九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

【平成24年1月-3月授与分】博士学位論文内容の要旨及び審査の結果の要旨

https://hdl.handle.net/2324/25921

出版情報：2012-12-10. 九州大学
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

氏名・(本籍・国籍)	おしこうじ ただあき **押小路　忠　昭**（東京都）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５２４号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Relationship between Receiving a Workplace Oral Health Examination Including Oral Health Instruction and Oral Health Status in the Japanese Adult Population（**日本の成人集団における口腔保健指導を含む職域歯科健診の受診と口腔健康状態との関連**）
論文調査委員	（主　査）教　授　前田勝正 （副　査）教　授　赤峰昭文　　教　授　寺田善博

論　文　内　容　の　要　旨

職域では、従業員の健康管理のため年一回の定期健康診断の実施が義務づけられている。歯科健診については、酸等を取り扱う特殊な職場での歯科健診の実施が義務づけられている一方、一般職域での歯科健診の実施はそれぞれの企業の自主性に任されており、歯科健診を実施している職域の数はそれほど多くない。本研究では、継続的に歯科健診を実施している某企業の歯科健診受診者のデータを用いて、口腔保健指導を含む職域歯科健診の受診と口腔健康状態との関連について分析を行った。

某企業が 2008 年度に実施した定期健康診断受診者 15,338 名のうち、5,637 人（36.8%）がオプション検査としての歯科健診を受診した。歯科健診受診者にこれまでの職域歯科健診の受診について尋ね、4,556 人（回収率 80.8%）から回答を得た。本研究では、35 歳以上 74 歳以下で分析に必要な項目がすべて揃っている 4,484 名を分析対象とした。職域歯科健診では、歯の状態、歯周健康状態および口腔清掃状態について診査した。対象者の職域歯科健診の受診と口腔健康状態との関連を調べるために、4 mm 以上の歯周ポケット（PD）を持つ歯の割合を 0%（N = 3,484、77.7%）、0.1-9.9%（N = 767、17.1%）、10%以上（N = 233、5.2%）の 3 群に分けたものを従属変数とし、年齢、性別、喫煙習慣、歯磨き習慣、職域歯科健診の受診回数、歯科医院の定期受診、喪失歯数、口腔清掃状態を独立変数とした多変量多項ロジスティック回帰分析を行い、オッズ比と 95%信頼区間を求めたところ、4 mm 以上の PD の保有に対するオッズ比は、高年齢層、男性、喫煙者、喪失歯数の多い者、口腔清掃状態の悪い者で有意に高く、歯磨き回数の多い者では有意に低かった。また、職域歯科健診を毎年受けている者は 4 mm 以上の PD を 10%以上の歯に持つオッズ比が有意に低く、歯科医院を年 2 回以上定期受診する者では同オッズ比が有意に高かった。

本研究は、口腔保健指導を含む職域歯科健診を継続的に受診することが歯周疾患に対して抑制的な効果を持つ可能性を示唆している。近年の報告により、歯周疾患が糖尿病や心疾患等の全身の健康にも影響を及ぼすことが示されていることから、歯周疾患が急増する成人集団において、職域歯科健診の受診を促すことは、口腔保健だけではなく全身の健康維持にも貢献する可能性があると考えられる。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

職域では、従業員の健康管理のため年一回の定期健康診断の実施が義務づけられている。歯科健診については、酸等を取り扱う特殊な職場での歯科健診の実施が義務づけられている一方、一般職域

での歯科健診の実施はそれぞれの企業の自主性に任されており、歯科健診を実施している職域の数はそれほど多くない。本研究では、継続的に歯科健診を実施している某企業の歯科健診受診者のデータを用いて、口腔保健指導を含む職域歯科健診の受診と口腔健康状態との関連について分析を行った。

某企業が2008年度に実施した定期健康診断受診者15,338名のうち、5,637人（36.8%）がオプション検査としての歯科健診を受診した。歯科健診受診者にこれまでの職域歯科健診の受診について尋ね、4,556人（回収率80.8%）から回答を得た。本研究では、35歳以上74歳以下で分析に必要な項目がすべて揃っている4,484名を分析対象とした。職域歯科健診では、歯の状態、歯周健康状態および口腔清掃状態について診査した。対象者の職域歯科健診の受診と口腔健康状態との関連を調べるために、4 mm以上の歯周ポケット（PD）を持つ歯の割合を0%（N = 3,484、77.7%）、0.1–9.9%（N = 767、17.1%）、10%以上（N = 233、5.2%）の3群に分けたものを従属変数とし、年齢、性別、喫煙習慣、歯磨き習慣、職域歯科健診の受診回数、歯科医院の定期受診、喪失歯数、口腔清掃状態を独立変数とした多変量多項ロジスティック回帰分析を行い、オッズ比と95%信頼区間を求めたところ、4 mm以上のPDの保有に対するオッズ比は、高年齢層、男性、喫煙者、喪失歯数の多い者、口腔清掃状態の悪い者で有意に高く、歯磨き回数の多い者では有意に低かった。また、職域歯科健診を毎年受けている者は4 mm以上のPDを10%以上の歯に持つオッズ比が有意に低く、歯科医院を年2回以上定期受診する者では同オッズ比が有意に高かった。

本研究は、口腔保健指導を含む職域歯科健診を継続的に受診することが歯周疾患に対して抑制的な効果を持つ可能性を示唆している。近年の報告により、歯周疾患が糖尿病や心疾患等の全身の健康にも影響を及ぼすことが示されていることから、歯周疾患が急増する成人集団において、職域歯科健診の受診を促すことは、口腔保健だけではなく全身の健康維持にも貢献する可能性があると考えられる。

これらの研究成果は,今後の日本における 歯周疾患の抑制を行うための重要な知見であり,本論文を学位論文として価値あるものと判断した。

氏名・(本籍・国籍)	まきの ゆうすけ **牧野友祐**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５２５号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**過剰歯幹細胞の再生医療学的応用に関する研究**
論文調査委員	（主　査）教　授　古谷野　潔 （副　査）教　授　中村誠司　　教　授　赤峰昭文

論文内容の要旨

近年、自己複製能と多分化能を有する骨髄間葉系幹細胞（bone marrow mesenchymal stem cells; BMMSC）がT細胞の増殖を抑制することが見いだされた。以来、BMMSCを用いた組織工学的組織置換療法のみならず免疫学的細胞治療に関する基礎的・臨床的研究が集学的に行われてきた。現在、BMMSCを応用した再生医療は実現へ大いに期待が寄せられている。一方、細胞源としてのBMMSCはドナーの年齢や細胞活性、採取時の障害など必ずしも優れた細胞源と考えられてはいない。本研究では、臨床的に破棄されるヒト正中過剰歯をセルソースとして注目し、ヒト正中過剰歯の歯髄組織より単離したヒト過剰歯幹細胞（stem cells from supernumerary

teeth; SupSC）の生物学的および免疫学的特性を *in vitro/in vivo* 実験系で解析し、再生医療への有用性を検討した。

In vitro 実験系にて SupSC は付着性コロニーを形成した。さらに象牙芽細胞／骨芽細胞や脂肪細胞、神経細胞や内皮細胞などの中胚葉、外胚葉、内胚葉系の細胞に分化する多分化能を備えていた。異種皮下移植実験法で SupSC は象牙質／歯髄複合体のみならず骨／骨髄コンポーネントを再生した。また連続的移植実験法においても象牙質／歯髄複合体を形成したことから、SupSC が自己複製能を有していることが明らかとなった。末梢血単核細胞との共培養実験より、SupSC は T 細胞の増殖抑制効果を示した。さらに調節性 T 細胞の分化誘導を促進し、IL-17 分泌型ヘルパーT 細胞（Th17)の分化誘導を抑制した。従って、SupSC は MSC に類似した幹細胞ポピュレーションと同定された。

次に、SupSC を応用した細胞療法学的治療効果について検討した。病態 MRL/*lpr* マウスを使用し、MRL/*lpr* マウスに SupSC を経静脈的に全身投与した。MRL/*lpr* マウスは、ヒト全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）に類似した症状（寿命の短縮や血中自己抗体濃度の上昇、糸球体腎炎による腎機能障害、Th17 細胞の増加による免疫破綻）を呈していた。SupSC 投与によりこれらの SLE 様症状は改善し、マウスの寿命の延長も認められた。また、MRL/*lpr* マウスでは骨粗鬆様骨障害も伴っていたが、SupSC 移植 MRL/*lpr* マウスでは、骨組織において骨芽細胞による骨形成を活性化し、また破骨細胞による骨吸収に抑制的に働くことで、減少していた骨塩量および骨梁が著しく改善されていた。

正常マウス骨髄の BMMSC と比較して、MRL/*lpr* マウスの骨髄より単離した BMMSC では、間葉系幹細胞学的特性（細胞増殖能、*in vitro* 骨形成能、免疫調節能など）が障害されていることが知られている。MRL/*lpr* マウスの BMMSC と比較して、SupSC 移植レシピエント MRL/*lpr* マウスの BMMSC の間葉系幹細胞学的特性を検討したところ、高い細胞増殖能や *in vitro* での骨形成が亢進していた。また免疫不全マウスでの皮下移植実験では、SupSC 移植レシピエント BMMSC の移植体内部では骨形成ならびにニッチ形成が増加していた。また、MRL/*lpr* マウス BMMSC と比べて、SupSC 移植レシピエント BMMSC では *in vitro* 造血誘導作用および *in vitro* 免疫調節能も促進されており、レシピエント BMMSC における組織構築機能の増強が認められた。次に、この移植レシピエント由来 BMMSC を MRL/*lpr* マウスに全身投与したところ、非移植群レシピエント BMMSC と比較して生存期間の延長ならびに血中自己抗体濃度の減少や腎機能に改善が認められた。また、MRL/*lpr* マウスより単離した T 細胞を養子細胞移植した免疫不全マウスでは、非移植レシピエント BMMSC を投与した養子移植マウスと比べて、SupSC 移植 MRL/*lpr* レシピエント BMMSC を投与した養子移植マウスの生存期間が延長していた。従って、SupSC 移植の治療効果は、少なくとも、レシピエント側の BMMSC のニッチ再構築機能を活性化することで免疫状態を調節している可能性が示唆された。

これらの研究成果より、SupSC は間葉系幹細胞に類似した幹細胞ポピュレーションであり、SLE のような免疫疾患に対する細胞治療に有用なセルソースであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト正中過剰歯の歯髄組織より単離したヒト過剰歯幹細胞(stem cells from supernumerary teeth; SupSCs)の生物学的および免疫学的特性を in vitro/in vivo 実験系で解析し、再生医療への有用性を検討したものである。

In vitro 実験系にて SupSCs は付着性コロニーを形成した。さらに象牙芽細胞／骨芽細胞や脂肪細胞、神経細胞などの細胞に分化する能力を備えていた。異種皮下移植実験法で SupSCs は象牙質／歯髄複合体のみならず骨／骨髄コンポーネントを再生した。また連続的移植実験法においても象牙質／歯髄複合体を形成したことから、SupSCs が自己複製能を有して

いることを明らかとした。従ってSupSCsは、MSCsに類似した幹細胞ポピュレーションと同定された。

次に、SupSCsの免疫調節能について解析した。SupSCsのin vivo免疫調節能を解析するために、ヒト全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)モデルマウスであるMRL/lprマウスにSupSCsを経静脈的に全身投与したところ、SLE様症状は改善した。SupSC移植は、MRL/lprマウスの骨組織に対し骨芽細胞の活性化と破骨細胞の活性抑制に働き、骨塩量および骨梁の改善が認められた。MRL/lprレシピエントマウスからBMMSCsを単離し、免疫不全マウスの皮下に移植すると、SupSCs非投与群レシピエントマウスに由来するBMMSCsと比較して、in vivoにおけるニッチ形成が増加し、in vitro造血作用も促進した結果、レシピエントBMMSCsにおける組織構築機能の増強が認められた。さらにこれらのレシピエント由来BMMSCsをMRL/lprマウスまたはMRL/lprマウスより単離したT細胞を移植した免疫不全マウスへ投与し、レシピエント由来BMMSCsのin vivo免疫調節能を検討した。SupSCs投与群MRL/lprレシピエントBMMSCsでは、非投与群レシピエントBMMSCsと比較して生存率や血清自己抗体濃度に対し優れた結果を示した。従って、SupSC移植の治療効果は、少なくとも、レシピエント側のBMMSCsのニッチ再構築機能を活性化することで免疫状態を調節していることが判明した。

本研究により、SupSCsは間葉系幹細胞に類似した幹細胞ポピュレーションであり、SLEのような免疫疾患に対する細胞治療に有用な幹細胞源であることが示唆された。以上より、本研究は学位論文に十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ながた やはら よしえ 永田（矢原）佳江　(愛媛県)
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５２６号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**角化嚢胞性歯原性腫瘍線維芽細胞におけるCa^{2+}刺激によるBMP-2発現について**
論文調査委員	(主　査)　教　授　中村誠司 (副　査)　教　授　赤峰昭文　　教　授　久木田敏夫

論　文　内　容　の　要　旨

角化嚢胞性歯原性腫瘍（KCOT）は、他の歯原性嚢胞に比して、より高い増殖活性と再発率を特徴としている。我々はその特異な増大機構を解明するために、これまでにKCOT由来上皮細胞や線維芽細胞を用いて研究を行ってきた。

今回、嚢胞増大に伴う局所カルシウム（Ca^{2+}）濃度がKCOT増大に関与しているのではないかと考え研究を行った。カルシウム感知受容体（CaSR）は細胞外Ca^{2+}（$[Ca^{2+}]_o$）によって活性化される7回膜貫通型のG蛋白質共役受容体である。これまでに、KCOT由来線維芽細胞（KCOTFs）にもCaSRが発現しており、$[Ca^{2+}]_o$濃度の上昇に伴いKCOTFsからプロスタグランジンE_2（PGE_2）が分泌されることを明らかにしている。本研究では、KCOTFsにおける$[Ca^{2+}]_o$濃度上昇によるBone morphogenetic protein (BMP)-2遺伝子発現への影響を調べた。その結果KCOTFsでは5 mM Ca^{2+}およびCaSRアゴニストであるネオマイシンにより、BMP-2 mRNAの有意な発現増大、5 mM Ca^{2+}刺激によりphospholipase C (PLC)、protein kinase C (PKC)、extracellular signal-regulated protein kinase-1-2 (ERK1/2)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、jun N-terminal kinase (JNK)のリン酸化が見られ、また、nuclear factor-kappaB (NF-κB) p65の核内移行が認められた。さらに、BMP-2 mRNA発現はPLC、PKC、ERK1/2、p38MAPK、JNK、NF-κBの各阻害剤によって抑制された。PGE_2はKCOTFsにおけるBMP-2 mRNAの発現を増大させたが、この反応はインドメタシンでは阻害されなかった。これらの結果により、KCOTFsでは5 mM Ca

$^{2+}$ による CaSR 刺激によって、PGE_2 が関与することなく PLC を介して PKC を活性化し、P38 MAPK、ERK1/2、JNK ならびに NF-κB の活性化によって BMP-2 mRNA を発現増強することが示唆された。

BMP-2 は骨芽細胞の成熟だけでなく破骨細胞前駆細胞の分化を促進し、直接的あるいは間接的に破骨細胞分化誘導を促進していると報告されている。以上の結果より、KCOT 周囲の Ca^{2+} 濃度が KCOT 周囲の骨代謝の制御に関与している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

角化嚢胞性歯原性腫瘍（KCOT）は、他の歯原性嚢胞と比べると、より高い増殖活性と再発率を特徴とする疾患である。本研究のグループはその特異な増大機構を解明するために、これまでに KCOT 由来の上皮細胞や線維芽細胞を用いて様々な研究を行ってきた。特に、KCOT 由来の線維芽細胞（KCOTFs）はカルシウム感知受容体（CaSR）を発現しており、細胞外カルシウム（Ca^{2+}）濃度の上昇に伴ってプロスタグランジン E_2（PGE_2）を分泌することを明らかにしている。本研究では、嚢胞増大に伴う局所の Ca^{2+} 濃度が KCOT 増大に関与しているのではないかと考え、KCOTFs における細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇による bone morphogenetic protein（BMP）-2 遺伝子発現への影響を調べた。

その結果、KCOTFs では 5 mM Ca^{2+} および CaSR のアゴニストであるネオマイシンにより、BMP-2 mRNA の発現増強がみられた。また、5 mM Ca^{2+} 刺激により、extracellular signal-regulated protein kinase-1-2 (ERK1/2)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化と nuclear factor-kappaB (NF-κB) p65 の核内移行が認められた。さらに、BMP-2 mRNA 発現は phospholipase C、protein kinase C、ERK1/2、p38MAPK、JNK、NF-κB の各阻害剤によって抑制された。PGE_2 は KCOTFs における BMP-2 mRNA の発現を増大させたが、この反応はインドメタシンでは阻害されなかった。これらの結果により、KCOTFs では 5 mM Ca^{2+} による CaSR 刺激によって、PGE_2 が関与することなく活性化し、P38 MAPK、ERK1/2、JNK ならびに NF-κB の活性化によって BMP-2 mRNA の発現を増強することが示唆された。

BMP-2 は骨芽細胞の成熟だけでなく破骨細胞前駆細胞の分化を促進し、直接的あるいは間接的に破骨細胞分化誘導を促進していると報告されている。以上より、KCOT 周囲の Ca^{2+} 濃度が KCOT 周囲の骨代謝の制御に関与している可能性が示された。このように、本研究は有為な研究成果を得ており、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	うめばやし ひさのり **梅 林 久 範**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５２７号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**PRIPが仲介するLC3のリン酸化/脱リン酸化制御が飢餓誘導におけるオートファジー機構を制御する**
論文調査委員	（主　査）教　授　久木田　敏　夫 （副　査）教　授　中　村　誠　司　　教　授　坂　井　英　隆

論文内容の要旨

phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) は、細胞内シグナリング研究から新規タンパク質として発見された。PRIP の相互作用分子を探索し、 protein phosphatase 1 (PP1) とγ-aminobutyric-acid type-A

receptor associated protein (GABARAP) が結合することを見出した。GABARAP とは、酵母のオートファジーを制御する分子 autophagy-related gene (Atg) 8 の四つある哺乳類ホモログの一つである。これまでに、Atg8 は酵母におけるオートファゴソームの形成に関与することが分かっており、哺乳類においてはそのホモログである microtubule associated protein 1 Light Chain 3 (LC3) がその機能を担う。

PRIP は GABARAP の 40~93 番目のアミノ酸領域に結合する。GABARAP 以外の哺乳類 Atg8 ファミリー分子 [LC3 と golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa (GATE-16)] 間では、この結合領域のアミノ酸一次配列は高い相同性を示した。そこで、本研究では、PRIP と LC3 と GATE-16 との相互作用を検討した。大腸菌より精製したリコンビナント GABARAP, LC3, GATE-16 は、マウス大脳の内在性 PRIP と結合することをpull down 解析や PRIP 抗体を用いた免疫沈降実験で明らかにした。 細胞内での PRIP と LC3 の結合を調べるために、GFP-LC3 と DsRed-PRIP を細胞に発現させたところ、両分子は共局在した。これらの結果は、PRIP が LC3 の機能を修飾してオートファジー過程を制御する可能性を示唆していた。そこで、野生型 (WT) と PRIP ノックアウトマウスから mouse embryonic fibroblast (MEF) を樹立し、PIRP 分子とオートファゴソーム形成の関係を検討した。PRIP および LC3 抗体を用いて免疫沈降実験を行った結果、MEF 細胞にアミノ酸飢餓刺激を施すと PRIP は LC3 に強く結合することが分かった。また、PRIP ノックアウト MEF 細胞では、飢餓誘導刺激を行うとオートファゴソーム形成量が野生型に比較して 30%程度増加した。

何故 PRIP 遺伝子欠損がオートファゴソーム形成を亢進するか、その分子メカニズムを明らかにするために、LC3 のリン酸化／脱リン酸化制御に焦点を当て PRIP の機能解明研究を行った。これまでの研究成果から、PKA (cAMP 依存性リン酸化酵素) でリン酸化された LC3 は、II 型 LC3 に変換されずオートファゴソーム形成が阻害される。一方、PRIP 分子は、細胞内のキナーゼ活性やホスファターゼ活性を標的分子へリクルートする機能分子である。そこで、MEF 細胞を用いて PKA や PP1 の LC3 への局在を検討した。その結果、野生型細胞では、飢餓誘導前に PKA が LC3 に局在しており、飢餓刺激によってその量が減少するのに対し、PRIP が欠損した MEF 細胞では、LC3 への PKA の局在量が飢餓誘導刺激前から抑制されていることが明らかとなった。さらに、LC3 の脱リン酸化によってオートファゴソーム形成が惹起されるが、PP1 は飢餓誘導刺激に伴って PRIP から解離することから、飢餓刺激に伴い PRIP に局在していた PP1 が PRIP から解離し、活性型となって LC3 を脱リン酸化し、オートファゴソーム形成反応が進行することが明らかとなった。

本研究成果から、PRIP 分子は、タンパク質リン酸化酵素である PKA と脱リン酸化酵素である PP1 を LC3 近傍にリクルートする足場タンパク質として機能し、栄養が足りた定常状態では、PKA によって LC3 のリン酸化状態が維持されている。ところが、細胞に飢餓誘導刺激が加わると PRIP から PP1 が解離し LC3 が脱リン酸化され、オートファゴソーム形成が促された結果オートファジーが進行する。すなわち PRIP は、恒常的にオートファジー誘導を負に制御し、飢餓時にはオートファジー誘導を適切に開始させる重要な機能を有する分子であることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) は、イノシトール 1,4,5-三リン酸を結合するタンパク質として発見された。PRIP は $GABA_A$ receptor associated protein (GABARAP) と結合し、$GABA_A$ 受容体を介した抑制性神経伝達機構を制御する。GABARAP は、酵母のオートファジーを制御する分子 autophagy-related gene (Atg) 8 の四つある哺乳類ホモログの一つである。オートファジーは、飢餓を含む様々な細胞ストレスによって誘導され、自己の細胞質成分やオルガネラをオートファゴソーム膜で隔離し、ライソゾームと融合させ、包含内容物を分解する一連の機構である。酵母では Atg8 がオートファゴソームの形成に関与するが、哺乳類においてはそのホモログである microtubule associated protein 1 Light Chain 3 (LC3) がその機能を担う。本研究では PRIP がオートファジー関連分子を介してオートファジーを調節する可能性を解析することを目的とした。PRIP と GABARAP の結合領域のアミノ酸一次配列は、GABARAP 以外の哺乳類 Atg8 ホモログ [LC3 と golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa (GATE-16)]とも高い相同性

