

## サテライトシンポジウム6 (SS6)

### 硬組織研究の明るい未来を目指して

座長：宇田川信之（松本歯科大 歯学部 生化学講座）  
天野 均（昭和大学 歯学部 歯科薬理学教室）

日時：9月23日(火)9:00-10:30

会場：C会場 (W-1)

学会の発展と研究の進展には若手研究者の育成が必要です。本サテライトシンポジウムでは、歯科基礎医学研究の将来を担う若手研究者に、シンポジウムでの発表を初体験して戴こうと企画しました。若手研究者の講演の中には、明日の歯科治療に結びつくような種(トピックス)が隠されているはずです。さまざまな分野にわたる(生化学・薬理学などにとらわれずに)硬組織学研究を紹介することを目的に企画しました。

#### SS6-1. 形態学からみた骨基質石灰化機構の解析

李 敏啓（新潟大学 超域研究機構）

#### SS6-2. 新規転写因子 AJ18 は骨芽細胞および軟骨細胞の分化を抑制する

鈴木直人（日本大学 歯学部 生化学教室）

#### SS6-3. EMD(エムドゲイン)が骨芽細胞様細胞に及ぼす影響

合田征司、池尾隆（大阪歯科大学 歯学部 生化学講座）

#### SS6-4. 口腔内疾患に対する漢方薬療法開発

荒 敏明、服部敏己、今村泰弘、王 宝禮（松本歯科大 歯学部 薬理学講座）

#### SS6-5. オーフアンリガンドライブラリーを用いた破骨細胞分化関連化合物のスクリーニング

江草 宏（大阪大学大学院歯学研究科 歯科補綴学第一教室）

#### SS6-6. 破骨細胞の分化、アポトーシスと骨吸収

岡崎雅子、唐川亜希子、天野 均、山田庄司（昭和大学 歯学部 歯科薬理学教室）  
府川有紀子（同 歯周病学教室）、佐野恒吉（同 口腔解剖学教室）

## SS6-1. 形態学からみた骨基質石灰化機構の解析

李 敏啓(新潟大学 超域研究機構)

本講演では、マグネシウム(Mg)が基質小胞性石灰化および石灰化球形成に与える影響、および、アスコルビン酸がコラーゲン性石灰化に与える影響について、若干の知見をご紹介します。

低Mg飼料で飼育したラット実験群(低Mg群)の骨基質をEPMAで解析すると、骨基質のMg濃度は低くその代わりCa濃度が上昇していた。また、類骨層の石灰化球や石灰化骨基質を構成する一つ一つの結晶塊がコントロール群よりも大型化していた。これをX線回折解析すると、コントロール群に比べて結晶化度の高い合成型ハイドロキシアパタイト(HA)の含有率が上昇していた。従って、低Mg環境では、Ca濃度の上昇とMgとの置換が低下し、HAの結晶化度が上がると推測された。

次に、アスコルビン酸(Asc)合成能を欠如するODS od/odラットに不十分なAscを与えた実験群(Asc不足群)におけるコラーゲン性石灰化について検索した。Asc不足群では、コントロール(Asc充足)群の様に横紋構造を示す太いコラーゲン線維ではなく、細く糸状の脆弱なコラーゲン線維が観察された。骨芽細胞直下の類骨層には基質小胞および石灰化球が形成されており、それらの結晶塊は細いコラーゲン線維の走行方向に沿って配列した。このことから、Asc不足で生じた糸状のコラーゲン線維に対しても、それを足場とした石灰化が可能であると推測された。

## SS6-2. 新規転写因子 AJ18 は骨芽細胞および軟骨細胞の分化を抑制する

鈴木直人 (日本大学 歯学部 生化学教室)

演者は、トロント大学との共同研究で新規転写因子(AJ18)のクローニングに成功した。AJ18 は分子量約 67kDa で、分子内に転写抑制ドメインの一つである Krüppel-associated box domain と 11 個の C2H2 タイプの zinc finger を含んでおり、Runx2 の DNA 結合配列と競合することで骨芽細胞の分化を負に調節している可能性が示唆された(Jheon, et al., 2001)。

