で手軽に利用可能となっている。これ等を使用すれば、補綴物の最適設計や仮想治療実習が可能である。しかしながら、歯牙ならびに口腔内の3次元データが無いために容易には実行できないのが現状である。そこで、誰でもが使用できる3次元歯牙データベースの構築を目的とし、ボクセルモデルの構築を試みたので報告する。

【方法】

矯正治療により便宜抜去された人歯牙を、3次元マイクロCTにて0.1×0.1×0.1 mm 間隔でX線撮影した。得られた画像のアーティファクトを、フォトショップ (Adobe) を使用して消去した後、Micro-AVS (KGT) を用いて可視化した。



【結果】

可視化した上顎左側5番の画像を図に示す。可視化した画像からは、象牙質の内部構造と思われる像を見ることが可能であった。

Micro-AVSは、画像を自由に回転させることが可能であり、3次元構造を認識しやすかった。

【考察】

結果の図に示したごとく、画像から象牙質の内部構造様の像を確認することが可能であった。内部構造をも観察可能な3次元画像は、学生の学習に有用と思われる。

さらに、ハプティックデバイスと3次元データを使用すれば、仮想治療が可能であり、学生の教育に極めて有用であると考えられる。このデータを基に有限要素法用のデータを作成すれば、研究する上においても利用度が

高いものと思われる。

いずれにしろ、3次元データを、誰もが自由に使うことが出来れば、今まで考えられなかったような、様々な用途が開けるものと思われ、早急な構築が望ましい。

4. 有限要素法によるチタンインプラントの応力解析

永沢 栄¹, 早野圭吾¹, 吉田貴光¹, 溝口利英², 寺島伸佳¹, 田村 郁³,
伊藤充雄¹, 矢ヶ崎 裕³, 久保田修⁴, 好村昌之⁴
¹(松本歯大・歯科理工), ²(松本歯大・総歯研・生体材料),
³(松本歯大院・生体材料), ⁴(株・ヨシオカ)

【目的】

インプラントの普及に伴って、インプラント体の破壊によるトラブルが多く報告されている。インプラント体に負荷される応力の解明を目的とし、有限要素法による解析を行った。

【方法】

解析モデルは、ヨシオカ製チタンインプラント (Φ3.3 mm, 4 mm) ならびに日東製インプラントを選択した。

各モデルを約30000の3次元要素に分割し、有限要素法プログラム ANSYS (サイバーネットシステム) を用いて、弾性ならびに塑性解析を行った。

荷重は、ヘッド部に垂直ならびに45度方向に500 N の力が掛かるものとした。

材質は、グレード2, グレード4純チタンとTi-6 Al-4 V 合金とし、インプラントの強度解析が主目的であるため、顎骨は全て緻密骨とした。

【結果】

弾性解析の結果、一般的な直径3.3 mm のインプラント体では、構造を有しないアバットメント一体型のインプラント体であっても、45度方向500 N 荷重時には、グレード4純チタンの耐力500 MPa を超える応力が生じており、ブラキシズム等の異常な咬合力により疲労破壊が生じる可能性が示唆された。

塑性解析の結果、インプラント体とアバットメントが分離した構造のインプラントでは、垂直荷重には5000 N でも耐えうるが、45度方向に500 N の荷重では、ねじ部の破壊が予測された。インプラントの直径を4 mm にすると、応力ならびに変形が大幅に減少し、疲労破壊の確率は低くなるものと思われた。異なったメーカー製のアバットメントとの組み合わせにおいては、Ti-6 Al-4 V 合金であっても疲労破壊が予測された。

【考察】

チタンはグレードにかかわらず、ほぼ同一の弾性係数を有しているため、疲労破壊の可能性は、ブローネマルク、ITI など、全てのチタン製インプラント存在し、その使用に当たっては十分な注意が必要である。

チタン製インプラント体は、限界的な構造設計がされており、不注意な使用によっては容易に破壊される可能性が存在する。特に形状の異なった他メーカーのアバットメントとの組み合わせは厳禁と考えられる。

5. 糖尿病患者を有する歯周病患者の長期メンテナンス症例

上條博之 (あうる歯科医院)

【緒言】

近年、歯周治療への関心は、高齢化社会が進むに伴って、さらに高まりつつある。治療の方法もスクーリング、ルートプレーニング、歯周外科から幹細胞の再生療法に至るまで、進化しつつある。しかし、これらの治療の予後を左右する因子の1つに全身疾患がある。今回、糖尿病を有する患者の歯周治療を行い13年間の経過を経験したのでその概要を報告する。