を示した。そこで、PRIP と LC3、GATE-16 との相互作用を検討したところ、リコンビナント GABARAP, LC3, GATE-16 は、リコンビナント PRIP や大脳抽出液由来の内在性 PRIP と結合することが確認された。さらに、野生型(WT)マウスから調製した mouse embryonic fibroblast (MEF) に飢餓刺激によるオートファジーを誘導したところ、PRIP は定常状態に比べて LC3 により強く結合していた。さらに、PRIP ノックアウト MEF に飢餓刺激を行うと、オートファゴソーム形成量が WT と比較して 50%程度増加した。最近、protein kinase A (PKA)でリン酸化された LC3 は、II 型 LC3 に変換されずオートファゴソーム形成が阻害されることが明らかになった。一方、PRIP は、protein phosphatase 1 (PP1)や protein phosphatase 2A (PP2A)、リン酸化 Akt 等と相互作用し、細胞内のキナーゼ活性やホスファターゼ活性を標的分子へリクルートする機能分子である。そこで、MEF を用いて PKA や PP1 の LC3 への局在を検討したところ、野生型細胞では、飢餓誘導前に PKA が LC3 に局在しており、飢餓刺激によってその量が減少するのに対し、PRIP 欠損 MEF では、その局在量が飢餓誘導刺激前から抑制されていた。本研究より、PRIP は恒常的にオートファジーを負に制御し、飢餓時にはオートファジー誘導を適切に開始させる重要な機能を有する分子であることが明らかになり、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	きた がわ まさ ゆき **北 川 昌 幸** (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５２８号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**ヒト味覚感受性と肥満との連関に関する研究**
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教 授　山 下 喜 久 (副　査) 教 授　前 田 勝 正　　教 授　中 村 誠 司

論　文　内　容　の　要　旨

味覚は、食物中の成分が生体にとって必要か、有害かを弁別し、食を通じて生体恒常性を担う重要な感覚である。味覚受容機構の破綻は生活習慣病やそのリスクファクターである肥満へとつながる可能性がある。しかしながら、肥満への道筋や基本的なメカニズムの研究はまだ緒についたばかりで、明確な結果は得られていない。

近年、米国女性肥満者のうま味閾値が非肥満者に比べ有意に高く、うま味の低感受性と肥満との関連が報告されているが、その原因の多くは不明である。当研究室でも過去に健常者のレプチンの血中濃度と甘味認知閾値の日内変動が同調するが、肥満者ではその変化率が減少傾向にあることを報告している (中村、2006)。しかし、その報告では肥満者の数が少なく (n=21)、うま味閾値については検索していない。

そこで本研究では、(1) 肥満者 (BMI>25、n=34) の血漿レプチン濃度、血糖値、血漿インスリン濃度、五基本味の認知閾値とその日内変動について検索を行い、その結果を、当研究室で発表した非肥満者 (BMI<25、n=47) の結果 (Nakamura Y *et al.*, 2008) と比較した。次に、血漿レプチン濃度と味覚閾値の日内変動率と、血糖値・インスリン濃度の食事後変化率との間で相関解析を行った。(2) 次に、うま味感受性と肥満との関連を明らかにするために、うま味感受性との相関が報告されているうま味受容体コンポーネント T1R1 の一塩基多型 (*TAS1R1*: A372T) について、肥満者 (BMI>27.5, n=248) と非肥満者 (BMI<20, n=249) の関連を検索した。

その結果、(1) 肥満者は、非肥満者と比べ、うま味閾値のみが有意に高かった。日内変動では、血漿レプチン濃度は朝から夜にかけて有意の上昇を示したが、その日内変動率は非肥満者に比べ低下していた。甘味閾値は朝と夜の差が減少し、有意な日内変動は見られなかった。うま味閾値は朝よりも夜の方が低くなり、非肥満者との有意差が認められた。肥満者のうま味閾値の日内変動は非肥満者の甘味閾値の日内変動と朝と夜の関係が逆転していた。また、肥満者の血中レプチンの日内変動率は、食後インスリン変化率と正の相関を示し、さらに、血中レプチン、および甘味閾値とうま味閾値の日内変動率は、食後の血糖値変化率 / インスリン濃度変化率の比 と、負の相関を示した。(2) 非肥満者と肥満者間における *TAS1R1* の一塩基多型解析では、肥満との有意な関連は認

めなかった。

以上の結果から、肥満者では、血漿レプチン濃度の日内変動がみられ、食後インスリン分泌もそれに比例して上昇するが、味覚器では、朝のレプチンレベルの上昇により、レプチン感度がすでに飽和に達しており、その後のレプチン濃度の上昇は、甘味感受性調節には十分に働かなくなる可能性が示唆された。また、うま味閾値の日内変動が逆転し、夜に低下することを示した。さらに、基礎レプチン濃度の上昇に伴う甘味感受性調節系の活性（日内変動）低下は、食後１時間のインスリン濃度変化率に対する血糖値変化率の比と負の相関を示すことから、肥満者において、レプチンによる甘味・糖吸収系への抑制制御の破綻とインスリン抵抗性の上昇が連関する可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、米国女性肥満者のうま味閾値が非肥満者に比べ有意に高ことが報告されているが、その原因は不明である。過去に健常者のレプチンの血中濃度と甘味認知閾値の日内変動が同調するが、肥満者ではその変化率が減少傾向にあることが報告されている 。しかし、その報告では肥満者数が少なくうま味閾値については検索されていない。

本研究では、まず 肥満者の血漿レプチン濃度、血糖値、血漿インスリン濃度、五基本味の認知閾値とその日内変動について検索を行い、その結果を、過去の非肥満者の結果と比較している。さらに、血漿レプチン濃度と味覚閾値の日内変動率と、血糖値・インスリン濃度の食事後変化率との相関関係を調べている。次に、うま味感受性と肥満との関連を明らかにするために、うま味感受性との相関が明らかになっているうま味受容体コンポーネント T1R1 の一塩基多型（*TAS1R1*: A372T）について、肥満者（BMI>27.5, n=248）と非肥満者（BMI<20, n=249）の関連性の検索を行っている。その結果、肥満者は、非肥満者に比べ、うま味閾値のみが有意に高く、日内変動では、血漿レプチン濃度は朝から夜にかけて有意の上昇を示したが、その日内変動率は非肥満者に比べ低下していた。甘味閾値は朝と夜の差が減少し、有意な日内変動は見られなかった。うま味閾値は朝よりも夜の方が低く、非肥満者との有意差が認められた。肥満者のうま味閾値の日内変動は非肥満者の甘味閾値の日内変動と朝と夜の関係が逆転していた。また、肥満者の血中レプチンの日内変動率は、食後インスリン変化率と正の相関を示し、さらに、血中レプチン、および甘味閾値とうま味閾値の日内変動率は、食後の血糖値変化率 ／インスリン濃度変化率の比と負の相関を示した。しかし、非肥満者と肥満者間における T1R1 の一塩基多型解析では、肥満との有意な関連は認めなかった。

以上の結果から、肥満者では、レプチンによる甘味・糖吸収系への抑制制御の破綻とインスリン抵抗性の上昇が連関する可能性が示唆され、本研究がレプチンの代謝制御に関する貴重な知見を与えていることから博士（歯学）の授与に値すると判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ほりお　なお **堀　尾　奈　央**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５２９号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**酸味受容体候補分子の電気生理学的解析**
論文調査委員	（主　査）教授　中西　博 （副　査）教授　平田雅人　　教授　城戸瑞穂

論　文　内　容　の　要　旨

味覚は、食を通じて健康を維持する上で不可欠の感覚である。腐敗物は酸味を呈し、動物は摂取を拒否する。生体防御にとって重要なシグナルとなる酸味の受容体については、未だその詳細は不明である。

酸味受容体候補分子として PKD1L3 と PKD2L1 が知られている。両分子は、舌咽神経支配領域である舌後方部有郭乳頭味細胞では共発現するが、鼓索神経支配の舌前方部茸状乳頭味細胞では PKD2L1 のみ発現する。味細胞は形態学的に I、II、III 型および基底細胞 (IV 型) に分類されるが、PKD2L1 は酸味応答を示す III 型味細胞に発現し、両分子を強制発現させた HEK 細胞では、酸を取り除いた後に起こるオフ応答が確認されている。

本研究では、酸味受容における両分子の生体での役割を明らかにするため、PKD2L1 と PKD1L3 の単独および両分子の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作出し、電気生理学的解析を行った。

鼓索神経全神経束応答解析の結果、PKD2L1 KO マウスと両分子ダブル KO マウスでは野生型と比べ、酸味応答が有意に減少したが、その減少量は 25-45%程度だった。舌咽神経全線維束応答解析では、酸味応答はすべての KO マウスで野生型との差が見られなかった。塩味・苦味・甘味・うま味応答は両神経ともに変化が無かった。また、舌咽神経での酸味オフ応答は、いずれの KO マウスでも有意に減少した。

さらに、PKD2L1 KO マウスと野生型マウスでの鼓索神経単一神経線維応答を解析した結果、PKD2L1 KO マウスで酸味応答は有意に減少した。また、III 型細胞のマーカーである GAD67 を GFP により可視化したマウス (GAD67-GFP) と PKD2L1 KO マウスを交配させ GAD67-GFP+PKD2L1 KO マウスを作出し、ルーズパッチ法で茸状乳頭 III 型味細胞応答を記録した結果、GAD67-GFP+PKD2L1 KO マウスで酸味応答は有意に減少した。

これらの結果から、舌前方部鼓索神経領域の酸味応答に PKD2L1 が一部関与し、PKD2L1 関連酸味応答は茸状乳頭で GAD67-GFP を発現している酸味応答味細胞と、鼓索神経酸味応答単一神経線維を経由して生じることが示唆された。また、舌後方部舌咽神経領域の酸味オフ応答への PKD1L3 と PKD2L1 の関与がノックアウトマウスを用いた実験でも明らかなものとなった。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

味覚は、食を通じて健康を維持する上で不可欠の感覚である。腐敗物は酸味を呈し、動物は摂取を拒否する。生体防御にとって重要なシグナルとなる酸味の受容体については、未だその詳細は不明である。

酸味受容体候補分子として PKD1L3 と PKD2L1 が知られている。両分子は、舌咽神経支配領域である舌後方部有郭乳頭味細胞では共発現するが、鼓索神経支配の舌前方部茸状乳頭味細胞では PKD2L1 のみ発現する。味細胞は形態学的に I、II、III 型および基底細胞（IV 型）に分類されるが、PKD2L1 は酸味応答を示す III 型味細胞に発現し、両分

子を強制発現させた HEK 細胞では、酸を取り除いた後に起こるオフ応答が確認されている。

本研究では、酸味受容における両分子の生体での役割を明らかにする目的で、PKD2L1とPKD1L3の単独および両分子の遺伝子ノックアウト(KO)を作出し、以下の電気生理学的解析を行った。

鼓索神経全神経線維束応答解析の結果、PKD2L1 KOマウスと両分子ダブルKOマウスでは野生型と比べ、酸味応答が有意に減少したが、その減少量は 25-45%程度だった。舌咽神経全神経線維束応答解析では、酸味応答は全てのKOマウスで野生型と差が見られなかった。塩味・苦味・甘味・うま味応答は両神経ともに変化が無かった。また、舌咽神経での酸味オフ応答は、いずれのKOマウスでも有意に減少した。

さらに、PKD2L1 KOマウスと野生型マウスでの鼓索神経単一神経線維応答を解析した結果、PKD2L1 KOマウスで酸味応答は有意に減少した。また、III型細胞マーカーであるGAD67をGFPにより可視化したマウス(GAD67-GFP)とPKD2L1 KOマウスを交配させGAD67-GFP+PKD2L1 KOマウスを作出し、ルーズパッチ法で茸状乳頭III型味細胞応答を記録した結果、GAD67-GFP+PKD2L1 KOマウスで酸味応答は有意に減少した。

以上、本研究により舌前方部鼓索神経領域の酸味応答にPKD2L1が一部関与し、PKD2L1関連酸味応答は茸状乳頭でGAD67-GFPを発現している酸味応答味細胞と、鼓索神経酸味応答単一神経線維を経由して生じることが示唆された。また、舌後方部舌咽神経領域の酸味オフ応答へのPKD1L3とPKD2L1の関与がノックアウトマウスを用いた実験でも明らかとなった。従って、本論文は学位論文に値するものと判断される。

氏名・(本籍・国籍)	李(リ) 宏(コウ) (中国)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	歯博甲第５３０号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**療養型医療施設・高齢者施設の入所高齢者の口腔内に認められる真菌種の分布についての検討**
論文調査委員	(主査) 教授　中村誠司 (副査) 教授　森　悦秀　　教授　寺田善博

論文内容の要旨

近年、微生物群集から直接抽出したDNAを解析する手法の開発により、口腔常在フローラの構成と宿主の健康状態との関連が徐々に明らかにされてきている。一方で真菌類の分布には、特に高齢者において、未だ不明な点が多い。本研究では、真菌の internal transcribed spacer (ITS) 領域を利用した網羅的真菌解析系を用いて高齢者の口腔における真菌種分布の解明を目指した。さらにその構成と健康状態との関連について検討を行った。

対象は療養型医療施設および高齢者施設長期入所者291名 (85.7±7.4歳) とした。採取した舌苔から抽出したDNAを用いて含まれる総真菌量を測定したのち、真菌群集の構成の特定を行った。総真菌量の測定にはITS1領域を利用した定量PCR法を用い、真菌種構成の把握はITS1–5.8S–ITS2領域を利用したlength heterogeneity PCR法と各断片の塩基配列の決定により行った。

解析を行った291名のうち128名で舌苔検体あたり10^4 CFU以上の真菌が検出され、そのうち35名では10^5 CFU以上認められた。10^4 CFU以上の真菌が認められた128名について構成菌種を同定した結果、最も高頻度で検出されたのは *Candida albicans* (105名; 82.0%) であり、続いて *Candida dublinensis* (78名; 60.9%)、*Malassezia restricta* (57名; 44.5%)、*Candida tropicalis* (45名; 35.1%)、*Candida glabrata* (26名; 20.3%) などが多くの被験者で認められた。舌苔採

取の前後約6か月からなる1年間の観察期間おける1週間以上の発熱の有無と真菌分布との関係について統計学的に検討したところ、総真菌数が10^5 CFU以上と真菌の過増殖が起きている被験者では、*C. albicans* 以外の真菌が検出される場合、特に *C. glabrata* や *C. tropicalis* が検出される場合に発熱との関連が認められた。このような関連は舌苔の湿潤度、義歯の使用、生活活動動作、認知機能障害、嚥下障害、抗生剤の使用といった発熱関連因子を多変量ロジスティック回帰分析にて調整した際にも有意であった。本研究により高齢者の口腔内の真菌種の分布が明らかになり、さらにその構成と宿主の健康状態との関連性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、微生物群集から直接抽出したDNAを解析する手法の開発により、口腔常在フローラの構成と宿主の健康状態との関連が徐々に明らかにされてきている。一方で真菌類の分布には、特に高齢者において、未だ不明な点が多い。本研究では、真菌のinternal transcribed spacer (ITS) 領域を利用した網羅的真菌解析系を用い、高齢者の口腔に存在する真菌種の把握を目指した。さらにその構成と健康状態との関連についても検討を行った。

対象は療養型医療施設および高齢者施設長期入所者291名（85.7 ± 7.4歳）とした。採取した舌苔から抽出したDNAを用いて含まれる総真菌量を測定し、その後に真菌種の同定を行った。総真菌量の測定にはITS1領域を利用した定量PCR法を用い、真菌種の同定はITS1- 5.8S- ITS2領域を利用したlength heterogeneity PCR法と各断片の塩基配列の決定により行った。

解析を行った291名のうち128名で舌苔検体あたり10^4 CFU以上の真菌が検出され、そのうち35名では10^5 CFU以上認められた。10^4 CFU以上の真菌が認められた128名について真菌種を同定した結果、最も高頻度で検出されたのは *Candida albicans*（105名; 82.0%）であり、続いて *Candida dublinensis*（78名; 60.9%）、*Malassezia restricta*（57名; 44.5%）、*Candida tropicalis*（45名; 35.1%）、*Candida glabrata*（26名; 20.3%）などであった。舌苔採取の前後約6か月からなる1年間の観察期間おける1週間以上の発熱の有無と真菌分布との関係について統計学的に検討したところ、総真菌数が10^5 CFU以上と真菌の増殖が起きている被験者では *C. albicans* 以外の真菌が検出される場合、特に *C. glabrata* と *C. tropicalis* が検出される場合に発熱との関連が認められた。このような関連は舌苔の湿潤度、義歯の使用、生活活動動作、認知機能障害、嚥下障害、抗生剤の使用発熱関連因子を多変量ロジスティック回帰分析にて検討した場合にも有意であった。

本研究により高齢者の口腔内に存在する真菌種が明らかになり、さらにその構成と宿主の健康状態との関連性が示唆された。このように、本研究は有為な研究成果を得ており、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	なかみちともみ **中道智美**（大阪府）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５３１号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**ポーズドスマイルの三次元定量評価**
論文調査委員	（主　査）教　授　寺田善博 （副　査）教　授　森　悦秀　　教　授　中村誠司

論文内容の要旨

目的: 顔の表情やスマイルの魅力はコミュニケーションに大きな役割を担い、QOLの向上に重要である。ポーズドスマイル時の正常咬合者群の口角点と上唇点はアングルⅡ級１類群よりも上方に位置していることが報告されているが不正咬合者と正常咬合者との間に存在する口唇の機能的な差を三次元的に評価した報告はない。本研究の目的は、ポーズドスマイルを動的、かつ、三次元的に評価し、口角と上下口唇の動きをAngle Ⅰ級正常咬合者、Angle Ⅱ級不正咬合者、骨格性Ⅱ級不正咬合患者の間で比較することである。

資料及び方法:

被験者はAngle Ⅰ級正常咬合を有する30名の成人女性ボランティア、Angle Ⅱ級1類不正咬合を有する23名の成人女性ボランティア、骨格性Ⅱ級不正咬合を有する20名の成人女性患者である。

被験者の顔面皮膚上に14か所の発泡スチロール製マーカーを貼付し、計測空間内で被験者を中央のカメラに向かって座位をとらせた上で高速度カメラ(VFC300、朋栄、東京)を3台用いて、スマイル時の顔面軟組織を正面、左右斜め45°の3方向から同期撮影を行った。3秒間のポーズドスマイル動作を行わせ、撮影を3回繰り返した。動画像データは三次元動作解析ソフト（WINanalyze、Mikromak社、独）に読み込み、マーカーの認識と探索範囲を画像上で設定した後、自動追跡処理を行い、マーカーの三次元座標値を求めた。Angle Ⅰ級正常咬合者、Angle Ⅱ級不正咬合者、骨格性Ⅱ級不正咬合患者のポーズドスマイル時の口角および上下口唇点の三次元的動きに有意差が認められるかを検証した。臨床応用として骨格性Ⅱ級不正咬合患者のポーズドスマイル時の口角および上下口唇点の三次元的動きを矯正治療前後で比較した。

結果:

1. 骨格性Ⅱ級不正咬合患者は下唇中点や下唇四分点においてAngleⅠ級正常咬合者やAngleⅡ級不正咬合者と比較して有意に速く後方に移動し、移動量も大きかった。
2. 骨格性Ⅱ級不正咬合患者の上唇四分点はAngleⅠ級正常咬合者、AngleⅡ級不正咬合者と比較して側方への移動が小さかった。
3. AngleⅡ級不正咬合者や骨格性Ⅱ級不正咬合患者はAngle Ⅰ級正常咬合者よりも、口角点が有意に遅く上方へ移動した。
4. 矯正治療後のポーズドスマイルは矯正治療前に比べて動きが大きくなった。

考察: 以上の所見より骨格性Ⅱ級不正咬合患者は下顎骨の後退という骨格の形態異常を補うために下唇の後方への動きは大きくなり、口角、上唇、左右上唇中点の上方および側方への動きが制限されて正常咬合者群と比較して小さな動きとなっていることが示された。不正咬合はスマイル動作に影響を及ぼし、コミュニケーションやQOLにも関係する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究の目的は，ポーズドスマイルを動的，かつ三次元的に評価し，口角と上下口唇の動きをAngle Ⅰ級正常咬合者，Angle Ⅱ級不正咬合者，骨格性Ⅱ級不正咬合患者の間で比較することであった．

被験者は Angle Ⅰ級正常咬合を有する30名の成人女性ボランティア，Angle Ⅱ級1類不正咬

合を有する23名の成人女性ボランティア，骨格性Ⅱ級不正咬合を有する20名の成人女性患者である．被験者の顔面皮膚上に発泡スチロール製マーカーを貼付し，高速度カメラでスマイル時の顔面軟組織を正面，左右斜め45°の3方向から同期撮影を行い，マーカーの三次元座標値を求めた．Angle Ⅰ級正常咬合者，Angle Ⅱ級不正咬合者，骨格性Ⅱ級不正咬合患者のポーズドスマイル時の口角および上下口唇点の三次元的動きに有意差が認められるかを検証した．臨床応用として骨格性Ⅱ級不正咬合患者のポーズドスマイル時の口角および上下口唇点の三次元的動きを矯正治療前後で比較した．

以下の結果が得られた．

1．骨格性Ⅱ級不正咬合患者は下唇中点や下唇四分点においてAngle Ⅰ級正常咬合者やAngle Ⅱ級不正咬合者と比較して有意に速く後方に移動し，移動量も大きかった．
2．骨格性Ⅱ級不正咬合患者の上唇四分点はAngle Ⅰ級正常咬合者，Angle Ⅱ級不正咬合者と比較して側方への移動が小さかった．
3．Angle Ⅱ級不正咬合者や骨格性Ⅱ級不正咬合患者はAngle Ⅰ級正常咬合者よりも口角点が有意に遅く上方へ移動した．
4．矯正治療後のポーズドスマイルは矯正治療前に比べて動きが大きくなった．

以上の結果より骨格性Ⅱ級不正咬合患者は下顎骨の後退という骨格の形態異常を補うために下唇の後方への動きは大きくなり，口角，上唇，左右上唇中点の上方および側方への動きが制限されて正常咬合者群と比較して小さな動きとなっていることが示された．不正咬合はスマイル動作に影響を及ぼし，コミュニケーションやQOLにも関係する可能性が示唆された．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	ネティ トリスナワティ Nety Trisnawaty　（インドネシア）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５３２号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	A Study on Effects of Four Premolar Extractions on Vermilion Height and Lip Area in Patients with Bimaxillary Protrusion（上下顎前突症例における前歯後方移動と口唇の形態変化との関連性について）
論文調査委員	（主　査）教授　森　悦秀 （副　査）教授　中村誠司　教授　古谷野　潔

論　文　内　容　の　要　旨

Objective：The objectives of orthodontic treatment are not only to obtain functional occlusion, but also to improve facial and dental esthetics. In the orthodontic patients with bimaxillary protrusion, labially protruded teeth incline their lips toward out-side, and make their lip morphology convex. In this situation, the clinicians would treat the patients by extracting their premolars in order to straighten their profiles. However, at the same time, this treatment modality might result in the decrease of the vermilion height. The purpose of this study was to evaluate the effects of orthodontic treatment with four premolars extraction on the changes of vermilion height and lip area at rest and on smiling.