AJ18 は、骨組織のみでなく軟骨組織でもその発現が認められた。軟骨細胞の分化に伴う AJ18 の発現パターンは、増殖軟骨細胞から前肥大軟骨細胞へと分化する時期に一過性に発現が上昇することが認められた。さらに、AJ18 を強制発現させると、軟骨基質成分の遺伝子発現や Alcian blue 陽性の軟骨基質形成を抑制することから、AJ18 は骨芽細胞分化のみでなく軟骨細胞分化の調節にも関与していることが示唆された。

Runx2 や Osterix は骨芽細胞の分化を“正”に調節する転写因子として同定されたが、AJ18 は骨芽細胞の分化を“負”に調節している可能性が新規転写因子としてユニークな点である。

骨芽細胞の分化を“負”に調節する転写因子の構造とその機能発現に関与する因子が明らかになれば、骨芽細胞分化の詳細な調節機構の解明に貢献できるとともに、新規転写因子を検索することは、硬組織研究の発展に新しい分野を開拓する可能性を秘めているのではないかと考えている。

### SS6-3. EMD(エムドゲイン)が骨芽細胞様細胞に及ぼす影響

合田征司、池尾隆 (大阪歯科大学 歯学部 生化学講座)

現在の歯周再生治療は、歯周組織の再生のみに注目した研究が進められている。エムドゲインは歯周組織再生治療に用いられ、セメント質だけでなく歯槽骨の再生を認める症例も数多く報告されている。さらに In vivo の研究においてもエムドゲインは骨芽細胞を活性化し、骨形成の指標であるアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、I 型コラーゲンなどの発現を増加させ、骨の再生を促進することが報告されている。

しかし、我々は以下の結果を得た。エムドゲインにより骨芽細胞の I 型コラーゲン分解能の増加。エムドゲインにより I 型コラーゲナーゼ MMP-1 の産生が増加。エムドゲインにより MMP-1 を活性化する MMP-3 の産生の増加。エムドゲインによる MMP-1 と MMP-3 の産生は、MEK 阻害剤である U0126 により阻害。骨芽細胞においてエムドゲインによる MAP kinase ERK1/2 のリン酸化の増強。

以上よりエムドゲインは、骨芽細胞を活性化させて MMP-1 と MMP-3 の産生を増加させ、骨吸収に重要な酵素である MMP-1 を活性化し I 型コラーゲンの分解を促進することが明らかになった。

エムドゲインが骨芽細胞を活性化し骨の再生を促進しているだけでなく、I 型コラーゲンの分解を促進している可能性がある。この分解能は、MAP kinase が関与していることも示唆された。

### SS6-4. 口腔内疾患に対する漢方薬療法開発

荒 敏明、服部敏己、今村泰弘、王 宝禮(松本歯科大 歯学部 薬理学講座)

近年、漢方薬が医療用製剤として認可され、全身疾患だけではなく種々の口腔疾患の治療薬として臨床応用されており、歯科医療においても漢方薬の使用が望まれている。このような背景から、我々は現在、口腔疾患のなかでも、歯周病、薬物性歯肉増殖症、口臭、味覚障害、口腔乾燥症、舌痛症の治療および症状改善を目的とした漢方薬療法の展開研究を試みている。

漢方薬は西洋薬とは違い症状に対して適応症が決定されており、その中から口腔疾患に有効だと思われる薬物を選択していき基礎研究を行ってきた。例えば、小柴胡湯は抗炎症作用を有し、肺炎、気管支炎などの炎症性疾患の症状改善、あるいは慢性肝炎における肝機能障害の改善に使用されている。柴苓湯は下痢、急性胃腸炎に使用される他に、細胞増殖抑制能を有しているために特発性後腹膜線維症の治療薬として臨床応用されている。白虎加人参湯と五苓散は唾液分泌を口渇に対して使用されている。これらの漢方薬のうち、歯周病培養モデルに対しては小柴胡湯を、薬物性歯肉増殖症培養モデルに呈しては柴苓湯を、口腔乾燥症動物モデルに対しては白虎加人参湯・五苓散を用いてその効果について検討した。