【症例】

患者：64歳 男性

初診：1992年11月12日

主訴：下顎両側臼歯部の歯肉の疼痛を主訴として来院

既往歴：糖尿病、高脂血漿、慢性副鼻腔炎

現病歴：1992年9月に近隣の歯科医院にて上顎小臼歯の歯肉の疼痛により、切開排膿し、抗生剤の投与を受けた。その後5日程前より、上顎左側臼歯部および下顎両側臼歯部の多発膿瘍を生じて、来院。

口腔内所見：PCR 57.4%で、主に隣接面と舌、口蓋側のプラーク付着が多く、小臼歯部の歯肉退縮に伴って、歯頸部カリエスも多数認め、PCRの数値以上に口腔内清掃状態は悪い状態と思われる。歯肉は、急性症状がある部位以外でも全体的に発赤、腫脹が著しく、BOPは全ての部位で(+)でした。歯周ポケットは深い所で10 mmに達しており、垂直性骨欠損や分岐部病変もかなり進行していましたが、動揺度は1～2度でした。

【処置および経過】

初診時の急性症状の処置後、全身的な問題点として糖尿病について専門医を再度受診して頂き治療をしながら、初期治療に約7ヶ月を要しました。この間、患者の変化として、まずブラッシングへの意識の変化と全身的には、体重が3 kg減少して、血糖値も空腹時で180 mg/dl 近くあったものが、120 mg/dl にまで下がり、HbA1cも7.6%から6.2%まで減少した。全身状態の改善と歯周ポケットの残存と口腔内の骨欠損の状態から歯周外科処置（切除療法）を行い、固定期間2ヶ月、最終補綴に3ヶ月かけて、メンテナンスとなりました。メンテナンス中は、3ヶ月～6ヶ月のリコールをして、プラークコントロールと根面カリエスへのフッ化物の使用および咬合調整を中心に行ってきました。

【考察】

糖尿病は全国で現在有病者率740万人ともいわれる成人病である。その病態と治療にはまだ多くの研究者が時間を費やしている。今回、糖尿病患者の歯周治療において早期の全身的な改善が認められたことによって円滑な治療の進行が得られたのではないかと考えている。本症例は糖尿病患者の歯科治療の指標としてHbA1cの経過を主治医より聞きながら治療をして、約10年以上良好なメンテナンスがえられている症例である。糖尿病患者の歯周治療にはHbA1cの経過が重要であるとともに今後、さらなる糖尿病と歯周病の関係の解明が必要である。

6. 白虎加人参湯を用いた糖尿病性口腔乾燥症治療薬の探求

藤垣佳久, 近藤 武 (松本歯大・口腔衛生),

今村泰弘, 田村集, 板井文治, 前田幸宏, 王 豊禮 (松本歯大・歯科薬理)

【目的】

日本では、1972年に医療用漢方薬が登場して以来、西洋医学の診療の中にも取り入れている。糖尿病の発症にともない、全身的脱水、内分泌異常、血管神経異常などさまざまな病態を呈する。唾液腺においても糖尿病発症後の早期より機能低下がみられ、口腔乾燥症を訴える者が少なくない。近年漢方薬による糖尿病治療が注目されている。一方、一般的な口腔乾燥症に対する漢方治療薬としては、白虎加人参湯などが処方されている。糖尿病による口腔乾燥症を主訴とする漢方薬の処方はいくつかある。本研究では、STZ誘発糖尿病マウスを実験モデルとして、糖尿病性唾液分泌障害に対する白虎加人参湯の唾液分泌促進効果について検討をすることを目的とした。

【方法】

糖尿病はマウスにSTZを腹腔内投与することにより誘発した。コントロール群は、緩衝液のみを投与した。STZ投与後8日目から白虎加人参湯を一日当たり1回経口投与(100 mg/kg)を行い、血糖値と体重を毎日測定した。実験開始より3週間後の唾液分泌機能を調べるために唾液を採取後、タンパク質濃度をBradford法にて測定し、澱粉分解量にてアミラーゼ活性を測定した。唾液採取後、耳下腺を

摘出して重量を測定し、全タンパク質濃度、アミラーゼ活性を測定した。Mann-Whitney の U 検定を用いて統計処理を行った。(p<0.05)

【結果】

STZ 投与群の血糖値は300 mg/dl 以上を示し、高血糖を維持したが、STZ+白虎加人参湯投与群は、有意に減少した。STZ+白虎加人参湯投与群において、白虎加人参湯による体重への影響はなかった。STZ のみの投与群は非糖尿群と比較し、唾液分泌率、唾液と耳下腺中の全タンパク質濃度、アミラーゼ活性値が有意に低下し、唾液腺機能障害を示した。一方、STZ+白虎加人参湯投与群は、唾液分泌促進効果が見られ、また STZ 投与群の血糖値は白虎加人参湯投与によって改善された。