Materials and Methods: Twenty-eight female patients (age range: 18 to 30 years, mean 21.9 ± 3.1 years) who were diagnosed as the bimaxillary protrusion and treated with the four premolars extraction were selected from the case files of the Orthodontic Clinics, Kyushu University Hospital. The control group consisted of 28 female volunteers (age range: 20 to 30

years, mean 25.0 ± 3.0 years) with Angle Class I normal occlusion. The frontal photographs of the patients were taken at both the pre and post orthodontic treatment in rest position. Thirty-five landmarks on the upper and lower lips were identified for the vermilion height measurements. The pretreatment values of the patients group were compared with those of posttreatment using Wilcoxon signed-ranks test. Wilcoxon rank sum tests were used to test the mean differences between the patient and the control group. Lateral cephalograms were taken before and after active orthodontic treatment, and linear and angular measurements were performed. Pearson's correlation coefficients and stepwise multiple regression analysis were calculated. For the evaluations of smiling lips, 15 female patients and 25 female volunteers were obtained from the case files. The same statistical analyses were conducted for the smiling lips.

Results: The mean values of the pretreatment vermilion height and lip area were significantly larger than those of the control group. After the orthodontic treatment, those values significantly decreased toward the values in the control group. There was no significant difference in the vermilion height and lip area between the posttreatment and the control group, except for the values in the lower lip area. Cephalometric analysis revealed that the upper and lower incisors were significantly moved posteriorly. Only a few or several significant correlations were found between the incisor position changes and the vermilion height for the upper and lower lips, respectively. For the smiling lip evaluations, the same tendencies were found for the vermillion height and lip area changes. We also obtained the similar results in the correlations between the incisor positions changes and the vermillion height and lip area changes when the smiling facial photographs were used.

Conclusions: The bimaxillary protrusion cases can be treated with four premolars extraction, decreasing the vermilion height toward the normal concomitantly with improving their profiles. The lower vermillion height and lip area might be predicted by including the variables of the incisor position changes as well as the initial soft tissue variables.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

矯正歯科治療には、機能的な咬合だけでなく、顔面および歯列の審美的改善が要求される。上下顎前突症の患者では、唇側に傾斜した前歯が口唇を外側圧排し、突出した口唇形態になるため、側貌の改善に小臼歯の抜歯が選択される。しかしながら、この治療は赤唇形態、特にその高さを減少させ、審美性に影響を与える可能性がある。本研究の目的は、小臼歯4本抜歯を伴う矯正治療が、安静時およびポーズドスマイル時の赤唇形態、特にその高さに与える影響を明らかにすることである。

九州大学病院矯正歯科で上下顎前突症と診断され、小臼歯4本抜歯で治療された28名の女性患者（18～30歳、平均21.9±3.1歳：患者群）の資料を用いた。対照には、アングルI級正常咬合の女性ボランティア28名（20～30歳、平均25.0±3.0歳：対照群）の資料を用いた。被験者の正貌写真は口唇を安静位で撮影し、赤唇形態を評価するために上唇および下唇に35の計測点を設定した。患者群の治療前後の赤唇の計測値の比較には、ウィルコクソン符号順位検定を用いた。患者群および対照群間の平均差の比較にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。動的矯正治療前後に側面位頭部規格X線写真（側面位セファログラム）を撮影し、線および角度分析を行なった。対照群も側面位セファログラムを撮影し、分析を行なった。これらの結果からピアソンの相関係数を計算し、階層的重回帰分析を行なった。

ポーズドスマイルの評価は、15名の女性患者と25名の女性ボランティアの資料を用い、安静時と同様の方法で赤唇形態を評価した。

これにより、以下の結果が得られた。

1. 患者群において治療前の赤唇の高さの平均は、対照群より有意に大きかったが、治療後は有意に減少し対照群の平均に近くなり、下唇部以外では患者群治療後と対照群間の赤唇形態に有意な差は認められなかった。
2. 側面頭部X線写真分析では、上下中切歯の有意な後方移動が観察された。しかし、中切歯の位置変化と上唇および下唇における赤唇の高さの間の相関は下唇では認められたが、

上唇では少数の部位で認められるのみであった。

3. ポーズドスマイル時の赤唇形態、中切歯の位置変化との関係についても、安静時と同様の傾向が認められた。

以上より、上下顎前突症例は小臼歯4本抜歯を伴う矯正治療で、側貌の改善とともに赤唇形態、特に赤唇の高さを標準的な値に減少させ得ることが示された。併せて、下唇の形態は、切歯の後退量で予測される可能性が示唆された。

本研究は矯正治療の成績を担保する研究であり、学位論文として価値があるものと判断した。

氏名・(本籍・国籍)	なか むら かおる **中 村 かおる** (鹿児島県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	歯博甲第533号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学府 歯学専攻
学位論文題目	**咬筋筋活動の機能的特性と顎顔面骨格形態の関係について**
論文調査委員	(主 査) 教 授 古谷野 潔 (副 査) 教 授 森 悦 秀 教 授 寺 田 善 博

論 文 内 容 の 要 旨

目的

顎顔面骨格を取り巻く環境、特に咀嚼筋機能と不正咬合の要因となる顎顔面骨格形態との関連性については過去にも様々な報告がなされているが、これらの関連性は未だ明確になっていない。本研究課題は機能評価として非侵襲的な表面筋電図 (Electromyography; EMG) を用い、高い再現性が期待できる分析方法を考案し、等尺性収縮時の咬筋筋活動の機能的特性と顎顔面骨格形態との関連性を検討することである。

資料および方法

被験者は、本学倫理委員会承認を受けた本研究の趣旨に賛同し、歯数異常、顎関節症状や矯正治療の既往がない成人男性25名 (22-30歳、平均年齢24.7±2.1歳) とした。

最大かみしめ時の咬合力 (Maximum Voluntary Contraction; MVC) を咬合接触検査装置 (T-scan III) で測定した。MVCの10%、20%、30%、40%および50%の咬合力で6秒間のかみしめをそれぞれ10回試行し、両側咬筋のEMGをsampling周波数5kHzで記録し、咬合力を同時測定した。分析は主咀嚼側の2秒後から4秒間のEMGデータを用い、1024pointごとに高速フーリエ変換して得られた19のpower spectrumの周波数の中央値 (median周波数; MF) の標準偏差を算出し、各10回の記録時で平均した値を筋活動の安定性の指標 (stability index; SI) とした。日を改めて5回同様のかみしめ試行を行い、計測の再現性を検討した。さらに、最大咬合力でのかみしめ時の筋活動の変化を調べる目的で、最大かみしめを咬合力が50%MVCを下回るまで持続して行わせ、咬筋のEMGを記録した。分析は、かみ始め後、最大咬合力を記録してからの38秒間を用いて2秒毎にMFを算出し、その経時変化の近似直線の傾きを求め、筋活動の指標とした。

形態分析においては、側面頭部X線規格写真を撮影し、透写図上で16の計測項目を設定した。

統計処理にはPearsonの相関分析法を用い、形態計測値と各機能分析値との相関を算出し、危険率5%で有意性を検討した。

結果

10%から50%MVCまで全ての咬合力においてSIの再現性が認められた。相関分析の結果から、骨格系の計測項目においては、SIが小さいほど前顔面高 (N-Me)、前下顔面高 (ANS-Me) が大き

く、下顎骨体長（Go-Pog）、下顎骨全体長（Cd-Pog）および下顎枝高（Cd-Go）が大きかった。歯系の計測項目においては、SIが小さいほど下顎前歯軸（L1-Mandibular plane angle）が舌側傾斜し、上下前歯軸角（interincisal angle）大きく、上下顎臼歯部高（Palatal plane to Mo、Mi to Mandibular plane）が大きかった。最大かみしめ時のMFの経時変化の近似直線の傾きと下顎下縁平面角（Mandibular plane angle）との間には有意な負の相関関係が示された。

考察

本研究で採用したSIは全ての咬合力において再現性を有し、他のEMGパラメーターと比較して高い信頼性を確認した。弱い等尺性収縮時の咬筋筋活動が安定している個体ほど下顎骨が大きく、上下顎臼歯部高は高くなり、前顔面高、特に前下顔面高が大きくなるSkeletal Class IIIの特徴を含む傾向がみられた。特に筋活動の安定性と下顎骨の大きさとの間に強い関連性が示唆された。また、最大かみしめ時の咬筋筋活動の特性においては、MFの低下が大きいほど下顎下縁平面角が大きい、high angleの特徴が認められた。結論として、等尺性収縮時の咬筋筋活動の機能的特性と顎顔面骨格形態との間に関連性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、非侵襲的な表面筋電図（Electromyogram: EMG）を用い、日常臨床に応用可能で、高い再現性が期待できる新たな評価法を考案し、咀嚼筋機能と顎顔面骨格形態との関連性を検討したものである。

被験者は、歯数異常、顎関節症状や矯正治療の既往がない成人男性25名とした。最大かみしめ時の咬合力（Maximum Voluntary Contraction; MVC）を咬合接触検査装置（T-scan III）で測定した。MVCの10、20、30、40および50%の咬合力で6秒間のかみしめ時の両側咬筋のEMGを記録し、咬合力を同時測定した。分析は主咀嚼側のEMGデータを1024pointごとに高速フーリエ変換し、得られたpower spectrumの周波数の中央値（median周波数）の標準偏差を算出し、各10回の記録時で平均した値を筋活動の安定性の指標とした。さらにかみしめ時の筋活動の変化を調べた。分析はかみ始め後、最大咬合力を記録してからの38秒間を用いて2秒毎にmedian周波数を算出し、その近似直線の傾きを求め、筋活動の易疲労性の指標とした。形態分析においては、側面頭部X線規格写真を撮影し、透写図上で16の計測項目を設定した。統計処理にはPearsonの相関分析法を用い、形態計測値と各機能分析値との相関を算出し、危険率5%で有意性を検討した。

全ての咬合力においてmedian周波数の標準偏差の再現性が認められた。相関分析の結果から、骨格系の計測項目においては、弱収縮時のmedian周波数の標準偏差が小さいほど前顔面高、前下顔面高が大きく、下顎骨体長、下顎骨全体長および下顎枝高が大きかった。歯系の計測項目においては、弱収縮時のmedian周波数の標準偏差が小さいほど下顎前歯軸が舌側傾斜し、上下前歯軸角が大きく、上下顎臼歯部高が大きかった。最大かみしめ時のmedian周波数の近似直線の傾きと下顎下縁平面角、口蓋平面角との間には有意な負の相関関係が示された。かみしめ持続時間と形態計測値との間に相関関係は認められなかった。

本研究で採用したEMG検査法は高い再現性を有し、臨床的に有用であることが示された。かみしめ時の咬筋筋活動の安定性および易疲労性の機能的特性と顎顔面骨格形態との間に密接な関連性が示唆された。以上より、本研究は学位論文に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	アハメド ナフィス ラシッド AHMED NAFIS RASHID　(バングラデシュ)
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５３４号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Fabrication of biocompatible poly（ethylene terephthalate）（PET）by calcium-ozone treatment（カルシウムーオゾン処理による生体親和性ポリエチレンテレフタラート材の創製）
論文調査委員	（主　査）教　授　古谷野　潔 （副　査）教　授　森　悦秀　教　授　久木田　敏夫

論　文　内　容　の　要　旨

Polyethylene terephthalate (PET) possess excellent mechanical properties such as flexibility, plasticity, optical clarity, resistance to rupture/chemicals etc. However, in spite of these splendid properties, this material is hydrophobic and lacking biocompatibility. We previously reported that, ozone-calcium chloride treatment could provide titanium with osteoconductivity and concluded that, Ca ions might be immobilized with hydroxyl groups on the surface. This method might be applicable for polymers because hydroxyl and carboxylic groups can form during ozone (O_3) treatment.

This approach involves the ozonation of PET in calcium containing solution to increase wettability and immobilize calcium (Ca) ions on the PET surface. PET films were subjected to O_3 treatment in 300 mmol/L and 1 mol/L $CaCl_2$ aqueous solution (O_3-$CaCl_2$) for 6 hours under atmospheric pressure. For comparison, PET films were also treated with O_3 in distilled water (O_3-H_2O). Chemical reactions and calcium ion immobilization were confirmed by XPS analysis. Hydrophilicity was investigated by measuring contact angles. Surface topography before and after ozone treatment in distilled water and calcium containing solutions was observed by scanning electron microscopy (SEM) and results clearly showed there was no difference between ozone treated and untreated PET films. Initial cell attachment and morphology after 3 hours incubation clearly demonstrated that Ca ion modification enhanced the adhesion and spreading of NIH3T3 (fibroblast like cells), MC3T3-E1 (osteoblast like cells) and rat bone marrow (RBM) cells both qualitatively and quantitatively. The growth rate of all types of cell was also accelerated with Ca ion immobilized PET substrates. Vinculin and actin immunostainig of MC3T3-E1 after 3 hours incubation revealed increased number of focal adhesion plaque (vinculin) and actin stress fibers in case of Ca-O_3-PET substrates.

Based on these results, it was expected that, calcium-ozone oxidation at 37°C for 6 hours is an effective method to fabricate PET with good biocompatibility.

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

ポリエチレンテレフタラート（PET）はその良好な機械的特性から人工靭帯等として臨床使用されているが，生体親和性に劣っている。カルシウムイオン（Ca^{2+}）は細胞の接着，増殖，遊走を高める働きを持つことから，PET 表面に Ca^{2+}を固定化できれば細胞親和性を獲得できると考えている。本研究ではカルシウム-オゾン処理を用いて PET 表面に Ca^{2+}の固定化を試み，得られた表面の

細胞適合性を調べることを目的としている。

まず，処理条件に関して基礎的な検討を行っており，塩化カルシウム水溶液の濃度は300 mmol/L，オゾン濃度は2-5 ppm，処理温度は37°C，処理時間は6時間の条件が最も効率よくPET表面にCaを固定化できることを明らかにしている。また，カルシウム-オゾン処理後には親水性の向上が確認されているが，本処理前後における表面構造変化がないことを走査型電子顕微鏡観察によって明らかにしている。X線光電子分光分析によって処理後のPET表面にカルボキシル基の生成が認められることから，Ca^{2+}はPET表面にカルボキシル基を介して固定化される機構を提唱している。

ラットの骨髄細胞，繊維芽細胞様細胞（NIH3T3）および骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を用いて細胞の初期接着および増殖挙動を調査しており，カルシウム-オゾン処理PET試片は未処理PET試片に比べて有意に高い値を示すことを明らかにしている。さらに，蛍光顕微鏡を用いてMC3T3-E1のビンキュリンやアクチンフィラメントの発達状況を調査しており，カルシウム-オゾン処理PET試片は未処理PET試片に比べて有意に高い値を示すことを明らかにしている。

以上の結果を踏まえて，カルシウム-オゾン処理はPET基板の細胞親和性を高める上で極めて有効であると結論づけている。

本研究で得られた知見が歯科臨床のみならず医学臨床にも応用可能で，関連学術領域の発展に大きく寄与するものであり，本論文は学位論文としての価値あるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	イラ アルティリア IRA ARTILIA　（インドネシア）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５３５号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Ozone treatment improves the handling and mechanical properties of apatite cement（オゾン処理によるアパタイトセメントの操作性および機械的強度の向上）
論文調査委員	（主　査）教授　古谷野　潔 （副　査）教授　森　悦秀　教授　久木田　敏夫

論　文　内　容　の　要　旨

Apatite cement (AC) powder when mixed with its liquid phase and filled into bone defect would set *in situ* to form hydroxyapatite (HAp). As a result of HAp formations, it shows biocompatibility and osteoconductivity. When softer AC is needed, as an example for minimal invasive surgery, larger amount of liquid was employed. Although increasing the liquid portion can increase the flowability of AC paste but it will make the result in larger porosity and lower mechanical strength of the set mass. Moreover, adding water-reducing agent to reduce the required water for handling cannot be applied for AC in respect to the biocompatibility. This problem requires another method to improve the handling property of AC without sacrificing its properties by modifying the wettability of cement powder. Some researchers reported that ozone (O_3) gas treatment could introduce OH functional groups to improve the wettability of some solid material. Therefore, in this study, O_3 gas treatment was expected to introduce OH functional groups and improve the wettability of AC powder.

O_3 gas treatment of powder phase of AC was found to improve the wettability of AC's powder phase. When powder phase is mixed with the liquid phase, it results in softer AC paste and thus results in a better

flow. AC paste becomes soft or its injectability of AC paste was improved. Effect of O_3 treatment on AC properties was found retain the setting time, compositional transformation to apatitic mineral as well as the mechanical strength of the set mass. No effect on the setting reaction was the advantage of O_3-treated AC. Significantly, at the same paste flowability, the mechanical strength of set O_3-treated AC was approximately twice higher when compared to that of untreated AC. Smaller amount of liquid to obtain the same flowability and resulting reduced porosity of the set mass is the key for the improved mechanical strength of the set O_3-treated AC. Osteoblast cell response of O_3-treated AC was not significantly different to the untreated AC. After implanted in rat tibia, the tissue response was not affected to the O_3-treated AC. The mechanism of O_3 treatment of AC might be related to the formation of hydroxyl group on the surface of AC powder based on the oxidation of adsorbed water.

O_3 gas treatment was found to be effective to improve the handling properties of AC without sacrificing other properties. In vitro assessment of the O_3-treated AC was also found biocompatible with living tissue.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

一般に，セメントの操作性は原料の混水比によって調整することが可能であるが，混水比の増加は強度の低下を招くため，界面活性剤などの減水剤を添加することにより操作性を獲得している。しかし，この手法を生体材料に適用することは不可能なため，本研究では，アパタイトセメント（AC）の原料粉末をオゾン（O_3）処理することによって，AC の有する生体親和性を損なわずに操作性と機械的強度を高めることを目的としている。

AC の原料粉末に対して O_3 処理が適用されており，X 線回折法を用いて処理前後で結晶構造変化が生じないことを確認している。オゾン処理後に AC 原料粉末の接触角は有意に低下しており，操作性も有意に向上することが確かめられている。また，処理後 4 週間経過しても操作性に変化がないことも確かめられている。本オゾン処理を施しても，AC の硬化時間，アパタイトへの相変換速度，AC 硬化体の機械的強度等の基本的性質に影響を及ぼさないことが明らかにされている。臨床応用を考えた際には操作性が重要であることから，同じ操作性を持つ未処理試料とオゾン処理試料の間で機械的強度を比較すると，オゾン処理は未処理に比べて約 2 倍の値を持つことが明らかにされている。

オゾン処理を適用して作製した AC 硬化体の細胞適合性については，ラット骨髄細胞を用いて調査されており，市販の焼結ハイドロキシアパタイトやオゾン処理を適用せずに作製した AC 硬化体と比較して，同程度の初期細胞接着および増殖挙動を示すことが明らかにされている。以上の結果より，本手法で提案したオゾン処理は，今後 AC の操作性を向上させる上で有効である可能性が極めて高いことが示唆された。

本研究で得られた知見は今後の AC の性能の向上に大きく寄与するものであり，本論文は学位論文として価値があるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	おおつ あきひろ 大津亮泰 (長崎県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	歯博甲第５３６号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Fabrication of Carbonate Apatite Bone Replacement Using Sintered Calcite as a Precursor (焼結炭酸カルシウムを前駆体として用いた炭酸アパタイト骨置換材の創製)
論文調査委員	(主　査) 教　授　古谷野　潔 (副　査) 教　授　森　悦秀　教　授　久木田敏夫

論　文　内　容　の　要　旨

【緒言】炭酸アパタイト(CO_3Ap)は骨リモデリングサイクルに調和する骨置換材として臨床応用が期待される。CO_3Ap は熱的に不安定なため焼成法を用いて成形することができないため、当研究室では前駆体の溶解-析出反応を利用して組成変換させ CO_3Ap を得る方法、即ち、水酸化カルシウム ($Ca(OH)_2$) を二酸化炭素に暴露し、炭酸化して得られた高反応性の炭酸カルシウム ($CaCO_3$) を前駆体として用い、それをリン酸化することで CO_3Ap を調製する手法を開発した[1) 2)]。しかし、この手法で合成した CO_3Ap は焼成法で得られる骨補填材に比べて強度が低く(5MPa)、長い処理時間 (17 日) を必要とするため、臨床応用を見据えると、これらの欠点を解決することが望ましい。本研究では、$Ca(OH)_2$ の炭酸化に加熱法を、リン酸化に水熱法を適用し、迅速に機械的強度の高い CO_3Ap を作ることを目的とした。

【実験】粉末状の $Ca(OH)_2$ をステンレススチール製のモールドに充填し、一定圧力 (0.2, 0.5, 1, 2 MPa) で一軸加圧して圧粉体を作製した。これを 50mL•min^{-1} で炭酸ガスを環流させた管状炉にて種々の温度 (200, 400, 600, 700, 800, 900°C) で 1 時間熱処理を行った。粉末X線回折 (XRD) 装置で試料の結晶構造を分析し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で試料表面および断面の形態変化を観察した。また、得られた試料の外形容積および重量を測定し、見かけ気孔率を算出した。機械的強度は間接引張強さ (DTS) にて評価した。その後、炭酸化した試料を 1mol·L^{-1} リン酸水素二ナトリウム水溶液中に浸漬し、200°C で 24 時間水熱処理を施した。このリン酸化した試料についても上述と同様の分析を行った。ラットの骨髄細胞を用いて、得られた試料の in vitro 細胞親和性を評価した。