その結果、歯周病、薬物性歯肉増殖症、口腔乾燥症の基礎実験系に用いたそれぞれの漢方薬は有効な薬理作用を示した。今後、さらなる基礎研究データを構築し、臨床研究においてこれらの漢方薬の作用を検討する予定である。

## SS6-5. オープンライブラリーを用いた破骨細胞分化関連化合物のスクリーニング

江草 宏（大阪大学大学院歯学研究科 歯科補綴学第一教室）

近年、RANKL 刺激によるシグナル伝達系において活性化される転写因子である NFATc1 が破骨細胞分化に必須であることが見出された。我々は、破骨細胞の分化に影響を及ぼす化合物・因子のハイスループットスクリーニングを目的とし、RAW264.7 細胞に NFATc1 プロモーター／ルシフェラーゼレポーターベクターを導入することで、このレポーター遺伝子を安定発現させた RAW264.7 細胞株を樹立した。さらに、この細胞株を RANKL 刺激により破骨細胞様細胞へ分化誘導し、機能不明の生体物質である orphan ligands ライブラリー (84 化合物) を用いたレポーターアッセイにより破骨細胞分化に関連する化合物のスクリーニングを行った。その結果、RANKL 依存性の NFATc1 の活性化を亢進させる 2 種類の化合物を見出した。そのひとつ harmine は、RAW264.7 細胞またはマウス骨髄細胞において NFATc1 の活性化を介して破骨細胞分化を著明に促進することが明らかとなった。本シンポジウムでは、我々が樹立した NFATc1 プロモーター／ルシフェラーゼレポーター発現細胞株のハイスループットスクリーニングに対する有用性ならびに今回見出されたふたつの化合物が破骨細胞／骨芽細胞に及ぼす影響について発表したいと考えている。

## SS6-6. 破骨細胞の分化、アポトーシスと骨吸収

岡崎雅子、唐川亜希子、天野均、山田庄司(昭和大学 歯学部 歯科薬理学教室)  
府川有紀子(同 歯周病学教室)、佐野恒吉(同 口腔解剖学教室)

破骨細胞は造血幹細胞から CSF-1 と RANKL という二つのサイトカイン刺激によって分化する多核巨細胞である。この分化過程で 2 つの必須サイトカインが欠乏するとアポトーシスすること、最終分化して、骨を融解・吸収した破骨細胞は骨吸収終了後に骨面から離れアポトーシスすることが示されている。これらの過程に作用する薬物を用いて、骨代謝にどのような影響があるのかを明らかにしていきたい。

破骨細胞分化に影響する薬物として NSAID に着目した。解熱鎮痛効果の高いジクロフェナクナトリウムを添加すると、破骨細胞形成、及び、吸収窩形成が著明に抑制された。しかしながら、アポトーシスには影響を及ぼさなかった。また作用機序を検索すると転写因子 NF- $\kappa$ B、及び、リン酸化 NF- $\kappa$ B の核内への移行が減少し、転写抑制が明らかとなった。骨吸収抑制薬 Bisphosphonate では、最終分化した破骨細胞のみが TUNEL 陽性になった。同じ骨吸収抑制作用はあっても、アポトーシス誘導においては相違が認められた。アポトーシスを調節するカスパーゼ3遺伝子の欠損マウスでは、骨格性下顎前突症を成長とともに発症し、骨形成も骨吸収のどちらも亢進していた。

破骨細胞による骨吸収を抑制する目的で薬物療法を行う際は、生体内の骨代謝機構への影響を十分に考慮する必要があることが示唆された。