【考察】

I 型糖尿病はインスリン不足による代謝の乱れによって引き起こされる疾患である。誘発性糖尿病マウスにおける唾液腺機能障害に対し、白虎加人参湯の投与により唾液分泌促進効果を確認することができた。白虎加人参湯の成分は知母、人參、石膏、甘草、コウベイからなり、知母、人參には血糖調整作用、石膏には唾液分泌促進作用がある。これら生薬には代謝障害、特にインスリン不足で引き起こされる高血糖を調節する可能性があり、その結果として唾液分泌機能を調整しているものと考えられる。

【結論】

漢方治療は、古くから、誰もがもともと持っている、病氣と闘い、自然治癒力を高め、からだを整えることを基本にしているといわれている。漢方が生体の代謝バランスを整え、生体自身がもつ自然治癒力を利用することより、糖尿病による口腔乾燥症の治療薬として応用できることが示唆された。

7. ヒト CD14陽性細胞から破骨細胞への分化におけるカルシトニン受容体関連蛋白質 mRNA の発現変動およびヒト破骨細胞に対するカルシトニン作用の解析

山本洋平^{1,2}, 溝口利英³, 武 郁子⁴, 山内広世⁴, 野口俊英¹, 宇田川信之², 高橋直之⁴
¹(愛知学院大・歯科保存Ⅲ), ²(松本歯大・口腔生化),
³(松本歯大・総歯研・生体材料), ⁴(松本歯大・総歯研・機能解析),
⁵(旭化成ファーマ・医薬営業本部)

【目的】

カルシトニン (CT) は、破骨細胞 (OC) の骨吸収活性を抑制する。最近我々は、ヒト末梢血より単離した CD 14陽性細胞 (CD 14⁺細胞, OC 前駆細胞) から、ヒト OC を大量に得る方法を確認した。そこで、CD 14⁺細胞とヒト OC における CT 受容体 (CTR) とその関連蛋白質の mRNA の発現変動、およびヒト OC に対する CT の作用機序を解析した。

【方法】

ヒト末梢血より単離した CD 14⁺細胞を RANKL および M-CSF 存在下で7日間培養し、ヒト OC を得た。CD 14⁺細胞とヒト OC における CTR, CTR 様受容体 (CRLR), 受容体活性調節蛋白 (RAMP) 1, 2, 3 の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。また、ヒト OC の吸収窩とアクチンリング形成に対するエルカトニン (ウナギ CT の合成類縁体), ヒト CT, forskolin (PKA 賦活剤), PMA (PKC 賦活剤) の作用を、マウス OC に対する作用と比較・解析した。

【結果】

①CD 14⁺細胞は、CRLR, RAMP 1, RAMP 2, RAMP 3を発現していたが、CTRを発現していなかった。一方ヒト OC は、CTRのみを発現していた。②エルカトニンとヒト CT は、ヒト OC の吸収窩とアクチンリング形成を阻害したが、エルカトニンはヒト CT の100倍以上強力であった。③forskolin は、マウス OC とヒト OC のアクチンリングを破壊した。一方、PMA は、マウス OC のアクチンリングを破壊しなかったが、ヒト OC のアクチンリングを極めて低濃度で破壊した。

【考察】

OC 前駆細胞は CRLR, RAMP 1, RAMP 2, RAMP 3を発現することから、CT 遺伝子関連ペプチ

ド (CGRP) と adrenomedullin に対する受容体を発現していた。一方、成熟 OC に分化すると、それらの受容体は消失し、CTR のみを発現した。また、ヒト OC とマウス OC に対する CT の骨吸収を抑制する効果は同様であった。しかし、マウス OC とは異なり、ヒト破骨細胞の機能を抑制する CTR シグナルには、PKA だけではなく PKC シグナルも関与する可能性が示された。

8. 破骨細胞における p 38 MAP キナーゼの活性化は破骨細胞の延命を促進する

山下照仁, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之 (松本歯大・総歯研・機能解析),
田中 栄 (東京大・医学部・整形外科)

【目的】

これまで我々は、p 38 MAP キナーゼ (p 38) が破骨細胞の分化に必要なシグナル因子であることを、p 38 特異的に作用する阻害剤 SB 203580 を用いて明らかにしてきた。一方、破骨細胞の骨吸収や延命は SB 203580 で抑制されないことより、破骨細胞の機能に p 38 が必須でないことが示唆された。そこで、破骨細胞の活性化における、p 38 の積極的な役割を明らかにするために、p 38 の強制的なリン酸化を介する活性化を試み、破骨細胞の機能を解析した。