【結果と考察】加熱処理による $Ca(OH)_2$ 圧粉体の炭酸化について検討したところ、熱処理温度の上昇に伴い $Ca(OH)_2$ から $CaCO_3$ への相変換速度が高まり、強度も向上した。しかし、700°C 以上の熱処理を行うと粒成長が生じるとともに、熱分解成分である酸化カルシウム (CaO) が形成することで強度の低下が認められた。また、$Ca(OH)_2$ 圧粉体を作製する際の成形圧を高くすると強度は向上するが、粒子間隙が密になるために炭酸ガスが圧粉体内部まで行き渡らず、炭酸化が生じにくいことが分かった。以上の結果から、適度な成形圧で作製した $Ca(OH)_2$ 圧粉体を、600°C で 1 時間、炭酸ガス雰囲気で加熱処理することで、迅速に強度の高い $CaCO_3$ 前駆体が得られることが分かった。続いて，水熱処理による $CaCO_3$ 前駆体のリン酸化について検討したところ、$Ca(OH)_2$ 圧粉体を作製する際の成形圧が高い場合は、これを炭酸化して得られる $CaCO_3$ 成形体の粒子間隙も密になるために、リン酸イオンが圧粉体内部まで行き渡らず、リン酸化が生じにくいことが分かった。即ち、0.2MPa で $Ca(OH)_2$ 圧粉体を成形し、これを炭酸ガス環流下、600°C で 1 時間熱処理を行い、得られた $CaCO_3$ 前駆体を 200°C で 24 時間水熱処理を施すことで、迅速に従来法よりも強度の高い CO_3Ap 成形体が得られることを明らかにした。ラット骨髄細胞を用いて、この手法で得られた $CaCO_3$ と CO_3Ap のブロック、焼結ハイドロキシアパタイト(HAp)、及び従来法で作製した $CaCO_3$ と CO_3Ap ブロックについて初期細胞接着および、増殖を *in vitro* で調査した結果、本法にて作製した試料が従来法と比べ有意に高い値を示した。

【文献】

1) Lin X, *et.al, J. Mater. Sci. Mater. Med* 2008; 19: 479-484.
2) Ishikawa K, *et.al, J. Ceram. Soc. Japan* 2010; 118: 341-344.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

炭酸アパタイト（CO_3Ap）は，骨リモデリングサイクルに調和する骨置換材として臨床応用が期待される。従来，前駆体の溶解-析出反応を利用して組成変換させCO_3Apを得る方法がとられてきたが，この手法は長い処理時間（17日）を必要とする。本研究では，熱エネルギーを利用して$Ca(OH)_2$の炭酸化および$CaCO_3$のリン酸化の反応速度を高め，迅速にCO_3Apが作製できる手法を検討している。

$Ca(OH)_2$の炭酸化については，$Ca(OH)_2$圧粉体の成形圧および炭酸化の処理温度を変動因子として，流速 50 $mL \cdot min^{-1}$で炭酸ガスを環流させながら1時間熱処理を行った試料について評価している。その結果，600°Cまでは熱処理温度の上昇に伴い$Ca(OH)_2$から$CaCO_3$への相変換速度が高まり強度が向上すること，700°C以上の熱処理を行うと熱分解反応が生じ強度が低下すること，$Ca(OH)_2$圧粉体の成形圧を高くすると強度は向上するが粒子間隙が密になるために炭酸ガスが圧粉体内部まで行き渡らず炭酸化が生じにくいこと等を明らかにしている。以上の結果から，0.2 MPaで作製した$Ca(OH)_2$圧粉体を炭酸ガス雰囲気にて600°Cで1時間処理することによって単相$CaCO_3$前駆体が得られることを見出している。

$CaCO_3$前駆体のリン酸化については，1 $mol \cdot L^{-1}$ Na_2HPO_4溶液中において200°Cで24時間水熱処理を施した試料について組成変換の状況を調査している。$Ca(OH)_2$圧粉体の成形圧が高い場合は，これを炭酸化して得られる$CaCO_3$成形体の粒子間隙が密になるために，リン酸イオンが圧粉体内部まで行き渡らず，リン酸化が生じにくいこと等を明らかにしている。以上の結果から，得られた$CaCO_3$前駆体を200°Cで24時間水熱処理を施すことで，CO_3Ap成形体が得られることを見出している。

ラット骨髄細胞を用いて$CaCO_3$およびCO_3Ap成形体の初期細胞接着および細胞増殖が調査されており，本法を用いて作製した試料は，市販の焼結ハイドロキシアパタイト及び従来法で作製した$CaCO_3$やCO_3Ap成形体と比べて同等もしくは有意に高い値を示すことを明らかにしている。

本研究で得られた知見は今後の骨置換性材料の開発および関連学術領域の発展に寄与するものであり，本論文は学位論文としての価値があるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ラスリン RUSLIN　　(インドネシア)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	歯博甲第５３８号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Effects of Apatite Crystals Addition Method on Basic Properties of Alpha-Tricalcium Phosphate Based Apatite Cement（αーリン酸三カルシウム型アパタイトセメントの基礎的性質に及ぼすアパタイト結晶の添加方法の影響）
論文調査委員	(主　査)　教　授　古谷野　潔 (副　査)　教　授　森　悦秀　　教　授　久木田　敏　夫

論　文　内　容　の　要　旨

Effects of added apatite seed crystals on setting reaction and mechanical strength of Alpha-tricalcium phosphate (α-TCP) based apatite cement (AC) were studied using two ACs. Both ACs consist of α-TCP and calcium deficient hydroxyapatite (cdHAp). The first AC is called apatite cement (external additon) (AC(EA)) consist of α-TCP and cdHAp was externally added into α-TCP powder. *The second AC* is called apatite cement (partial hydrolysis) (AC(PH)) also consist of α-TCP and cdHAp. In this AC, α-TCP was partially hydrolyzed to form cdHAp on the surface of α-TCP.

Setting time of both ACs became shorter with amount of added cdHAp. When amount of cdHAp was the same (70 wt%), AC(PH) showed shorter setting time, from 168 min to 9 min. Whereas, the setting time of the AC (EA) shortened from 168 min to 14 min. This was thought to be caused by the selective crystal growth of cdHAp on the surface of α-TCP particles. Mechanical strength of the set AC was higher in the case of AC (PH) when compared to AC (EA). This was also thought to be caused by the selective crystal growth of cdHAp on the surface of α-TCP particles. The seed effect was more remarkable when cdHAp was formed on the surface of α-TCP based on the partial hydrolysis. This is reasonable since the Ca^{2+} and HPO_4^{2-} is supplied from the surface of α-TCP powder. Degree of the supersaturation should be higher at the surface of α-TCP when compared to area apart from the surface of α-TCP particle. Furthermore, precipitation of cdHAp on the seed cdHAp or growing cdHAp occures rapidly if cdHAp is present on the surface of α-TCP particle.

We concluded therefore, partial hydrolysis of α-TCP is a better method to add low crystalline cdHAp into α-TCP based AC.

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

優れた組織親和性を示すアパタイトセメント（AC）は硬組織欠損治療において有用な新規骨再建材料である。AC の有用性はその硬化性に起因しており，硬化機構の解明や硬化時間制御法の開発は高機能性 AC の開発において重要である。AC の硬化時間制御法の一つの手法として，アパタイト結晶を種結晶として AC に添加する方法がリン酸四カルシウムとリン酸水素カルシウムを組成とする AC で報告されている。

本研究ではα型リン酸カルシウム（α-TCP）を組成とする AC は一成分系であるため硬化機構の解明が容易であること，加水分解反応によってα-TCP 表面にアパタイト結晶を導入することが可能であることに着目し，α-TCP を組成とする AC へのアパタイト結晶の導入や導入部位が AC の硬化反応に及ぼす影響を検討している。

AC の組成であるα-TCP 表面への低結晶性アパタイトの導入は，α-TCP 粒子を水中で部分的に加水分解させて行っている。この新規手法（AC(PH)）の有効性を検討するために，対照として外部からアパタイト種結晶を添加する方法（AC(EA)）についても検討し，硬化時間，硬化体の機械的強さ，アパタイトへの相転換挙動を比較・検討している。

AC(PH)および AC(EA)のいずれの手法を用いても，アパタイト種結晶の導入量が増加するに従い硬化時間が短くなり，アパタイト種結晶の導入量が 70 wt%の時，AC(PH)の硬化時間は 9 分，AC(EA)の硬化時間は 14 分と，未添加の硬化時間（168 分）に比べて劇的に短くなったと報告している。また，硬化体の機械的強さは AC(EA)より AC(PH)の方が高くなったと報告している。これらは，AC(PH)において，アパタイトの種結晶がα-TCP 粒子の表面に存在することで，

粒子表面において選択的にアパタイトの結晶成長が生じたことに起因すると考察している。また，アパタイトの硬化は溶解ー析出機構に基づいており，α-TCP の溶解により供給された Ca^{2+} と HPO_4^{2-} がアパタイトに対する過飽和度を上昇させ，アパタイトの針状結晶を析出させるとともに結晶同士の絡み合いによって硬化しているとしている。AC(PH)ではアパタイト種結晶がα-TCP 表面に存在するため，α-TCP から供給される Ca^{2+} と HPO_4^{2-} によって，容易に且つ表面で優先的にアパタイトの結晶成長を促すことができたことが，AC(EA)と比べて短い硬化時間，高い機械的強度，スピーディーなアパタイトへの相転換に繋がったと考察している。

本研究で得られた知見は AC の臨床応用や関連学術領域の発展に大きく寄与するものであり，本論文は学位論文としての価値あるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	うしじま　かん 牛島　寛（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５３９号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**逆根管窩洞形成へのEr:YAGレーザー応用に関する研究**
論文調査委員	（主　査）教授　石川邦夫 （副　査）教授　前田勝正　　教授　野中和明

論　文　内　容　の　要　旨

難治性根尖性歯周炎などの症例において，通常の根管を経由した根管治療が奏功しない場合，抜歯を選択する前の歯を保存する最後の手段として，各種の外科的歯内療法が試みられる．このうち，根尖切除術においては歯根尖部を切断・除去した後に，根管のスペースを緊密に封鎖する目的で，逆根管窩洞形成と逆根管充填が併用されることが多い．今日では，従来からのバーによる方法に代わって，超音波装置を用いた逆根管窩洞形成法が主流となっているが，歯根に亀裂を生じるなどの問題点を指摘する報告もみられる．

そこで，本研究では超音波法に代わる新しい手法として，硬組織切削が可能で周囲組織への熱による影響の少ないEr:YAG レーザーを用いる方法の有用性を探る目的で，ヒト抜去歯を対象に実験を行った．レーザー法では，先端形状の異なる円錐型チップ（グループ A）と平坦型チップ（グループ B）を用いた．コントロールとして，レトロチップを装着した超音波装置（グループ C）を使用した．窩洞形成後の超微構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ，グループ A において窩壁に凹凸不整な鱗状構造および象牙細管の開口を認めた．従って，レーザー光は窩壁を満遍なく蒸散すると考えられた．一方，グループ B では窩縁付近にはレーザーの蒸散痕が認められたが，窩壁の大部分には厚いスミヤー層が残存することが分かった．グループ C の窩壁には閉塞した象牙細管と開口した象牙細管が混在して観察された．また，このグループに特徴的な所見として，窩縁にチッピングが認められた．次に，各グループの窩洞に逆根管充填材として mineral trioxide aggregate (MTA) を充填した場合の辺縁封鎖性を探る目的で，色素漏洩試験を行った．７日毎に測定を繰り返したところ漏洩量は経日的に増加し，35 日目までの観察において最も漏洩量が少なかったのはグループ A

であった．グループA・B間（$p<0.01$）およびグループB・C間（$p<0.05$）には有意差を認めた．以上の結果から，各グループにおける窩壁に残存するスミヤー層の量が逆根管充填窩洞の辺縁封鎖性に影響を及ぼすと推察された．さらに，レーザー法では光の照射方向の違いがスミヤー層の残存量に関連することから，円錐型チップは平坦型チップに比べて逆根管窩洞形成に適した形状であると判断された．

本研究より，根尖切除術に併用される新しい逆根管窩洞形成法として，Er:YAGレーザーの臨床応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

外科的歯内療法の１つである歯根尖切除法においては、根尖部の切断・除去後に逆根管窩洞形成を行い、逆根管充填を併用することが多いが、超音波による窩洞形成では歯根に亀裂を生じる危険性が明らかになっている。このため、逆根管窩洞形成の新たな手法として、レーザーを応用する可能性が考えられる。本研究では、２種類の異なる先端形状の石英ファイバーチップを装着したEr:YAGレーザーおよび超音波による逆根管窩洞形成後の超微形態学的観察とmineral trioxide aggregate (MTA)を用いた逆根管充填後の色素浸透性試験による封鎖性評価を行い、各窩洞形成法の影響を比較検討している。

ヒト抜去歯を対象に実験を行っており、レーザー法では円錐型チップと平坦型チップを用いている。コントロールとして、レトロチップを装着した超音波装置を使用している。窩洞形成後の超微構造を走査型電子顕微鏡で観察した結果、円錐型チップ群において窩壁に凹凸不整な鱗状構造および象牙細管の開口を認めている。一方、平坦型チップ群では窩縁付近にはレーザーの蒸散痕が認められるが、窩壁の大部分には厚いスミヤー層が残存することを示している。また、超音波群の窩壁には閉塞した象牙細管と開口した象牙細管が混在して観察されることを明らかにしている。次に、各群の窩洞に逆根管充填材としてMTAを充填した場合の辺縁封鎖性を色素浸透性試験で解析した結果、35日目で最も漏洩量が少ないのは円錐型チップ群であり、この群と平坦型チップ群の間（$p<0.01$）および超音波群と平坦型チップ群の間（$p<0.05$）には有意差があることを見出している。

上述の結果から、本論文提出者は、窩壁に残存するスミヤー層の量が逆根管窩洞の封鎖性に影響を及ぼす可能性があり、円錐型チップは逆根管窩洞形成に適した形状であると結論している。

論文調査委員は、本研究で得られた知見が、歯根尖切除法に併用される新しい逆根管窩洞形成法として、Er:YAGレーザーの臨床応用に道をひらくのに役立つと判断した。よって、本論文は学位論文としての価値があるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	こう の きよ み 河 野 清 美 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５４０号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	basic fibroblast growth factor (bFGF) 刺激後のtransforming growth factor-beta1 (TGF β1) による連続刺激がヒト歯根膜幹細胞株の線維芽細胞様分化に及ぼす影響について
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教 授　坂 井 英 隆 (副　査) 教 授　前 田 勝 正　　教 授　久木田 敏 夫

論　文　内　容　の　要　旨

bFGF は、歯周組織の再生を促進するサイトカインとして臨床試験が行われているが、bFGF によって、喪失した歯根膜組織の全てが回復するわけではない。発表者は最近、TGFβ1 が、当研究室において樹立したヒト歯根膜幹細胞クローン株 (1-11 細胞株) の線維芽細胞様分化を促進する可能性について報告した。そこで本研究では、bFGF 刺激後の TGFβ1 による連続刺激を行い、歯根膜幹細胞の線維芽細胞様分化に及ぼす影響について検討した。細胞は、1-11 細胞株に加えて分化段階の異なる 1-17 細胞株を用いて、Alpha-smooth muscle actin (α-SMA)、Type I collagen (COL I)、Type III collagen (COL III) ならびに Fibrillin1 (FBN1) の遺伝子発現の変化を、bFGF による単独刺激を行った場合と比較し解析を行った。

bFGF は、両細胞株における α-SMA、COL I、COL III および FBN1 mRNA の発現を抑制したが、Vascular endothelial growth factor (VEGF) の遺伝子発現およびタンパク発現ならびに 1-17 細胞株の細胞増殖を促進した。bFGF 刺激後の TGFβ1 による連続刺激は、無刺激群および bFGF 単独刺激群と比較して、1-11 および 1-17 細胞株における α-SMA および COL I の遺伝子発現を有意に促進した。

今回の結果から、bFGF は、歯根膜幹細胞の増殖および VEGF 産生を介した血管新生を促進し、また bFGF 刺激後の TGFβ1 による連続刺激は、その線維芽細胞様分化をより効果的に誘導することによって、歯周組織再生を促す可能性があることが示唆された。また今回、分化段階の異なる細胞株を用いたが、いずれもほぼ同様の反応を示したことから、連続刺激が歯根膜幹細胞の線維芽細胞様分化を促進する働きを有することが示唆された。

以上より、bFGF は歯根膜幹細胞における細胞増殖および VEGF の発現を誘導するが、α-SMA、COL I、COL III および FBN1 の遺伝子発現を抑制し、bFGF 刺激後の TGFβ1 による連続刺激は、bFGF 単独刺激よりも α-SMA および COL I の遺伝子発現を促進することが明らかになった。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

歯周組織再生医療への利用が期待されている basic fibroblast growth factor (bFGF) ならびに transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1) の歯根膜由来細胞の増殖と分化に対する影響について分化のレベルが異なるヒト歯根膜由来細胞株の 1-11 と 1-17 を用いて検討し、以下のような結果を得た。

1. ラット歯根膜組織における免疫組織化学染色により、bFGF ならびに TGF β 1 が歯根膜細胞に陽性像を示した。またヒト抜歯牙の歯根膜組織より採取した細胞にも免疫細胞化学的染色に陽性像を示し、歯根膜細胞に両因子が発現している事を確認した。
2. 1-11 と 1-17 の両細胞は FGF レセプター1 および TGF β レセプター1 および-2 を発現していた。

3. bFGF 刺激により、1-17 細胞は有意に促進した。
4. bFGF 刺激により、両細胞株における Alpha-smooth muscle actin (α-SMA)、Type I collagen (COL I)、Type III collagen (COL III) ならびに Fibrillin1 (FBN1)の発現を抑制し、Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を促進した。
5. bFGF 刺激後に TGFβ1 による連続刺激を加えた場合には、無刺激群および bFGF 単独刺激群と比較して、1-11 および 1-17 細胞株における α-SMA および COL I の遺伝子発現を有意に促進した。
6. 以上の結果から、bFGF は歯根膜細胞の増殖に関連するとともに、VEGFh の発現を促進することにより歯根膜における血管新生に関与している事が示唆された。また TGFβ1 は歯根膜細胞の分化に関連している事が明らかとなった。したがって歯根膜再生医療には両因子の適切な応用が必要である可能性が示唆された。

本研究の成果は、サイトカインの適用による歯周組織再生医療に新たな知見を示した成果であり、学位に相当する業績と判断された。

氏名・(本籍・国籍)	くすはらようこ **楠原庸子** (鹿児島県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	歯博甲第５４１号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**マウスのうま味受容におけるT1R1受容体の役割**
論文調査委員	(主　査) 教　授　平田雅人
	(副　査) 教　授　中西　博　教　授　山下喜久

論　文　内　容　の　要　旨

うま味は monosodium L-glutamate (MSG)などのアミノ酸で生じる五基本味のひとつであり、inosine-5'-monophosphate (IMP)などの核酸を添加することで味が増強される相乗効果を特徴としている。G タンパク質共役型受容体である T1R1 は T1R3 と二量体を形成する(T1R1＋T1R3)ことでうま味を受容しており、さらに T1R1 がうま味の特徴である相乗効果に関与していることが明らかにされている。

過去に、T1R3 を遺伝的に欠損させた(T1R3-KO)マウスにおいて、鼓索神経(CT)のうま味と甘味に対する応答が、野生型マウス(WT)と比べ大きく減少したという報告がある。この結果は、T1R1＋T1R3 がうま味の主要な受容体であることを示すと同時に、残存する応答には、味細胞に発現すると報告されている代謝型グルタミン酸受容体(mGluRs)など、T1Rs 以外のうま味受容体候補分子も機能する可能性を示唆している。しかし T1R3 は甘味受容体(T1R2 ＋ T1R3)のコンポーネントでもあり、甘味とうま味の両方に関与することから、うま味独自の受容機構の検索には T1R3-KO マウスを用いた解析のみでは不十分であり、T1R1 の欠損系マウスを用いた解析が必要である。また、過去の報告は、行動・神経応答のみの解析に基づいており、うま味受容の詳細な検討には味細胞レベルでの解析も不可欠である。

そこで本研究では、*Tas1r1* 遺伝子の全コーディング領域を赤色蛍光タンパク質 mCherry の遺伝子で置換することで T1R1 発現細胞を標識したマウスを作製し、mCherry をホモで持つ T1R1-KO マウ

スおよびヘテロで持つ control マウスを用いて、味細胞から行動に至る各レベルで味応答変化を解析し、次の結果を得た。

(1) T1R1-KO マウスにおける MSG 応答は、CT 応答では control マウスと比べて有意に小さいものの残存したが、舌咽神経(GL)応答では control マウスとの有意な差は見られなかった。CT、GL における MSG 応答は mGluR 阻害剤の添加によって有意に減少した。行動応答においては、control 、T1R1-KO マウスともに MSG への条件付け味覚嫌悪学習が成立し、さらに MSG を他の基本味と識別した。これら条件付け味覚嫌悪学習が成立したマウスに mGluR 阻害剤を添加した MSG を与えると、阻害剤の濃度依存的にリック数が増加した。

(2) control マウスの茸状乳頭における T1R1 標識味細胞は、MSG に応答を示し、IMP 添加による相乗効果も観察された。また多くの T1R1 標識細胞は甘味刺激にも応答した。茸状乳頭 *T1R1* 標識細胞の分子発現を single cell RT-PCR にて調べたところ、一部の細胞は T1R1、T1R2、T1R3 を同時に発現していた。この結果から、うま味受容体 T1R1 + T1R3、甘味受容体 T1R2 + T1R3 が一つの細胞に同時に発現している可能性が示唆された。一方 T1R1-KO マウスの mCherry 発現細胞は甘味に応答した。このように甘味に応答する T1R1-KO マウスの mCherry 発現細胞の割合は、control マウスの味細胞に比べて小さかった。CT 応答においては、control マウスで見られた MSG と IMP との相乗効果は T1R1-KO マウスで消失しており、さらに甘味の応答も減少していた。これらの結果は、T1R1 発現細胞はうま味の相乗効果と甘味受容に関与するという味細胞応答解析による結果と一致し、甘味応答の減少は T1R1-KO マウスでの応答する味細胞の減少が関与していると考えられる。

以上の結果から、T1R1 発現細胞はうま味の相乗効果と甘味受容に関与すること、mGluRs がうま味の受容・弁別に関与することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

うま味は monosodium L-glutamate (MSG) などのアミノ酸で生じる五基本味のひとつであり、*inosine 5'-monophosphate* などの核酸を添加することで増強される相乗効果を特徴としている。G タンパク質共役型受容体である T1R1 と T1R3 が二量体を形成してうま味を受容することが明らかにされている。過去に、T1R3 を遺伝的に欠損させた (T1R3-KO) マウスにおいて、鼓索神経 (CT) のうま味と甘味に対する応答が、野生型マウス (WT) に比し大きく減少したものの完全にはなくならなかったという報告がある。この結果は、T1R1+T1R3 がうま味の主要な受容体であることを示すと共に、残存する応答には、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) など、T1R 以外のうま味受容体候補分子も機能する可能性を示唆している。しかし T1R3 は甘味受容体 (T1R2+T1R3) のコンポーネントでもあるのでうま味独自の受容機構の検索には T1R3-KO マウスのみによる検討では不十分であり、T1R1 の欠損系マウスを用いた解析が必要である。

そこで本研究では、*Tas1r1* 遺伝子のコーディング領域を赤色蛍光タンパク質 mCherry の遺伝子で置換して T1R1 発現細胞を蛍光標識した T1R1-KO マウスを作出し、mCherry をホモで持つ T1R1-KO (KO) マウスおよびヘテロマウス (control) を用いて、味受容から行動に至る各レベルで味応答変化を解析し、次の結果を得た。(1) control マウスにおける T1R1 標識細胞の MSG 応答は、IMP 添加による相乗効果を示し、さらに甘味にも応答した。T1R1-KO マウスでは応答ならびに相乗効果が減弱化した。この味細胞の種々の分子発現を遺伝子増幅反応により調べたところ、T1R1、T1R2、T1R3 遺伝子を発現しており、うま味受容体 T1R1+T1R3 と甘味受容体 T1R2+T1R3 が一つの細胞発現している可能性が示唆された。CT 応答においても、MSG と IMP との相乗効果が T1R1-KO では消失しており、さらに甘味の応答も減少していた。これらの結果は、T1R1 発現細胞はうま味の相乗効果と甘味受容に関与するという味細胞の応答解析の結果と一致した。(2) T1R1-KO マウスにおける MSG 応答は、CT 応答では control マウスと比べて有意に小さいものの残存したが、舌咽神経 (GL) 応答では control との有意差は認められなかった。CT、GL 応答における MSG 応答は mGluR 阻害剤の添加によって有意に減少した。行動反応においては、control、T1R1-KO マウスともに MSG への条件付け味覚嫌悪学習が成立し、さらに MSG を他の基本味と識別した。これら条件付け味覚嫌悪学習が成立したマウスにおいて MSG に mGluR 阻害剤を添加すると、濃度依存的にリック数が増加した。以上の結果から、(1) T1R1 発現細胞はうま味受容と相乗効果ならびに甘味受容に関与すること、(2) mGluR もうま味の受容・弁別に関与することが示唆された。本研究は、うま味の受容機構について新知見を加えたものであり、学位論文として十分に価値のあるものである。

氏名・(本籍・国籍)	こばやし まり 小 林 茉 莉 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５４２号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**抗Dkk1抗体は、Wnt/β－カテニンシグナル伝達経路を介してアルカリフォスファターゼの発現を促進する**
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教　授　久木田　敏　夫 (副　査) 教　授　赤　峰　昭　文　　教　授　髙　橋　一　郎

論　文　内　容　の　要　旨

Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化に重要なシグナルである。Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の阻害分子の１つに、Dickkopf1 (Dkk1) がある。Dkk1 の発現が減少すると、骨量が増加することが報告されている。Dkk1 の中和抗体である抗 Dkk1 抗体が、骨芽細胞の数を増加させると同時に、破骨細胞の数を減少させることで多発性骨髄腫などの溶骨性の骨病変の治療に効果的であると前臨床試験において示されている。しかしながら、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の分化や遺伝子の発現に及ぼす影響については明らかとなっていない。そこで、本研究では、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞および SaOS-2 細胞を用いて、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の分化および骨形成に及ぼす影響について、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現への影響について、さらにラット脛骨に作製した骨欠損部においての抗 Dkk1 抗体の効果について検討した。

抗 Dkk1 抗体は、骨芽細胞の増殖には影響しなかったが、ALP の活性、ALP の mRNA・タンパク質の発現を増加させた。ALP と同じく骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシン (OCN)、runt-related transcription factor 2 (Runx2) も、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子に含まれているが、抗 Dkk1 抗体は、OCN、Runx2 の発現も増加させた。さらに、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞の石灰化を促進させた。また、抗 Dkk1 抗体は、β-カテニンの発現、T-cell-specific transcriptional factor 7-like 2 (TCF7L2) の発現、TCF 転写活性を増加させた。このことから、抗 Dkk1 抗体の添加により、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路が促進されることが示唆された。さらに、抗 Dkk1 抗体は T-cell factor (TCF) 結合部位を介して ALP プロモーター活性を増加させ、ALP の発現を増加させることが明らかとなった。次に、Dkk1 siRNA を導入して Dkk1 の発現を抑制した。Dkk1 siRNA は、抗 Dkk1 抗体と同様、コントロール群の ALP プロモーター活性を増加させた。Dkk1 siRNA とともに抗 Dkk1 抗体を作用させても、さらなる ALP プロモーター活性の増加は認められなかった。以上の結果から、骨芽細胞分化において、Dkk1 の阻害は、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を促進し、ALP の発現を増加させること、また、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を介した ALP の発現は、Dkk1 によって抑制され、骨量の恒常性が維持されていることが明らかとなった。

さらに、ラット脛骨に作製した骨欠損部において、局所投与した抗 Dkk1 抗体が、新生骨の形成を促進させたことから、抗 Dkk1 抗体の骨形成への効果が確認された。したがって、抗 Dkk1 抗体は、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の活性化薬、すなわち骨再生薬としての可能性が示唆された。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化に重要なシグナルである。Dickkopf1 (Dkk1)はこのシグナルを阻害するが、Dkk1 の発現が減少すると、骨量が増加することが報告されている。本研究では、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株である MC 3T3-E1 を用いて、Dkk1

の中和抗体である抗Dkk1抗体が骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討した。抗Dkk1抗体は、骨芽細胞の増殖には影響を与えなかったが、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）の活性、ALP の mRNA 及びタンパク質の発現を亢進した。抗 Dkk1 抗体はその他の骨芽細胞の分化マーカー（オステオカルシン、Runx2）の発現も促進した。さらに、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞の石灰化を亢進した。また、抗 Dkk1 抗体はβカテニンの発現、T-cell factor (TCF)転写活性、TCF7L2（TCF-4）の発現を増加させたことから、抗 Dkk1 抗体は骨芽細胞における Wnt/β-カテニンシグナル伝達を促進することが示唆された。さらに、TCF 結合部位含む ALP レポータープラスミドを用いて、抗 Dkk1 抗体が ALP 遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響について検討したところ、抗 Dkk1 抗体は ALP プロモーター活性を増加させた。また、Dkk1 の siRNA を導入したところ、コントロール群の ALP プロモーター活性は増加し、抗 Dkk1 抗体による ALP プロモーター活性の増加は抑制された。更に、抗 Dkk1 抗体の生体への効果について、ラット脛骨・骨欠損モデルを用いて検討し、抗 Dkk1 抗体が新生骨の造成を促進することを明らかにした。

以上の結果から、骨芽細胞分化において、抗 Dkk1 抗体は、Wnt/β-カテニンシグナル伝達を促進し、TCF 結合部位を介した ALP のプロモーター活性を増加させること、また、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を介した ALP の発現は、Dkk1 によって抑制され、恒常が維持されていることが明らかとなった。本研究は学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	くらた　あやこ **倉　田　絢　子**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５４３号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* のnatural competence に関わる因子についての研究
論文調査委員	（主　査）教　授　山　下　喜　久 （副　査）教　授　赤　峰　昭　文　　教　授　中　村　誠　司

論　文　内　容　の　要　旨

本研究では歯周病原細菌である *A. actinomycetemcomitans* の natural competence に関わる因子である遺伝子及び構成成分を解明した。

natural competence とは、細菌が菌体外の DNA を細胞内に取り込み、遺伝子組換えをおこすことである。*A. actinomycetemcomitans* はnatural competence 種のひとつであり、その能力を持つ（陽性）株と持たない（陰性）株があるとの報告がある。natural competence 陽性と陰性の株間で、環境対応力や生存力に差があることが予想でき、その結果病原性にも差があることが推測される。しかし、natural competence 関連因子が十分には解明されていない為、これまでに病原性と natural competence の関連を示した報告はない。そこで本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の natural competence 関連因子を追究することを目的とした。

遺伝子についての研究では、これまでに報告のない natural competence に関与する遺伝子（*urpA*: 本研究にて命名）を同定した。*A. actinomycetemcomitans* の natural competence 陽性の株において、

線毛遺伝子群の上流に位置する未同定の遺伝子群について様々な遺伝子変異株を作製し、その natural competence の効率を比較したところ、*urpA* 欠損株は natural competence 陰性となった。さらに、*urpA* をコンプリメンテーションしたところ、natural competence 陽性になった。また、*urpA* 欠損株は野生株に比べて aggregation 率が高くなった。よって、*urpA* は *A. actinomycetemcomitans* の細胞表面構造に関わり、また natural competence の過程における細胞表面での DNA の取り込みシステムに関わる遺伝子であることが示唆された。

構成成分での研究では、菌体由来ベジクルが natural competence に影響を及ぼしていることを明らかにした。レシピエント細胞を Tris-HCl 緩衝液で処理すると natural competence の効率が低くなったことに注目し、Tris-HCl 処理上清中の成分を調べたところ菌体由来のベジクルの存在が認められた。よって、*A. actinomycetemcomitans* の菌体由来のベジクルは natural competence を促進させることが示唆された。

以上より、*A. actinomycetemcomitans* の natural competence には遺伝子では *urpA* が必要であり、構成成分では菌体由来のベジクルが DNA の取り込みに促進的に働くことが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は歯周病原性細菌である *A. actinomycetemcomitans* の natural competence に関わる遺伝子及び構成成分の解明を目指したものである。competence とは、細菌が菌体外の DNA を細胞内に取り込み、形質転換を起こす能力である。*A. actinomycetemcomitans* は natural competence を有する種であり、その能力を持つ（陽性）株と持たない（陰性）株があるとの報告がある。natural competence 陽性と陰性の株間で、環境対応力や生存力に差があることが予想でき、その結果病原性にも差があることが推測される。しかし、natural competence 関連因子が十分には解明されていないため、本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の natural competence 関連因子を追究することを目的としている。第１章では、学位申請者は *A. actinomycetemcomitans* の natural competence 陽性の株において、様々な遺伝子変異株を作製し、その natural competence の効率を比較したところ、*urpA* 欠損株は natural competence が陰性となった。また、*urpA* 欠損株は野生株に比べて aggregation 率が高くなっており、さらに *urpA* 遺伝子を欠損させると形質転換に遺伝子組み換えを必要としないプラスミドの取り込みも低下していた。これらのことから、*urpA* は *A. actinomycetemcomitans* の natural competence の過程において細胞表層での DNA の取り込みシステムに関与する遺伝子であると考えられる。第２章では、様々な濃度の陽イオンを含む Tris-HCl 緩衝液で菌体を洗浄して natural competence 効率に与える影響を比較している。その結果、陽イオンを含まない緩衝液でベジクル様構造物を遊離させると、natural competence の効率が低下したことから、菌体表層の構造物が natural competence に関与している可能性を示している。また、菌体表層の構造物が２価の陽イオンを含む緩衝液では回収できないことから、この構造物が２価の陽イオンを介して付着している可能性を示唆している。

以上より、*A. actinomycetemcomitans* の natural competence には *urpA* 遺伝子が関与しており、さらに菌体表層に付着しているベジクル様構造物が DNA の取り込みに促進的に働く可能性が示唆された。本研究は *A. actinomycetemcomitans* の歯周病原性獲得メカニズムを考える上で興味深い知見を与えていることから博士（歯学）の学位の授与に値すると判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ひら つか しゅんじ 平 塚 俊 志 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５４４号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	S1PはPI3K/Akt/GSK-3β及びWnt/β-カテニンシグナル伝達経路を介してOPG遺伝子発現・骨芽細胞分化を促進する
論 文 調 査 委 員	(主　査)　教　授　中　西　　博 (副　査)　教　授　平　田　雅　人　　教　授　久木田　敏　夫

論　文　内　容　の　要　旨

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、主に血漿中に存在する脂質メディエーターで、血管内皮細胞、リンパ球を始め様々な細胞に対して、増殖、運動、形態調節、分化など多彩な作用を及ぼし、シグナル分子としても注目されている。

骨組織は、骨芽細胞による骨新生と破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が維持されている。近年、S1P が破骨細胞の分化を抑制することが示されたが、S1P が骨芽細胞の分化や骨形成に及ぼす影響については解明されていない。そこで、本研究では、S1P が骨芽細胞の分化及び OPG 遺伝子発現に及ぼす影響と、そのシグナル伝達経路として、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt/ glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) と、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路との関連について検討した。

実験には、ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 とマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。SaOS-2、MC3T3-E1 細胞ともに $S1P_1$～$S1P_5$ の全ての S1P 受容体を発現していた。Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であり、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングに重要な osteoprotegerin (OPG) 、receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) の発現に対して、S1P は、OPG の mRNA、タンパク質の発現を増加させ、RANKL の mRNA 発現を減少させた。S1P は、Akt のリン酸化を促進させ、GSK-3β のリン酸化を阻害した。PI3K の特異的阻害薬である LY294002 は、その作用を阻害したことから、S1P は PI3K/Akt/GSK-3β を介したシグナル伝達作用を持つことを確認した。また、OPG タンパク質発現は、LY294002 の添加により減少した。一方、GSK-3β の特異的阻害薬 SB2167632 の添加により、OPG タンパク質発現は増加した。LY294002 及び SB2167632 の添加により、OPG のタンパク質発現は増加した。以上の結果から、S1P による Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子 OPG 発現の増加には、PI3K/Akt/GSK-3β が関与することが示唆された。次に、S1P が Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響についてさらに検討を行った。S1P は、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路における転写因子である TCF の転写活性ならびに TCF7L2 (TCF4) のタンパク質発現を増加させた。一方、LY294002 は、TCF7L2 のタンパク質発現を減少させた。以上の結果から、S1P は PI3K/Akt/GSK-3β を介して Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を活性化させ、OPG の遺伝子発現を増加させる可能性が示唆された。

また、S1P が骨芽細胞分化に及ぼす影響についても検討した。S1P は、細胞増殖には影響を与えなかったが、骨芽細胞分化のマーカーであり、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子でもあるアルカリフォスファターゼの活性を増加させた。さらに、S1P が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、von Kossa 染色、アリザリンレッド染色を行い検討したところ、S1P は石灰化を促進させた。すなわち、S1P は骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。

この研究は、S1P が、PI3K/Akt/GSK-3β 及び Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を介して、骨芽細

胞におけるOPG 遺伝子発現を増加させること、及びS1Pが骨芽細胞の分化を促進させることを示した初めての報告である。

論文審査の結果の要旨

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は主に血漿中に存在する脂質メディエーターで、血管内皮、リンパ球を始め様々な細胞に対して、増殖、運動・形態調節、分化など多彩な作用を及ぼし、シグナル分子としても注目されている。一方、骨組織は「骨芽細胞による骨新生」と「破骨細胞による骨吸収」のバランスによって恒常性が維持されている。近年、S1P が破骨細胞の分化を抑制することが示されたが、S1P が骨芽細胞に及ぼす影響については解明されていない。そこで、本研究では、S1P が骨芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

実験にはヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 とマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。SaOS-2、MC3T3-E1 細胞ともに $S1P_1$〜$S1P_5$ の全ての S1P 受容体を発現していた。骨芽細胞に発現が多かった $S1P_1$ 受容体は、Gi と共役するが、その下流のシグナルとしては PI3K/Akt/GSK-3βが知られている。一方、GSK-3βの活性阻害は、骨芽細胞分化・遺伝子発現に重要な Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を活性化することから、「S1P が GSK-3βを介して Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路に作用し、骨芽細胞における遺伝子発現に影響を及ぼす」という仮説をたて、さらに以下の実験を行った。

S1P は、Akt のリン酸化を促進し、GSK-3βの活性を阻害した。また、S1P は Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路における転写因子である TCF の転写活性を増加させた。一方、PI3 の特異的阻害薬である LY294002 は、TCF4 のタンパク質発現を減少させ、さらに、このシグナルの標的遺伝子であり、骨芽細胞、破骨細胞のカップリングに重要な osteoprotegerin (OPG)、receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)の mRNA 発現に対して、S1P は OPG の発現を増加させ、RANKL の発現を減少させることが明らかとなった。以上の結果から、S1P は PI3K/Akt/GSK-3βを介して Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を活性化させ、OPG、RANKL の遺伝子発現を調節することが明らかとなった。

また、S1P が骨芽細胞分化に及ぼす影響についても検討した。S1P は、細胞増殖に影響を与えなかったが、骨芽細胞分化のマーカーであり、Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であるアルカリフォスファターゼの活性を増加させた。さらに、S1P が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、von Kossa 染色、アリザリンレッド染色を行い検討した結果、S1P は石灰化を促進することが認められた。即ち、S1P は骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。

以上、本研究は S1P と Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路との関連を示しており、歯周炎等の骨欠損に対する薬物治療において新たな展開につながることが期待できる。従って、本論文は学位論文に値するものと判断される。

氏名・(本籍・国籍)	すのうち　かず ひろ **須ノ内　一　広**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５４５号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Fabrication of Solid and Hollow Carbonate Apatite Microspheres as Bone Substitutes Using Calcite Microspheres as a Precursor（球状カルサイトを前駆体として用いた中実ならびに中空炭酸アパタイト球状骨置換材の創製）
論文調査委員	（主　査）教　授　古谷野　　潔 （副　査）教　授　森　　悦　秀　　教　授　久木田　敏　夫

論　文　内　容　の　要　旨

【緒言】当研究室ではこれまでに，ポリウレタンフォームをテンプレートとしたセラミックフォーム法によって，骨リモデリングサイクルに調和する炭酸アパタイト（CO_3Ap）を組成とした，三次元連通孔構造を有する骨補填材を創製した[1]。このCO_3Apフォームの気孔サイズや連通性は良好であるものの，98%近い気孔率のために臨床に耐えうる強度を持ち得なかった。気孔率を下げれば強度は増加するため，気孔率を低下させても連通気孔構造が維持可能な工夫が必要だと考えられる。直径が約 1mm 径の球状粒子を積層することによって得られる間隙は、理論的に気孔率は26%程度であるが，骨組織の侵入に適した気孔サイズと連通性を持つ。また，球状の骨補填材は欠損部位の大きさに加工する必要もなく良好な操作性が期待される。よって，本研究では中実ならびに中空構造を有した直径約 1mm の球状CO_3Apを調製することを目的とした。

【実験】水酸化カルシウム（$Ca(OH)_2$）圧粉体を炭酸化（CO_2，2L/min，25°C，2 週間，相対湿度 100%）した後，粉砕・分級し，直径300~500μm の calcite（$CaCO_3$）粒子を調製した。得られた$CaCO_3$コア粒子と$Ca(OH)_2$微粒子を造粒パン（傾斜角 40 度）に添加し，スプレーガンで水を噴霧しながらパンを回転（回転速度 40 rpm）させ，直径約 1mm の前駆体球状粒子を作製した。その後，炭酸化（CO_2，2L/min，25°C，2 週間，相対湿度 100%）およびリン酸化（1mol/L Na_2HPO_4，60°C，1 週間）を行い，中実のCO_3Ap球状粒子を調製した。一方，市販の塩化ナトリウム（NaCl）を分級し，300~500μm サイズの NaCl 粒子を得た。この NaCl 粒子をコアとして用い，前述と同様の方法で中空のCO_3Ap球状粒子を調製した。粉末 X 線回折法（XRD）により得られた球状粒子の結晶相を同定し，CHN 分析法とフーリエ変換赤外分光法（FT-IR）により炭酸含有量とCO_3イオンの置換サイトを調べた。走査型電子顕微鏡（SEM）により表面や割面の様子を観察した。

【結果と考察】炭酸化やリン酸化した後も球状粒子の外形は処理前とほぼ同等に保たれていた。炭酸化した後には calcite（$CaCO_3$）に，リン酸化した後にはCO_3Apに相変化したため，それぞれの表面形態に違いが見られた。最終球状粒子の割面を観察したところ，コアの周りに微粒子凝集層が形成されることで球状を成していた。NaCl をコアとして用いた場合，リン酸化の段階で NaCl 粒子が溶解し，CO_3Apの中空構造が形成されたと考えられる。得られたCO_3Ap球状粒子は中実体では 5.70%，中空体では 7.35%の炭酸イオンを含有しており，アパタイト構造中のリン酸イオンサイトに炭酸イオンが置換した，即ち B 型CO_3Apであることが分かった。ラットの脛骨に中空のCO_3Ap球状粒子を埋入し骨伝導性ならびに骨吸収性を調査した結果、優れた骨伝導性ならびに骨吸収性を示した。以上の結果より直径約 1mm 径のCO_3Ap球状粒子は骨置換材として大変有効であると結論付けた。

【参考文献】

1)　Wakae H, *et al*, J Biomed Mater Res A 2008; 87(4): 957-963.