【方法】

実験に用いる細胞には、マウス骨髄細胞と骨芽細胞との共培養により得た多核の破骨細胞と、比較対照に骨髄細胞由来のマクロファージを用いた。LPS 刺激後、p 38, リン酸化 p 38, MKK 3/6, リン酸化 MKK 3/6 をウェスタン法で検出した。アデノウイルスを用いて恒常的活性型 MKK 6 (MKK 6 CA) を破骨細胞に導入し、LacZ を導入したコントロールの破骨細胞や IL-1 で刺激した破骨細胞と比較した。また RT-PCR 法により、IL-6 と TNF の発現を定量した。また、アポトーシス関連タンパクを、ウェスタン法で定量した。

【結果】

破骨細胞と骨髄マクロファージいずれも p 38 を発現していた。LPS 刺激で骨髄マクロファージの p 38 はリン酸化されたが、破骨細胞の p 38 はリン酸化されなかった。p 38 のリン酸化を担う上流のキナーゼ MKK 3/6 は、破骨細胞と骨髄マクロファージいずれも発現していた。LPS 刺激により、MKK 3/6 のリン酸化は骨髄マクロファージで強く亢進したが、破骨細胞では変化しなかった。アデノウイルスを用いた遺伝子発現系を解析し、MKK 6 CA の導入により初めて破骨細胞における p 38 のリン酸化が認められた。MKK 6 CA を導入した破骨細胞は、LacZ を導入した破骨細胞に較べて延命し、IL-1 で刺激した破骨細胞と同レベルにまで生存が亢進した。MKK 6 CA による延命は、p 38 阻害薬 SB 203580 の添加によって阻害された。MKK 6 CA を導入した破骨細胞では、IL-1, IL-6 や TNF の mRNA の発現レベルは亢進していなかった。また、アポトーシス抑制因子 Bim の発現上昇や、アポトーシスシグナル伝達に関わる Caspase の発現量は、MKK 6 CA と LacZ コントロール間で差が認められなかった。

【考察】

LPS で刺激した破骨細胞では、MKK 3/6 のリン酸化の亢進もなく、下流の p 38 はリン酸化されなかった。アデノウイルスで導入した MKK 6 CA は p 38 のリン酸化を亢進し、破骨細胞の生存を促進した。以上より、破骨細胞特異的に不活性な p 38 は、強制的な活性化により破骨細胞の延命シグナルとして働くことが明らかとなった。

9. 顎顔面領域における炎症・発痛関連遺伝子の同定

——cDNA マイクロアレイを用いて——

金銅英二, 姫野勝仁, 國分暁子, 田中丈也 (松本歯大院・生体調整),
島 麻子, 岩田幸一 (日本大・歯・生理学),
森本俊文 (松本歯大院・咀嚼機能)

【目的】

顎顔面領域における炎症・発痛関連遺伝子を網羅的に同定する目的で本研究を行った。

【方法】

SD 雄性ラット63匹を用い, 起炎症物質である Complete Freund's Adjuvant (CFA) を右側上口唇に注入し炎症モデル動物を作成した。CFA 注入ラットおよび生理食塩水注入ラット (対照群) は最初に熱刺激装置による疼痛逃避行動試験を行った。CFA 注入3日後に深麻酔下にて三叉神経節の左右側を分別し摘出を行った。いずれの CFA ラットも熱刺激装置による疼痛逃避行動試験により潜時の減少が認められた動物より三叉神経節を摘出した。また生理食塩水注入や無処置のラットからも三叉神経節を摘出した。摘出した三叉神経節から total RNA を抽出・精製し RT-PCR にて aminoallyl-dUTP 導入した cDNA を作成, さらに Cy-dye とのカップリング反応にて蛍光標識し Agilent 社の Rat Oligo Microarray にハイブリダイゼーション (60°C/17時間) をおこなった。スキャンニングは Agilent Scanner を用い画像から数値変換をおこなった。

さらに発現量に差の認められた遺伝子のうち数種を選択し, DIG 標識 Oligonucleotide probe を作成し形態学的手法 (Non-RI in situ ハイブリダイゼーション) にて解析した。

【結果】

cDNA マイクロアレイの結果では無処置動物との比較で500種以上の, また対側との比較では200種以上の発現変動を認める遺伝子が明らかになった。イオンチャンネル, 細胞内情報伝達分子, 転写因子, 細胞接着因子, ホルモンなど多岐におよぶ物質の遺伝子発現が増減していた。

このうち, カルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) や K^+ Channel (KCNK3) などの遺伝子が増減することに着目した。このうち CaMK II, KCNK 3 は in situ ハイブリダイゼーションにおいても三叉神経節細胞で発現パターンに差が認められた。

【まとめ】

ラット上口唇の炎症に伴い痛覚過敏を惹起している動物において CaMK II や KCNK 3 などの mRNA 発現量が上昇することが明らかとなった。これらの分子やチャンネルが顎顔面領域における炎症・発痛時における病態の発現に関与している可能性が示唆された。