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

本研究では，臨床に耐えうる強度と骨細胞の侵入に適したサイズの三次元連通孔構造を担保できる炭酸アパタイト（CO_3Ap）骨補填材の創製を目的としている。直径が約 1 mm 径の球状粒子を積層すれば骨組織の侵入に適した気孔サイズと連通性を持つ三次元構造体が得られると考え，本研究では中実ならびに中空構造を有した直径約 1 mm の球状CO_3Apの調製を検討している。

中実球状粒子の作製には炭酸カルシウム（$CaCO_3$）のコアを，中空球状粒子の作製には塩化ナトリウム（NaCl）のコアを用いている。コア粒子および水酸化カルシウム粉末を造粒パンに添加し，スプレーガンで水を噴霧しながらパンを回転（回転速度 40 rpm）させ，直径約 1 mm の球状前駆体粒子を調製している。得られた球状前駆体粒子に炭酸化処理（CO_2, 2 L/min, 25°C, 2 週間，相対湿度 100%）およびリン酸化処理（1 mol/L Na_2HPO_4, 60°C, 1 週間）を行うことで，中実および中空の CO_3Ap 球状粒子の作製を試みている。

炭酸化やリン酸化した後も球状粒子の外形は処理前とほぼ同等に維持されており，粉末 X 線回折法により炭酸化後は $CaCO_3$ に，リン酸化後は CO_3Ap に相変換する様子が観察されている。NaCl コアを用いた場合には，リン酸処理の段階で NaCl コアが溶解して中空構造が形成されることが明らかにされている。CHN 分析法とフーリエ変換赤外分光法により，得られた CO_3Ap 球状粒子は生体の歯や骨と同等の炭酸イオンを含有しており，アパタイト構造中のリン酸イオンサイトに炭酸イオンが置換した，即ち，B 型 CO_3Ap であることが明らかにされている。走査型電子顕微鏡により CO_3Ap 球状粒子の表面および割面を観察した結果，コアの周りに微粒子の凝集層が形成しており，NaCl コアは $CaCO_3$ コアより見かけ密度が高いため，圧接効果により微粒子の凝集性が高まり力学的強度が強くなったと考察している。中空の CO_3Ap 球状粒子をラットの脛骨に埋入し，組織学的評価によって優れた骨伝導性ならびに骨吸収性を明らかにしている。

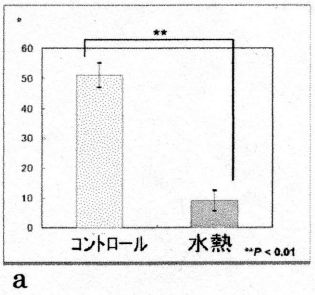
本研究で得られた知見は CO_3Ap 骨補填材の臨床応用や関連学術領域の発展に大きく寄与するものであり，本論文は学位論文としての価値あるものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	おおかわうち ひでゆき **大川内　秀　幸**（長崎県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５４６号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンによるチタン表面修飾が口腔上皮様細胞および線維芽細胞の接着性に与える影響**
論文調査委員	（主　査）教　授　寺田善博 （副　査）教　授　前田勝正　　教　授　石川邦夫

論　文　内　容　の　要　旨

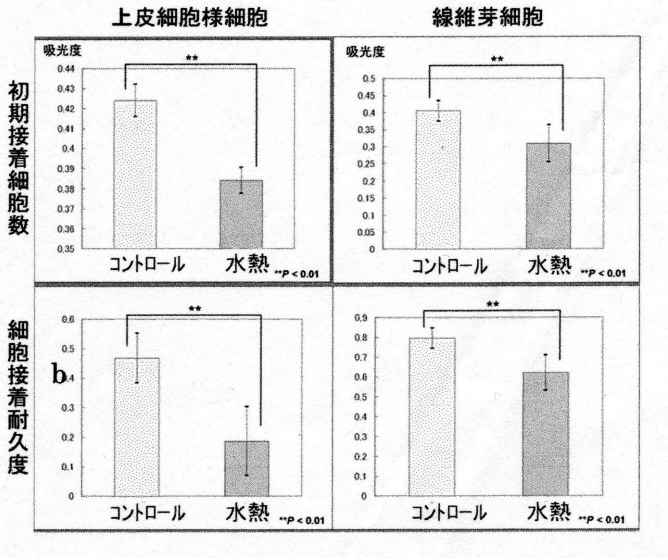
歯槽骨に植立されたインプラントは口腔粘膜を貫通して口腔内に露出しており、常に感染のリスクにさらされている。インプラント周囲軟組織とインプラントの接着性は歯周軟組織と天然歯のそれと比べると弱いため、これを改善することができればインプラント周囲軟組織の封鎖性の向上に貢献できる可能性がある。

骨芽細胞においては、種々の方法によってチタン表面に超親水性を付与すると骨芽細胞接着性や骨接触率が向上することが報告されている。そのため本研究では、まず水熱処理を用いて付与した超親水性表面における軟組織細胞の接着性について検討した。



a

水熱処理は過去に骨芽細胞の接着性における研究で報告されている方法で行った。直径 15mm のチタンプレートを蒸留水により水熱処理した試験群と、未処理のコントロール群を比較すると、試験群のみが超親水性を有していることが明らかとなった（グラフ a)。次に、それぞれのチタンプレートに口腔上皮細胞様細胞あるいは線維芽細胞を播種し、１時間後の初期接着細胞数とその細胞接着耐久度を比較したところ、試験群ではコントロール群と比較して、両細胞の初期接着細胞数および細胞接着耐久度ともに有意に低い値を示した。これによって、超親水性を有したチタン表面では軟組織細胞の接着性が低下することが示唆された（グラフ b)。



しかし、インプラント表面を超親水性にすることは、良好なオッセオインテグレーションを獲得させる方法として現在の主流の一つである。よって、今後のインプラントは超親水性を有しつつも軟組織細胞の接着を許す表面であることが重要であると考えられる。このことより、次に、親水性とは別の機構で接着性に影響を与えると考えられる、チタン表面のカチオン修飾に着目した。

骨芽細胞はカルシウムイオンとカルシウム結合性タンパクを介してチタン表面に接着するという仮説が報告されている。これと同じく上皮細胞、線維芽細胞についてもカルシウムイオンとカルシウム結合性タンパクを介したモデルを推定することができることを踏まえ、骨芽細胞接着や骨接触に良好な結果が報告されている塩化カルシウム水熱処理によるカルシウム修飾チタンの軟組織細胞接着効果について検討した。合わせて、細胞－基質間の接着に役割を果たすとされているマグネシ

ウムについても同様の検討を行った。

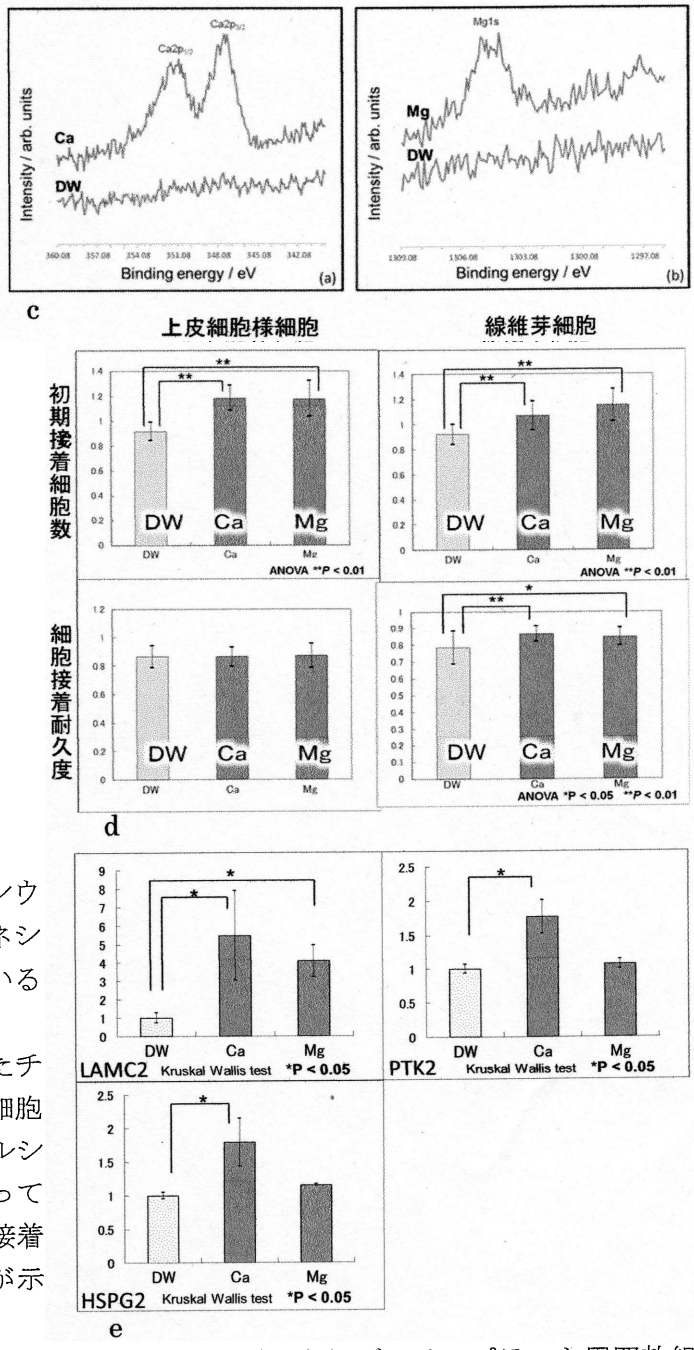
塩化カルシウム水溶液、塩化マグネシウム水溶液および蒸留水を用いて水熱処理を行った群を、それぞれ、カルシウム群、マグネシウム群、コントロール群とした。カルシウム群およびマグネシウム群はX線分光分析によってそれぞれのイオンで修飾されていることを確認した（グラフ c)。

その結果、上皮様細胞、線維芽細胞ともに、カルシウム群とマグネシウム群はコントロール群に比べて有意に初期接着細胞数が多く、さらに線維芽細胞では細胞接着耐久度も有意に高く、接着構造も明瞭に観察された（グラフ d)。

続いて細胞接着に関連するタンパク質のうち、上皮細胞のみが産生する基質タンパクであるラミニン-5、基底膜の構成成分であるHSPG2、接着に関する細胞内シグナリングの役割を担う PTK2 の遺伝子発現を上皮様細胞において検討した。遺伝子発現の定量にはReal time RT-PCR 法を用いた。

その結果、コントロール群と比較してカルシウム群では前記すべての遺伝子の発現が、マグネシウム群ではラミニン-5 の発現が高くなっているのが観察された（グラフ e)。

以上のことより、水熱処理にて超親水化したチタン表面に対しては、口腔上皮細胞や線維芽細胞の接着性は劣ることが示唆された。また、カルシウムまたはマグネシウム修飾することによってこれらの細胞の接着性は向上し、上皮細胞の接着関連タンパクの発現が高くなっていることが示された。



今後、本処理に加えて表面の親/疎水性をコントロールすることができれば、インプラント周囲軟組織の封鎖性をさらに増すことでインプラント周囲炎のリスクを減らし、インプラントの長期予後に貢献できる可能性がある。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

カルシウムイオンやマグネシウムイオンは，細胞間接着や細胞－基質間接着に必要であることが知られている．本研究はこれらの二価陽イオンが口腔軟組織細胞－チタン間接着にも関与しているという仮説の下，両イオンで修飾したチタン表面への口腔上皮様細胞および線維芽細胞の接着性について検討することを目的とした．

チタン表面に対し，塩化カルシウムあるいは塩化マグネシウム水溶液で水熱処理した群を試験群とし，蒸留水水熱処理群を対照群として使用した．軟組織細胞として，口腔粘膜

由来ケラチノサイトセルラインであるＳａ３と線維芽細胞であるＮＩＨ３Ｔ３を用いた．細胞をそれぞれの群のチタンプレート上に播種し１時間培養し，初期接着細胞数と初期接着耐久度を測定した．

Ｓａ３では、両試験群は対照群に比べ初期接着細胞数が有意に高い値を示した．しかし，初期接着耐久度に有意差はなかった．一方，ＮＩＨ３Ｔ３では，初期接着細胞数および初期接着耐久度ともに両試験群は対照群に比べ有意に高い値を示した．

次に，これらの細胞の接着に関わるタンパクを（免疫）蛍光染色下にて観察した．

Ｓａ３においては，インテグリンβ.４の発現とアクチンフィラメントの発達に関して群間の差異は見られなかったが，ＮＩＨ３Ｔ３では試験群においてビンキュリンの高い発現とそこへ延びるアクチンフィラメントの顕著な発達が観察された．

以上の結果より，チタン表面のカルシウムイオンやマグネシウムイオン修飾がチタンへの口腔軟組織細胞の接着性を改善することが示唆された．この表面処理によってインプラント周囲組織の封鎖性を増強することが可能であれば，インプラント周囲炎のリスクを下げることによってインプラントの長期予後を改善できる可能性があると考えられた．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	おおほ　こうへい **大　穂　耕　平**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５４７号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**ブラキシズムを有する顎関節症患者に対するスプリント治療のランダム化比較試験**
論文調査委員	（主　査）教　授　寺田善博 （副　査）教　授　髙橋一郎　　教　授　森　悦秀

論　文　内　容　の　要　旨

スタビライゼーションスプリント（以下スプリント）による治療は、顎関節症に対する可逆的保存療法として日常的に広く用いられており、睡眠時ブラキシズムの減弱にも効果があるとされているが、そのエビデンスは乏しいのが現状である。また、顎関節症状と睡眠時ブラキシズムがどのように影響し合って疾患に寄与しているのかは不明な点が多く、特にスプリント治療に関して顎関節症と睡眠時ブラキシズムへの効果を同時に検討した研究は存在しない。

そこで本研究では、まず第１章においてスプリントの治療効果についてのこれまでの報告を検索し、文献レビューを行った。その結果、スプリントの作用には保存的治療や行動療法としてのメカニズムが果たす役割も大きいことが分かってきており、現在では可逆的使用法に重点が置かれるようになってきたこと、睡眠時ブラキシズムを一時的に減少させる効果を有すること、しかしそれらのエビデンスは不足していることなどが示された。

続く第２章では、顎関節症に関与する因子について文献レビューを行ったところ、睡眠時ブラキシズムと咀嚼筋痛の間に単純な相関はないこと、うつ傾向および身体化傾向は慢性疼痛と相関すること、覚醒時のクレンチングが咀嚼筋痛と関連していることなどが報告されているが、それらのエビデンスは明確ではないことが分かった。

次に第３章では、平成 22 年 4 月 1 日～平成 23 年 9 月 30 日の期間に顎関節症を主訴に九州大学

病院義歯補綴科を受診した初診患者 83 名の特徴や臨床症状を集計し、その傾向と特徴を把握した。その結果、男女比は 1：2.6 と女性の割合が高かった。年齢層としては 20～24 歳が最も多く、次いで 45～49 歳と 70～74 歳が多かった。症型分類ごとの患者数の割合は、Ⅰ型 30%、Ⅱ型 6%、Ⅲa 型 49%、Ⅲb 型 4%、Ⅳ型 11%、Ⅴ型 0%であった。わが国における過去の報告と比較すると、Ⅱ型およびⅢb 型が少なく、Ⅰ型が多い傾向があった。症状の有無で分類すると、顎関節に関連する症状より咀嚼筋に関連する症状を有する患者の割合がやや多かった。53%の患者が軽度以上の開口障害を有しており、顎関節の骨形態異常が認められた患者は 9 名であった。

第 4 章では、九州大学病院を受診した顎関節症患者のうち、咀嚼筋痛を主徴候とし、さらに睡眠時ブラキシズムが疑われる者 16 名を対象として、スプリント装着群と非装着群（各 8 名ずつ）のランダム化比較試験を行った。各群において 6 週間にわたり咀嚼筋痛の程度、OHIP-49（口腔関連 QOL）、睡眠時ブラキシズムの記録を行い、改善度を比較した。また、治療成績と関連する因子（日中の習癖、社会心理学的因子など）およびそれらの因子の関与の程度を調査・解析するために、心理学的因子およびダイアリーの記録を行った。その結果、咀嚼筋痛に関して、Visual Analogue Scale (VAS)による痛みの主観的評価では群間に有意差は認められなかったが、筋圧痛スコアおよび OHIP-49 スコアにおいてはスプリント装着群の方が有意に改善していた。また、睡眠時ブラキシズムはスプリント装着直後において有意に減少したが、その効果は短期的であり、1、4、6 週後には差はみられなかった。睡眠時ブラキシズムの変化は被験者間でばらつきがみられ、8 名中 7 名においてスプリント装着直後に睡眠時ブラキシズムの減少がみられたが、逆に増加する被験者も認められた。睡眠時ブラキシズムと咀嚼筋の痛みとの間に単純な相関はみられなかったが、重度ブラキサー2 名のデータを外れ値として除外した場合、痛みが比較的軽度な患者については睡眠時ブラキシズム活動が多いほど痛みが強く、痛みが比較的重度の者は痛みが強いほど睡眠時ブラキシズムが少ないという傾向が示された。Baseline 時における咀嚼筋の痛みと各背景因子の間には相関が認められなかったが、スプリント装着群の治療成績に着目すると、神経症の傾向および緊張・不安の傾向が強いほどスプリント治療を行っても最小 VAS(安静時の自発痛)が改善しにくいことが示された。

以上の結果から、スプリント治療は咀嚼筋痛の緩和に有効であること、また短期的ではあるが睡眠時ブラキシズムの減弱にも効果があることが明らかとなった。

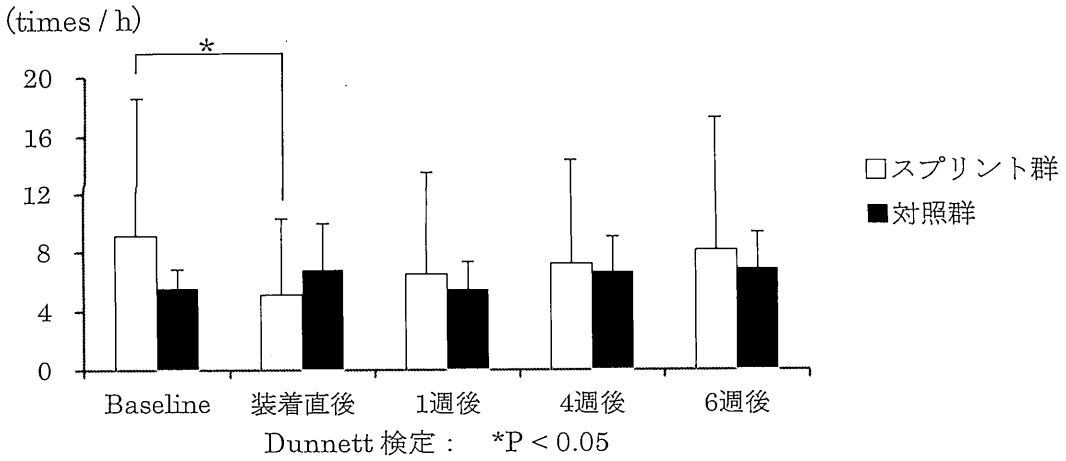
表　顎関節症関連パラメーターの改善度の群間比較

	スプリント群（N= 8）		対照群（N= 8）		
パラメーター	Baseline	6 週後	Baseline	6 週後	Pvalue
最大 VAS (mm)	45 ± 16	33 ± 26	44 ± 15	19 ± 15	0.40
最小 VAS (mm)	4.9 ± 7.5	2.8 ± 6.3	2.1 ± 3.6	0.6 ± 1.8	0.84
平均 VAS (mm)	25 ± 21	12 ± 15	27 ± 14	14 ± 15	0.96
筋圧痛スコア	11.3 ± 4.8	6.1 ± 3.5	7.4 ± 5.3	7.0 ± 5.3	0.00**
OHIP-49 スコア	47 ± 18	30 ± 15	34 ± 19	32 ± 24	0.03*

Values given are mean ± s.d.

Pvalue ; Comparison of change between baseline and 6weeks (t-test) ; *P < 0.05, **P < 0.01

VAS = visual analogue scale　　OHIP-49 = oral health impact profile-49



Dunnett 検定： $^{*}P < 0.05$

図　各測定時点における睡眠時ブラキシズム（EVENT 数）の変化

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

スプリント治療は，顎関節症に対する可逆的保存療法として日常的に広く用いられており，睡眠時ブラキシズムの減弱にも効果があるとされているが，そのエビデンスは乏しいのが現状である．また，スプリント治療に関して顎関節症とブラキシズムへの効果を同時に検討した研究はなく，これらがどのように影響し合って疾患に寄与しているのかは不明な点が多い．そこで本研究では，ランダム化比較試験によりスプリント装着群と非装着群の治療経過を比較することによって，顎関節症および睡眠時ブラキシズムに対するスプリント治療の効果を検討した．さらに治療成績に影響を及ぼす背景因子に関しても解析を行った．

当院を受診した顎関節症患者のうち，咀嚼筋痛を主徴候とし，さらに睡眠時ブラキシズムが疑われる者16名を研究対象とした．被験者に対し，スプリント装着群，非装着群（各8名ずつ）への無作為割付を行った．各群において6週間にわたり咀嚼筋痛の程度，口腔関連QOL，睡眠時ブラキシズムの記録を行い，改善度の評価を行った．また，背景因子として心理学的因子，ダイアリーの記録を行った．

咀嚼筋痛症状に関しては，VASによる痛みの主観的評価では群間に有意差は認められなかったが，筋圧痛スコアおよび口腔関連QOLにおいてはスプリント装着群の方が有意に改善していた．また，睡眠時ブラキシズム活動はスプリント装着直後において有意に減少したが，1，4，6週後には差はみられなかった．ブラキシズムと痛みの関係に単純な相関はなく，その他の背景因子に関しても初期症状および治療経過に明らかな影響は認められなかった．

以上の結果より，スプリント治療は咀嚼筋痛の緩和に有効であること，また装着直後はブラキシズムが減弱するがその効果は短期的であることが明らかとなった．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	こう の たか し 河 野 高 志 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５４８号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**高周波・低振幅の微小振動刺激が骨形成能に与える影響**
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教　授　寺 田 善 博 (副　査) 教　授　久木田 敏 夫　　教　授　中 村 誠 司

論　文　内　容　の　要　旨

インプラント治療はその高い成功率から欠損補綴治療の主要な選択肢として確立されてきている。しかし、一般的には3〜6か月程度の免荷期間を要する上、インプラント埋入に先駆けて抜歯や骨移植等の治療を行った場合はこれらの治癒を待たなければならず、治療期間が長期におよぶ点が大きな欠点となっている。そのため、広く適応可能な手技による治療期間の短縮が求められている。

骨組織は機械的刺激に対する感受性が高く、増負荷によって骨形成が促進され、逆に減負荷によって吸収される。中でも微小な振動刺激による適度なメカニカルストレスは骨組織の治癒促進が期待でき、そのひとつである高周波・低振幅の振動刺激 (Low-magnitude High-frequency vibration: LMHF vibration) について2001年にRubinらによって、羊大腿骨の海綿骨密度が増加したことが報告されて以来、骨量・骨質の改善、骨組織の治癒促進、骨粗鬆症における骨減少抑制など様々な報告がなされている。インプラントにおいてもラット脛骨に埋入したインプラント周囲骨の治癒がLMHF振動刺激によって促進されたとの報告がされている。

そこで本研究では、LMHF振動刺激による骨組織の治癒促進の可能性を検討するために、in vivo実験を、さらに、メカニカルストレスによる骨形成促進のメカニズムを検討するためにin vitro実験を行った。

in vivo実験では、振動刺激の抜歯窩骨組織の治癒過程への影響を見るために、下顎前歯を抜去したラット頭部に対して50Hzで毎日一時間振動刺激を1週間もしくは3週間行った。その結果、振動刺激群では1週間刺激群において抜歯窩に形成された新生骨に有意に太い骨梁構造が認められた。これは振動刺激による引っ張り応力に抵抗した結果であると考えられ、LMHF振動刺激が抜歯窩の治癒促進に対して有効に作用する可能性が示唆された。また、3週間刺激群では骨梁幅にも有意差は見られなくなり、このことからLMHF振動刺激による治癒促進はその過程の初期において有効であることが示唆された。

in vitro 実験では、振動刺激によって影響を受ける骨形成因子について検討を行うため、ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞に LMHF 振動刺激を行い、Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の測定と real time RT-PCR 法による遺伝子発現の定量的解析を行った。その結果、ALP 活性は分化誘導後 4 日目、8 日目において、実験群が対照群より有意に上昇していた。ALP は骨芽細胞の分化に関連したマーカーとして度々用いられるタンパクであり、このことから LMHF 振動刺激が骨芽細胞への分化・成熟に促進的に作用したことが示唆された。

遺伝子発現の定量的解析に関しては、振動刺激群で発現が 2 倍以上増加した遺伝子および発現が 1/2 以下に減少した遺伝子を[表]に示す。まず、Smad および TGF-β receptor の増加が目立つが、これらは TGF-β/Smad シグナル伝達経路として細胞の増殖や分化に多彩な作用を示すことが知られている。また、BMP receptor も増加が見られるが、これも BMP/Smad シグナル伝達経路として同様の作用が知られている。これらの骨形成に促進的な作用を示すシグナル伝達経路に関与する因子の遺伝子発現が増加することで、シグナル伝達が活発化し、分化を促進していることが示唆された。こ

の他にも創傷治癒・血管新生・骨形成等に作用するFGF receptorや膜タンパクでコラーゲン接着性を有するCD36、血管形成を促進したり破骨細胞活性を促進して骨代謝を活発化したりするVEGFなどで遺伝子発現の増加が認められ、これらの作用によって骨形成が促進されていたものと考えられる。

一方で、コラーゲン類は発現の低下が観察された。I型コラーゲンは骨基質の主要構成成分であるが、その発現は骨芽細胞分化のごく初期に亢進し、以降低下することが報告されており、今回の実験ではすでにコラーゲンの発現が低下するフェーズに入っていたものと考えられる。また、スクレロスチンの発現減少も認められた。スクレロスチンは力学的負荷反応のメディエーターと見なされており、機械的刺激によって発現が抑制されたとの報告がある。このスクレロスチンは前述のBMP/Smadシグナル伝達経路や間葉系幹細胞から軟骨細胞・脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進する作用で知られているWntシグナル伝達経路の阻害因子として作用している。このような骨形成を抑制する作用の因子の遺伝子発現量が低下することで骨形成に促進的作用をおよぼしたものと考えられる。

本研究によって、LMHF振動刺激の抜歯窩の治癒促進・抜歯後の顎堤保存・インプラント治療におけるオッセオインテグレーションの早期獲得など歯科領域への応用の可能性が示された。また、メカニカルストレスによる骨形成促進作用のメカニズムの一端が明らかとなった。今後さらなる詳細なメカニズムの解明によって、骨形成の種々の経路のどこでメカニカルストレスが作用するのかが明らかになれば、より効果的に骨形成を促進することが可能になると思われる。

[表] 振動刺激群で発現が2倍以上もしくは1/2以下となった遺伝子

振動刺激群で発現が2倍以上増加した遺伝子	
遺伝子名	発現比
Fibroblast growth factor receptor 1	8.6
Vascular endothelial growth factor B	6.9592
SMAD family member 1	6.4661
Insulin-like growth factor 1	6.2386
Transforming growth factor, beta 1	5.9485
Integrin, beta 1	5.6071
Transforming growth factor, beta receptor 3	4.9559
Fibronectin 1	4.8165
Vascular cell adhesion molecule 1	4.5117
SMAD family member 3	4.1728
SMAD family member 2	4.137
Fibroblast growth factor receptor 2	3.9284
Collagen, type XII, alpha 1	3.8353
Transforming growth factor, beta receptor 2	3.782
Integrin, alpha V	3.2067
SMAD family member 4	3.1935
Bone morphogenetic protein receptor, type IA	3.1551
Cadherin 11	2.9496
CD36 molecule (thrombospondin receptor)	2.8756
Runt-related transcription factor 2	2.5834
Integrin, alpha M	2.5508
Growth differentiation factor 10	2.5392
Transforming growth factor, beta receptor 1	2.452
Bone morphogenetic protein 4	2.3424
Collagen, type XI, alpha 1	2.2659
Intercellular adhesion molecule 1	2.2211
Cartilage oligomeric matrix protein	2.1774
Tubulin interacting protein 11	2.1249

振動刺激群で発現が1/2以下に減少した遺伝子	
遺伝子名	発現比
Alpha-2-HS-glycoprotein	0.0379
Ameloblastin	0.0379
Bone morphogenetic protein 7	0.0379
Collagen, type X, alpha 1	0.0379
Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	0.0379
Epidermal growth factor	0.0379
Fibroblast growth factor 2	0.0379
Fibroblast growth factor 3	0.0379
Enamelin	0.0432
Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	0.0521
Procollagen, type VII, alpha 1	0.1133
Transforming growth factor, beta 3	0.1205
Collagen, type II, alpha 1	0.1296
Collagen, type I, alpha 2	0.1535
Sclerosteosis	0.1909
Bone morphogenetic protein 6	0.1991
Integrin, alpha 3	0.2454
Matrix metallopeptidase 9	0.3993
Msh homeobox 1	0.4078
Matrix metallopeptidase 10	0.4411
Collagen, type I, alpha 1	0.4474
Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	0.4601

発現比：コントロール群における遺伝子発現量を1とした時の振動群の遺伝子発現量

論文審査の結果の要旨

インプラント治療は骨の治癒に時間を要するため，長期間を要するのが欠点である．特にインプラント埋入に先立って抜歯や骨移植を行う場合，治療期間がさらに長期化することから，骨治癒の促進が求められている．一方，2001年に高周波・低振幅の振動刺激によって正常羊大腿骨の海綿骨密度が増加したことが報告されて以来，様々な報告がなされている．

そこで本研究では，高周波・低振幅振動刺激による骨組織の治癒促進の可能性を検討することを目的とし，in vivoおよびin vitroの実験を行った．In vivoでは，振動刺激の抜歯窩骨組織の治癒過程への影響を見るために，下顎前歯を抜去したラット頭部に対して50Hzで毎日一時間振動

刺激を行った.

その結果，抜歯窩の治癒過程の初期段階において有意に太い骨梁構造の形成が認められた．これは振動による機械的刺激が骨梁幅に対して促進的に影響したものと考えられた．また，振動刺激によって影響を受ける骨形成因子について検討を行うため，in vitro 実験においてラット骨髄由来骨芽細胞様細胞に振動刺激を行ったところ，分化誘導後４日目，８日目においてアルカリフォスファターゼ活性が対照群より有意に上昇していた．また，real time RT-PCR 法による遺伝子発現の定量において，骨形成を促進する遺伝子の発現増加や，骨形成を抑制する遺伝子の発現減少が見られた．

これらの結果より，高周波・低振幅の振動刺激が骨形成の初期段階において促進的影響を及ぼすことが示唆された．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	たかの　としお **髙　野　登志雄**（岡山県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５４９号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**間葉系幹細胞による炎症性骨破壊制御**
論文調査委員	(主　査)　教　授　髙　橋　一　郎 (副　査)　教　授　赤　峰　昭　文　　教　授　中　西　　博

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】炎症性骨破壊を伴う Adjuvant Arthritis ラット（AA ラット）の系に間葉系幹細胞（MSC）を投与し、炎症および骨破壊に対する影響を検討した。【方法】ラット骨髄細胞より basic FGF 存在下 MSC を分離、増殖し、投与実験に用いた。ラット尾根部に結核死菌を含む CFA（Complete Freund Adjuvant）を皮内注射することにより AA ラットを作製した。MSC は腹腔内に投与した（$5x10^6$cells/ラット）。１週から４週にかけてラットの前肢及び後肢の関節炎スコア、後肢の腫脹体積、体重について測定を行い、屠殺後はソフテックス及びマイクロ CT によるエックス線学的解析と、組織学的解析を行った。【結論と考察】MSC 投与群で腫脹体積に関しては有意差は認められなかったものの、関節炎スコア、体重の減少は CFA 投与群と比べ有意に抑制された。エックス線学解析により MSC 投与群が有意に骨破壊を抑制することがわかった。組織学的解析によると CFA 投与群においては著しい骨破壊像が認められ、関節腔の形状が大きく変化していたのに対して MSC 投与群においては骨破壊は低レベルであり、関節腔の形状も正常であった。脛骨遠位端及び距骨における破骨細胞の局在を解析したところ、CFA 投与群では

破骨細胞が骨髄内に広範囲にわたって観察されたのに対し、MSC投与群では成長板に近接した骨幹端に限局した部位にのみ破骨細胞の集積が認められた。MSCがAAラットの炎症及び骨破壊を有意に抑制することがわかった。MSCによる炎症性骨破壊の制御が可能になるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells; MSCs)は様々な細胞へ分化する能力を持ち、再生医療の材料として広く用いられている。近年、MSCが抗炎症作用、免疫調節作用を有することが報告されている。一方、炎症性骨破壊を伴うAAラットは炎症及び骨破壊が顕著な脛骨遠位端において、CCケモカインのひとつであるMacrophage Inflammatory Protein-1α (MIP-1α)が高発現しており、関節炎の病態に関与していることが知られている。さらに、造血幹細胞のniche内での維持や末梢血への動員などに深くかかわるCXCケモカインの一種Stromal Derived Factor-1α (SDF-1α)が組織障害部位で高発現していることも報告されている。本研究ではMSCを、炎症性骨破壊を伴うアジュバント関節炎ラット(AAラット)に投与することにより、この炎症性骨破壊の制御を目的として、以下の検討を行った。

ラット骨髄細胞からbasic FGF存在下に分離・培養した細胞の細胞膜表面マーカーをFlowcytometry、免疫蛍光染色法で検定し、更に骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導実験を行った。その結果、得られた細胞がMSCの細胞膜表面マーカーのパターンを示し、骨芽細胞、脂肪細胞及び軟骨細胞への分化が認められたためMSCであることが示唆された。

さらに、AAラットにMSCを投与し、炎症及び骨破壊に対する影響について解析した。MSCはAAラットの炎症及び骨破壊を有意に抑制し、in vitroにおいても破骨細胞形成を抑制した。MSCはMIP-1αのレセプターCCR1およびSDF-1αのレセプターCXCR4を発現しており、in vitroにおいてMIP-1αおよびSDF-1αに対する有意な走化性を示した。MSCは破骨細胞形成を抑制するサイトカインを発現していた。

本研究により、MSCはケモカインにより炎症局所に浸潤し、炎症部位において抑制性サイトカインを分泌することにより局所的に炎症及び骨破壊を抑制するものと考えられた。本研究により炎症性骨破壊に対するMSCを用いた治療の有用性が示唆された。

さらに本研究では、MSCの免疫学的純化を目的として、MSC特異的細胞膜表面マーカー特異的なモノクローナル抗体作製を試みた。MSCに選択的に反応するモノクローナル抗体を得ることができ、MSCの免疫学的な簡便なる純化が可能になるものと思われる。

当調査委員会は本研究が骨関節炎の細胞治療の可能性を示し、歯科医学の発展に大きく貢献する知見であると評価し、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断する。

氏名・(本籍・国籍)	たかはし　あきら **高　橋　　良**（島根県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５５０号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**膜ナノチューブによる破骨細胞分化制御**
論文調査委員	（主　査）教　授　中　西　　博 （副　査）教　授　平　田　雅　人　　教　授　赤　峰　昭　文

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

免疫系の細胞が相互作用する際、「膜ナノチューブ」という非常に径の小さなシリンダー状の細胞間橋が細胞間情報伝達に重要であることが分ってきた。本研究では、破骨細胞前駆細胞間の融合過程に於ける膜ナノチューブの関与について検討することを目的とした。ところで「M-Sec」という蛋白質がその形成において重要な分子であることが報告された。本研究では膜融合過程にある M-Sec 遺伝子の関与と膜融合活性分子である DC-STAMP の膜ナノチューブを介した前駆細胞間移動について検証することを目的とした。

【方法及び結果】

破骨細胞前駆細胞株 RAW-D 細胞及びラット骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系に於いて、細胞間に径の非常に小さな管状の構造体から成る細胞間橋が存在することを確認した。この構造体にファロイジンが結合することより、アクチンを含んでいることが分った。アクチン重合阻害剤である Latrunclin B で処理すると、このような細胞間橋が消失し、破骨細胞形成が顕著に阻害された。したがって、融合過程において観察される細胞間橋は「膜ナノチューブ」であることが判明した。RT-PCR 法により経時的な解析を行ったところ、M-Sec 蛋白質の発現が破骨細胞分化に伴って上昇することが分った。破骨前駆細胞の融合と膜ナノチューブ形成における M-Sec の機能を調べる為に RNAi 法を用いた解析を行なったところ、siRNA による破骨細胞形成の抑制効果が認められた。DiD（赤色蛍光）により RAW-D 細胞を標識したものと、DC-STAMP-GFP 融合蛋白質（緑色蛍光）を発現させた RAW-D 細胞の両者を混合後培養し、前駆細胞間融合過程の蛍光顕微鏡による解析を行ったところ、膜ナノチューブを介して DC-STAMP が細胞間移動することを示唆する所見が得られた。

【結果】

「膜ナノチューブ」の形成が前破骨細胞間の融合に於いて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

破骨細胞は単核の破骨前駆細胞が融合して形成される骨吸収能を持った多核巨細胞である。近年、破骨細胞分化因子 RANKL（receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand）及びその受容体 RANK（receptor activator of nuclear factor kappa-B）や破骨細胞分化に必須の転写因子 NFATc1（nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1）の発現により破骨細胞分化のシグナリング伝達に関する研究は大きく前進したが前駆細胞同士の融合過程については未だに不明な点が多い。免疫系の細胞が相互作用する際、「膜ナノチューブ」という非常に径の小さなシリンダー状の細胞間橋が迅速な細胞間情報伝達に重要であることが分かってきた。この膜ナノチューブを介して Ca^{2+} シグナルの伝達や膜表面蛋白質やウイルス粒子などが高速に移動することが報告されている。最近、腸管免疫において重要な役割を担っている M 細胞において「M-Sec」というユニークな蛋白質が膜ナノチューブ形成を誘導する分子であることが報告された。そこで本研究では、(1)破骨前駆細胞の融合過程における膜ナノチューブの関与、(2)前駆細胞融合過程における M-Sec 遺伝子の発現と機能、ならびに(3)膜融合制御分子である DC-STAMP の膜ナノチューブを介した前駆細

胞間移動について検討することを目的として行った。

In vitro において破骨細胞分化実験は主として前駆細胞株 RAW-D 細胞を用いた。破骨前駆細胞同士の融合を観察する方法として以下の方法を確立した。即ち、赤色蛍光色素の細胞膜リオン脂質標識試薬 DiI あるいは DiO で標識した細胞を調整し、GFP 発現ベクターを導入することにより緑色蛍光を発する GFP 蛋白質を発現させた細胞と同数混ぜ合わせて培養することで融合過程を詳細に観察できるようにした。膜ナノチューブ形成について共焦点レーザー顕微鏡を用いてタイムラプス解析を行い、さらに走査電顕による解析を行った。また、RAW-D 細胞を RANKL および TNF-α存在下で培養後、分化に伴う M-Sec 遺伝子の経時的な発現誘導を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

破骨前駆細胞 RAW-D 細胞及びラット骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系において、細胞間に径の小さな管状の構造体から成る細胞間橋が存在することを確認した。この構造体は抗β-tublin 抗体により検出された。また、この構造体に蛍光標識ファロイジンが結合することから、細胞骨格であるアクチンフィラメントを含んでいることが分かった。アクチン重合阻害剤である latrunclin B で処理すると、このような細胞間橋が消失した。走査電顕による観察によりこの構造体の径は数百ナノメーターであることが分かった。したがって、融合過程において観察される細胞間橋は「膜ナノチューブ」であることが判明した。なお、latrunclin B 処理により膜ナノチューブの形成が抑制されるのみならず、破骨細胞形成も顕著に抑制された。M-Sec 遺伝子の発現を検討したところ、破骨細胞分化に伴って遺伝子発現の有意な亢進が認められた。RNAi 法を用いたノックダウン実験を行ったところ、M-Sec 特異的 siRNA による破骨細胞形成の有意な抑制が認められた。また、siRNA の導入により破骨細胞分化に伴って形成される膜ナノチューブの顕著な形成阻害が認められた。

さらに破骨細胞分化に伴って形成される膜ナノチューブを介する分子の細胞間移動を確認するために以下の実験を行った。DiI(赤色蛍光)標識 RAW-D 細胞と、GFP 遺伝子導入 RAW-D 細胞(緑色蛍光を発する)の両者を同数混合し、破骨細胞分化条件で培養後、共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプス解析を行った。その結果 DiI 標識された膜表面リン脂質が膜ナノチューブを介して高速で細胞間移動することが明らかとなった。さらに融合制御能を有する膜表面分子 DC-STAMP の膜ナノチューブを介した細胞間移動を実証するために DiI 標識した RAW-D 細胞と、DC-STAMP-GFP 融合蛋白質(緑色蛍光)を発現させた RAW-D 細胞の両者を混合後、分化条件下で培養し、前駆細胞間融合過程の共焦点レーザー顕微鏡による経時的解析を行った。その結果、膜ナノチューブを介して DC-STAMP 分子が細胞間移動したことを強く示唆する所見が得られた。

以上、本研究から破骨細胞分化過程において観察されるチューブ状細胞間橋は「膜ナノチューブ」であり、破骨細胞分化が進むにつれて膜ナノチューブ誘導遺伝子である M-Sec 遺伝子の発現が有意に亢進し、M-Sec 特異的 siRNA の導入により破骨細胞形成が抑制されることから、破骨細胞形成に M-Sec 遺伝子が関与している可能性が示された。また、膜ナノチューブを介して破骨前駆細胞間で膜表面リン脂質や融合制御分子である膜表面 DC-STAMP 分子の細胞間移動が認められたことから膜ナノチューブの形成が破骨前駆細胞間の情報伝達及び融合過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。従って、本論文は学位論文に値するものと判断される。

氏名・(本籍・国籍)	まつ もと ひろ し 松 本 浩 志 (長崎県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５５１号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**睡眠時ブラキシズムに対するオクルーザルスプリントの効果的治療プロトコールの検討**
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教 授　寺 田 善 博 (副　査) 教 授　高 橋 一 郎　　教 授　森　　悦 秀

論　文　内　容　の　要　旨

睡眠時ブラキシズムは､睡眠時に行われる顎口腔系の非機能運動または異常機能と定義されており、睡眠時に行われるため意識的な抑制が難しく、非常に大きな力が発生することも少なくない。睡眠時ブラキシズムは、その過度の力により歯の摩耗・歯周組織の破壊・歯科補綴装置およびインプラントの破損などの歯および歯周組織に関係するトラブルや、咬筋肥大・咀嚼筋の疼痛等を伴う顎関節症などの筋骨格系のトラブルの要因の一つと考えられ、顎口腔系組織に悪影響を与えており、過去にも多くの研究がなされてきた。最近では、睡眠時ブラキシズムは微小覚醒を伴う中枢性の活動によって生じるものとの見解が主流になっている。しかしながら、末梢性の刺激は睡眠時ブラキシズム活動に何らかの影響を与えている可能性が示唆されており、睡眠時ブラキシズムの明確な病態メカニズムの解明には至っていない。現在、睡眠時ブラキシズムに対する最も一般的な対処法として、オクルーザルスプリントが使用され、一定の効果は認められたとする報告があるものの、その作用メカニズムは明確にされていない。そこで本研究では、睡眠時ブラキシズムに対するオクルーザルスプリントの効果的な治療プロトコールの検討を目的とした。

まず、スプリントが睡眠時ブラキシズムに与える影響に関する文献レビューを行い、現時点で得られているエビデンスを整理した。その結果、これまでに形状や使用法の異なる様々なタイプのスプリントが開発されてきており、それぞれ一定の効果が示されている。しかし、それらの安全性や臨床研究で得られたデータの信頼性等に疑問点が残り、確実に効果のある治療法はなかった。一方、スプリントの作用メカニズムに関して様々な仮説が示されているが、口腔内環境の変化が睡眠時ブラキシズム活動を減少させるという行動療法的なメカニズムが提唱され、それを支持する研究が複数みられるものの、現在のところ明確な結論は得られていなかった。

次に、スタビライゼーションスプリントの間歇的な使用が睡眠時ブラキシズムに与える影響を明らかにすることを目的としてランダム化比較試験を行った。当教室の先行研究において、スプリント装着直後に睡眠時ブラキシズムは減少するが、その効果は長期間持続せず一時的であることがわかっている。これを踏まえ、スプリントを間歇的に使用することで、睡眠時ブラキシズムをより効果的かつ長期に減少させられるのではないかと考え、以下の手順で本研究を行った。

九州大学歯学部学生および九州大学病院職員のうち睡眠時ブラキシズムを有する者20名(男性9名、女性11名、平均年齢28.9歳、24～37歳)を対象に、スプリントの連続使用群(30日間連続使用)と間歇使用群(7日間ずつ使用・不使用を繰り返す：1-7日目および15-21日目、29-30日目にスプリントを使用)との2群にランダムに振り分け、各群ともにスプリント装着前・装着直後・1週後・2週後・3週後・4週後の計6回の測定ポイントにおいて、携帯型筋電図測定装置を用いて睡眠時咬筋筋活動を測定した。得られた筋活動を解析し、睡眠1時間あたりの睡眠時ブラキシズムの発生回数(EVENT)・総持続時間の割合(DURATION)・総活動量(AREA)を算出し、各測定ポイントにおけるスプリントの効果を検討した。

その結果、EVENTおよびDURATIONにおいて、連続使用群で装着直後に睡眠時咬筋筋活動の減少がみられたが（Dunnett's test, $P<0.05$）（図1)、その後の測定では有意な減少がみられなか

った。一方、間歇使用群では装着直後に加え 4 週後にも EVENT および DURATION において有意な咬筋筋活動の減少がみられた（Dunnett's test, P<0.05）（図 1）。なお、AREA においては、有意な減少は見みられなかった（Dunnett's test, P>0.05）（図 1）。

連続使用群における結果は当教室の先行研究と一致しており、スプリントは装着直後に効果を発揮し、その効果は 1 週間以上持続しないことが示唆された。また間歇使用群においては、装着直後のみならず 4 週後においても有意な減少がみられた。

今回の結果から、スプリントを間歇的に使用することで、より長期に咬筋筋活動を減少させられる可能性が示唆され、オクルーザルスプリントを間歇的に使用するという、新たな使用法とその効果について示すことができた。これは、スプリントが SB に与える効果およびメカニズム解明の一助になったと考える。

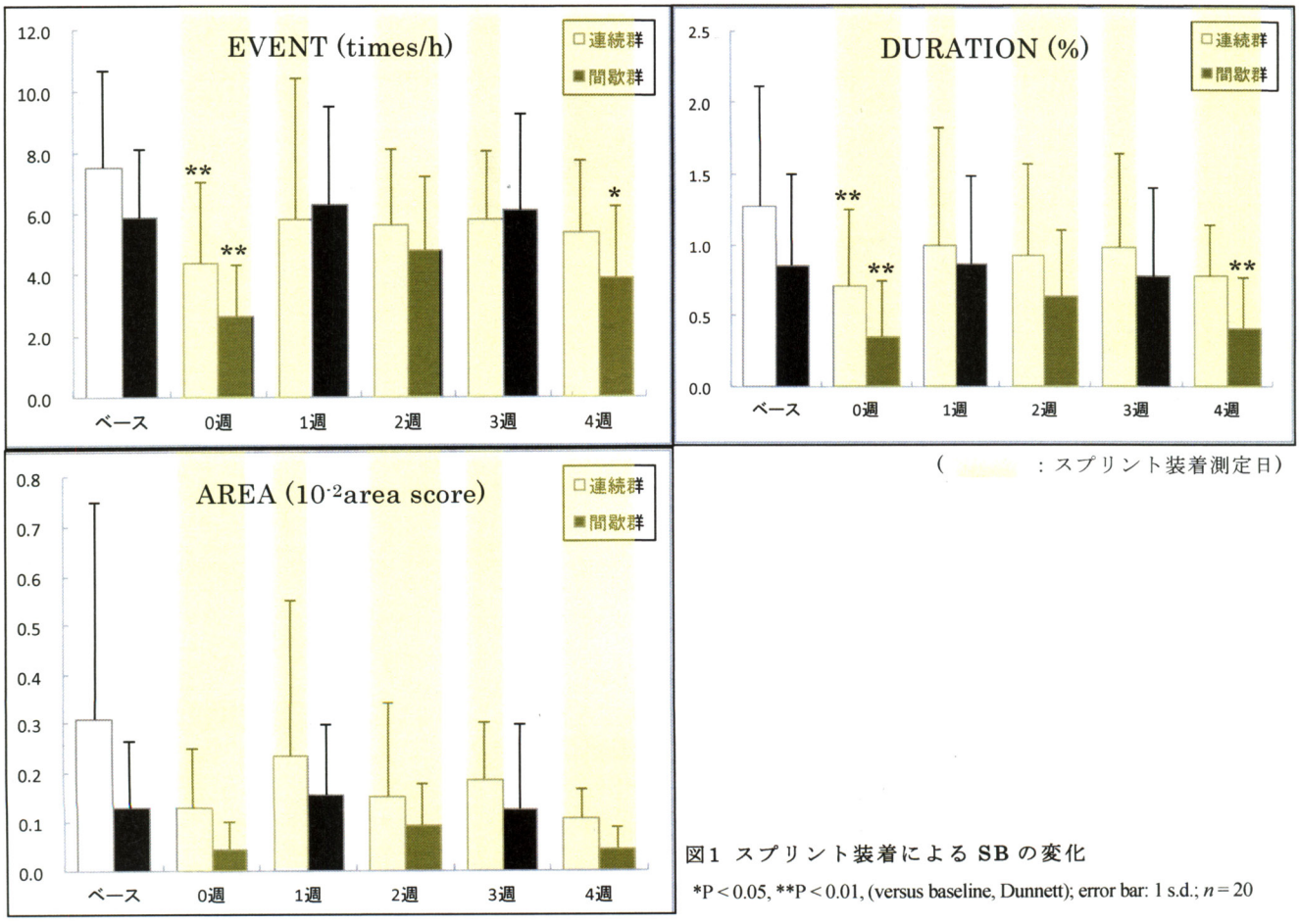


図1 スプリント装着による SB の変化

*P < 0.05, **P < 0.01, (versus baseline, Dunnett); error bar: 1 s.d.; $n = 20$

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

現在，睡眠時ブラキシズム（以下SB）に対する最も一般的な対処法として，オクルーザルスプリント（以下スプリント）が使用されているが，一定の効果が認められたとする報告があるものの，その作用メカニズムは明確にされていない．一方，所属教室の先行研究において，スプリント装着直後にSBは減少するが，その効果は長期間持続せず一時的であることがわかった．この結果から，スプリントを間歇的に使用することで，SBをより効果的かつ長期に減少させられるではないかと考えるに至った．本研究では，SBを有する者を対象にスプリントを連続的に使用する群と間歇的に使用する群にランダムに振り分け，両群間の睡眠時咬筋筋活動を比較検討することにより，スプリントの間歇的な使用がSBに与える影響を明らかにすることを目的とした．

九州大学病院職員のうちSBを有する者20名（男性9名，女性11名，平均年齢28.9歳，24ー37歳）を対象に，スプリント連続使用群(30日間連続使用）と間歇使用群（7日間ずつ使用・不使用を繰り返す）との2群に

ランダムに振り分け，各群ともにスプリント装着前・装着直後・1週後・2週後・3週後・4週後の計6回の測定ポイントにおいて，ポータブル筋電計を用いて睡眠時咬筋筋活動を測定した．得られた筋活動を解析し，睡眠1時間あたりのSBの発生回数(Event)・総持続時間の割合(Duration)・総活動量(Area)を算出した．統計解析にはDunnetの多重比較を用い，各測定ポイントにおけるスプリントの効果を検証した．

その結果，Event及びDurationにおいて，連続使用群で装着直後に睡眠時咬筋筋活動の減少がみられたが($P<0.05$)，その後の測定では有意な減少がみられなかった．一方，間歇使用群では装着直後に加え4週後にもEvent及びDurationにおいて有意な咬筋筋活動の減少がみられた($P<0.05$)．

連続使用群における結果は過去の研究結果と一致しており，スプリントは装着直後に効果を発揮し，その効果は1週間以上持続しないことが示唆された．また間歇使用群においては，装着直後のみならず4週後においても有意な減少がみられた．

以上の結果から，スプリントの装着直後の効果は明らかであり，また，間歇的なスプリントの使用により，より長期に咬筋筋活動を減少させられる可能性が示唆された．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	やまね　こういち **山　根　晃　一**（山口県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５５２号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**種々のインプラントアバットメント材料への細菌接着の特性**
論文調査委員	（主　査）教　授　寺　田　善　博 （副　査）教　授　前　田　勝　正　　教　授　石　川　邦　夫

論　文　内　容　の　要　旨

インプラント周囲炎は、歯科インプラントの失敗の最も大きな原因とされており、インプラントの歯肉貫通部（アバットメント）周囲のプラーク蓄積による周囲組織の炎症と、それに引き続くインプラント支持骨の吸収を主な病態とする。アバットメントには、これまで加工性の高さから金属が使用されてきたが、審美的要求の高まりとともにCAD/CAMの手法を用いたセラミック材料も使用されるようになってきた。しかし、種々のアバットメント材料表面に付着するプラークの相違に関する知見はあまり報告されていないため、明確な細菌学的エビデンスがないまま、もっぱら審美的な理由で材料が選択されているのが現状である。そこで本研究は、種々のアバットメント材料に付着する細菌量や細菌種構成の相違を明らかにすることを目的とした。第１章として被験者に種々のアバットメント材料のチップを装着し、チップに付着した細菌叢を解析することで種々のアバットメントに付着する細菌量や細菌構成の相違を明らかにした。第２章では、第１章の結果をもとに、細菌の付着傾向と被験者固有の疾患や習慣との関連について解析を行った。

第１章では30名のボランティアに対し、インプラントアバットメントに使用される材料であるチタン、白金加金、ジルコニア、アルミナおよびハイドロキシアパタイト（対照群）のチップを接着したマウスピースを作製し、４日間装着させた。その後各材料表面に付着した細菌を解析した。解析は、細菌量に関してはリアルタイムPCR法を用いて行い、細菌構成に関してはT-RFLP法を用いて行った。

解析の結果、チップ間の細菌叢の違いより個人差の方が大きいことが示唆された。細菌が歯質や

材料に付着する際には唾液中のタンパク質によるペリクルの層がその表面に形成される必要があるが、今回の結果は、材料の相違にかかわらず近似組成のペリクルが表面に構成された結果、類似した細菌叢が構築されたためであると考えられた。また、細菌付着量に関して、被験者によるばらつきが大きかったため数値を標準化した後にクラスター解析を行ったところ、白金加金合金とチタンは他の 3 つの材料と比較して異なる傾向を示した。つまり、白金加金合金に付着する細菌の量は他の材料に付着する細菌の量と比較して少なく、一方でチタンに付着する細菌量は、他の材料と比較して付着が多い被験者群と少ない被験者群の 2 つの群に明確に分割可能であった（図）。よって細菌付着量という点において白金加金合金が他の金属よりも優れていることが示唆された。アバットメントの選択には上皮との接着性や材料表面の硬度など、種々の要因を考慮する必要があり、様々な視点から材料の評価を行う必要があると考えられるが、今回そのひとつであるアバットメント材料に付着する細菌量や細菌種構成の相違を解析することができた。

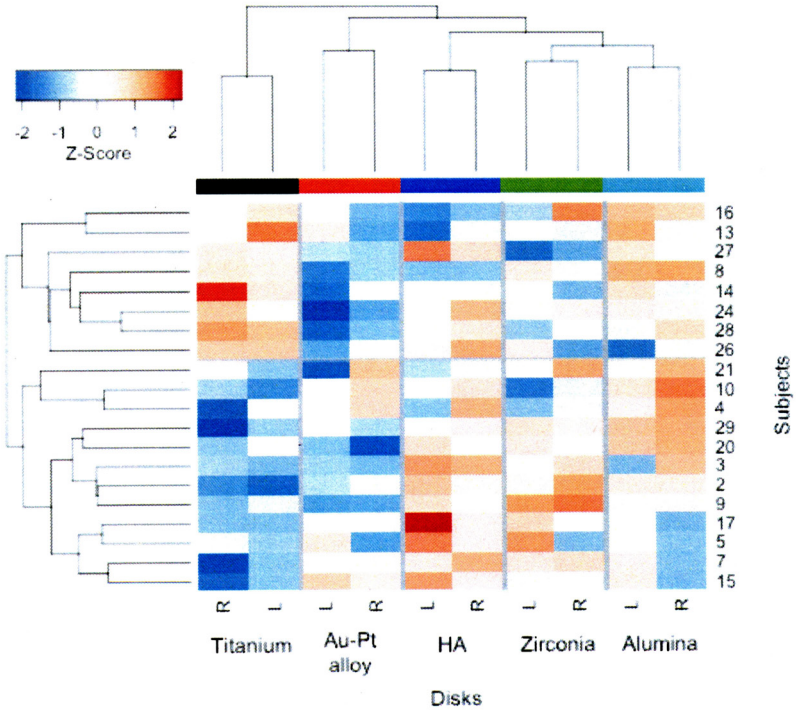
チタンに付着する細菌量に関しては、細菌の付着しやすい群と付着しにくい群の 2 群が認められた。第 2 章では、この結果に影響を与えている可能性があるいくつかの要素を検討した。すなわち第 1 章で解析を行った被験者 20 名に対し、口腔内状態、各被験者の唾液量、チップに付着した細菌の構成、唾液中の細菌量・細菌構成、生活習慣の調査を行い、チタンに細菌付着量が多い被験者と少ない被験者間の相違について統計的に解析を行った。その結果、口腔内状態、各被験者の唾液量、チップに付着した細菌の構成、唾液中の細菌量・細菌構成においては両群で有意な差は認められなかった。一方、口呼吸、ブラキシズムの習癖を有する被験者においては、有しない被験者より細菌付着が少ない傾向が見られた。この原因として、口呼吸やブラキシズムを有する者においては、チタン表面に対する酸素供給が十分に行われることにより、チタンの細菌増殖阻止効果が発揮されたことが仮説として構築可能であった。

ヒト口腔内において、チタン、白金加金、ジルコニア、アルミナ、ハイドロキシアパタイトに付着する細菌構成や細菌量に関して検討した結果、以下の項目が明らかになった。

・同一被験者内における材料の差より、同一材料における被験者の相違の方が細菌構成や付着量に影響を与えることが示唆された。

・白金加金合金に付着する細菌の量が、他の材料に比較して少ない傾向がみられた。

・チタンに関しては付着細菌量が多い被験者と少ない被験者の 2 群に分けることが可能であった。付着細菌量が多い被験者は、少ない被験者と比較して口呼吸、ブラキシズムの習癖と有意な関連性を有していた。



図：各材料における Z-score 化細菌付着量のクラスター解析
格子の色は細菌付着量を表している。青は他のチップと比較して同じ被験者で少ない細菌量を表し、赤は多い細菌量を表している。縦軸と横軸はそれぞれ被験者間の類似性、材料間の類似性を表している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

インプラント周囲炎は歯科インプラントの失敗の最も大きな原因とされており，インプラントの歯肉貫通部（アバットメント）周囲のプラーク蓄積による周囲組織の炎症と，それに引き続くインプラント支持骨の吸収を主な病態とする．アバットメントには，これまで加工性の高さから金属が使用されてきたが，審美的要求の高まりとともに CAD/CAM の手法を用いたセラミック材料も使用されるようになってきた．しかし，種々のアバットメント材料表面に付着するプラークの相違に関する知見はあまり報告されていないため，明確な細菌学的エビデンスがないまま，もっぱら審美的な材料が選択されているのが現状である．

そこで本研究は，種々のアバットメント材料に付着する細菌量や細菌叢の相違を明らかにすることを目的とした．

30 名のボランティアに対し，インプラントアバットメントに使用される材料であるチタン，白金加金，ジルコニア，アルミナおよびハイドロキシアパタイト（対照群）のチップを接着したマウスピースを作製し，4 日間装着させた．その後各材料表面に付着した細菌を解析した．

その結果，チップ間の細菌叢の違いより個人差の方が大きいことが示唆された．チタンに付着する細菌量に関して，細菌の付着しやすい群と付着しにくい群の 2 群が認められた．この結果に影響を与えている可能性があるいくつかの要素を検討したところ，口呼吸およびブラキシズムの有無に高い相関が認められた．

また，白金加金に付着する細菌量が他より少ない傾向がみられ，この点において白金加金合金が他の金属よりも優れていることが示唆された．しかし，アバットメントの選択には上皮との接着性や材料表面の硬度など，他の種々の要因を考慮する必要があり，様々な視点から材料の評価を行う必要があると考えられた．

以上のことから，調査委員合議の結果，学位論文としての価値があるものと判断した．

氏名・(本籍・国籍)	ふじ わら ひろ あき **藤 原 弘 明** (岡山県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５５３号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**Thymosin beta 4の導入による歯原性上皮細胞の誘導**
論 文 調 査 委 員	(主　査) 教 授　赤 峰 昭 文 (副　査) 教 授　中 西　博　教 授　高 橋 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

当研究室では、既にThymosin beta 4, X-linked(TMSB4X)が歯胚発生初期に特異的に発現することを報告し、歯原性因子の発現に深く関与している事を示した。本研究は、TMSB4X遺伝子を表皮由来の上皮細胞であるHaCaT細胞へ導入し、幹細胞変化を経ることなく、「Direct-reprogramming」もしくは「Re-expression」とよばれる方法により歯原性上皮細胞を樹立することを目的とした。

TMSB4X過剰発現株(high-TMSB4X細胞)では、Type II Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、Amelogenin, X-linked、Ameloblastin、EnamelinのmRNAと蛋白、Dentin matrix acidic phosphoprotein 1、Dentin sialophosphoproteinのmRNAの発現上昇が認められた。この細胞を用いて石灰化誘導培養を行ったところ、誘導3週後に細胞が重なりあった箇所が散見され、Alizarin-red SおよびvonKossa染色で陽性像を示した。さらにRUNX2の免疫細胞化学染色を行ったところ、同部位に陽性像を認めた。またhigh-TMSB4X細胞について形態学的検索、細胞増殖能の検定を行ったところ、細胞外観は上皮細胞様を呈しており、細胞増殖能はコントロールと比較して約1/2になっていた。細胞の分化度や幹細胞としての性質をみるためにCytokeratin (CK)や幹細胞関連因子を用いたReal-time PCR検索において、CK10、18には上昇傾向を認め、歯原性上皮細胞に近い性格がみられた。CK5、15、19はmRNA発現量の下降傾向が、幹細胞関連因子では、SRY(sex determining region Y)-box2は1因子を除き下降が、NanogとE-cadherinには上昇傾向が認められた。またhigh-TMSB4X細胞をヌードマウス背部皮下へ移植したところ、移植後6週目においてコントロールには細胞集団に角化傾向が顕著に認められたが、high-TMSB4X細胞には角化傾向が全く認められなかった。

以上の結果より、high-TMSB4X 細胞は歯原性因子を発現すること、石灰化誘導にて歯原性因子の関与と考えられる石灰化が生じたこと、ヌードマウス移植後の細胞変化としては角化能の消失が認められたことなどより、TMSB4X の導入により非歯原性上皮細胞は Direct-reprogramming もしくは Re-expression を起こして歯原性上皮細胞の性格を有する細胞への形質転換が生じた可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、Thymosin beta 4,X-linked (TMSB4X)遺伝子を表皮由来の上皮細胞であるHaCaT細胞へ導入し、幹細胞変化を経ることなく、「Direct-reprogramming」もしくは「Re-expression」とよばれる方法により、歯原性上皮細胞を樹立することを目的としている。

TMSB4X過剰発現株(high-TMSB4X細胞)では、Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、Amelogenin,X-linked、Ameloblastin、EnamelinのmRNAと蛋白、Dentin matrix acidic phosphoprotein 1、

Dentin sialophosphoproteinのmRNAの発現上昇が認められた。この細胞を用いて石灰化誘導培養を行ったところ、誘導3週後に細胞が重なりあった箇所が散見され、Alizarin-red Sおよびvon Kossa染色で陽性像を示した。さらに、RUNX2の免疫細胞化学染色を行ったところ、同部位に陽性像を認めた。また、high-TMSB4X細胞について形態学的ならびに細胞増殖能の検索を行ったところ、細胞形態は上皮細胞様を呈しており、細胞増殖能はコントロールと比較して約1/2になっていた。細胞の分化度や幹細胞としての性質をみるためにCytokeratin (CK)や幹細胞関連因子を用いたReal-time PCR検索において、CK10、CK18発現は上昇傾向を認め、歯原性上皮細胞に近い性質がみられた。CK5、CK15、CK19はmRNA発現量の下降傾向が、幹細胞関連因子では、SRY(Sex determining region Y)-box2発現は1クローンを除き下降が、NanogとE-cadherin発現は上昇傾向が認められた。また、high-TMSB4X細胞をヌードマウス背部皮下へ移植したところ、移植後6週目においてコントロールには細胞集団に角化傾向が顕著に認められたが、high-TMSB4X細胞には角化傾向は全く認められなかった。

以上の結果より、high-TMSB4X 細胞は歯原性因子を発現すること、石灰化誘導にて歯原性因子の関与と考えられる石灰化が生じたこと、ヌードマウス移植後の細胞変化としては角化能の消失が認められたことなどより、TMSB4X の導入により非歯原性上皮細胞は Direct-reprogramming もしくは Re-expression を起こして歯原性上皮細胞の性質を有する細胞への形質転換が生じた可能性が示唆された。このように、本研究は、歯の再生研究を進めていく上で非常に有意義な研究成果が得られている。従って、本研究は学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	いまじょう いくみ **今 城 育 美** (愛媛県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	歯博甲第５５４号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**口腔癌におけるBrachyury発現と上皮間葉移行の関与 —予後因子としての応用の可能性—**
論文調査委員	(主　査)　教　授　　中　村　誠　司 (副　査)　教　授　　樋　口　勝　規　　教　授　　坂　井　英　隆

論　文　内　容　の　要　旨

癌の浸潤・転移は治療を困難にする最も重要な因子である。転移には細胞生物学的にダイナミックな細胞特性の変化と多段階の過程を経ることが知られている。近年、その過程における上皮間葉移行 (EMT) の関与が数多く報告されている。さらにT-box転写因子のひとつであるBrachyuryがEMTを誘導することが報告された。しかし、臨床検体を用いてBrachyuryの発現とEMTの関連を検討した報告は、口腔癌を含むすべての癌腫においてこれまでに見られない。そこで、本研究では口腔癌の生検組織を用いてBrachyury、EMTと臨床的背景因子との関連、およびBrachyuryとEMTの関連について検討した。

腺様嚢胞癌 (AdCC) 21例・扁平上皮癌 (SCC) 152例の未治療生検組織におけるBrachyury、E-cadherin、Vimentinの発現様式を免疫組織化学的に検索した。腫瘍細胞におけるE-cadherinの発現低下とVimentinの発現をEMTと定義し、Brachyury の発現はその局在から、TypeⅠ: 陰性、TypeⅡ: 細胞質陽性、TypeⅢ: 核陽性、TypeⅣ: 核細胞質陽性の４つのパターンに分類した。臨床的背景因子として年齢、性別、部位、T分類、リンパ

節転移の有無、遠隔転移の有無、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式について検討した。

AdCC においては Brachyury 陽性率 100%（21／21 例）、Vimentin 陽性率 90.5%（19／21 例）E-cadherin 陽性率 90.5%（19／21 例）と症例の分布に偏りがあり、すべての臨床的背景因子との関連が認められず、Brachyury と EMT の関連は検討できなかった。E-cadherin のみ患者の 5 年生存率、無病生存率と負の相関を認めた（p<0.001, p=0.001）。

SCC において臨床的背景因子のうち Brachyury との関連を認めたものは、腫瘍の大きさ（T 分類）、リンパ節転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式（いずれも p<0.05）、E-cadherin との関連を認めたものはリンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式（いずれも p<0.05）、Vimentin においてはリンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の浸潤様式（いずれも p<0.05）に関連が認められた。Brachyury と EMT の関連を検討したところ、Brachyury と Vimentin の発現に関連が認められた（p=0.002）。どの因子が最もリンパ節転移、遠隔転移と相関するかロジスティック回帰分析を用いて単変量および多変量解析を行ったところ、リンパ節転移においては Brachyury（p=0.001, オッズ比 4.390）、Vimentin（p=0.005, オッズ比 3.368）に正の相関、E-cadherin（p=0.024, オッズ比 0.444）に負の相関が認められ、この順で強く相関していた。遠隔転移においては E-cadherin（p=0.001, オッズ比 0.113）に負の相関、Vimentin（p=0.012, オッズ比 4.558）に正の相関が認められ、この順で強く相関していた。遠隔転移と Brachyury には相関を認めなかった。また、患者の 5 年生存率、無病生存率について Kaplan-Meier 法にて検討を行ったところ、Brachyury、E-cadherin、Vimentin すべて強い相関が認められた。

AdCC においては症例数が少なく統計学的な解析ができなかったが、Brachyury 陽性率の高さは AdCC の高転移性を示す可能性があると考える。以上より Brachyury と EMT、転移および生存率の間に強い相関が示され、口腔癌特に SCC の予後因子として臨床応用可能であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

癌の浸潤・転移の過程に上皮間葉移行（EMT）が関与し、T-box 転写因子である Brachyury が EMT を誘導することが報告されている。しかし、臨床検体を用いて Brachyury の発現と EMT の関連を検討した報告はない。そこで本研究では、口腔癌の生検組織を用いて Brachyury の発現と EMT の臨床的背景因子との関連、さらには Brachyury の発現と EMT の関連について検討した。

対象は腺様嚢胞癌（AdCC）21 例と扁平上皮癌（SCC）152 例であり、未治療生検組織における Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現を免疫組織化学的に検索した。腫瘍細胞における E-cadherin と Vimentin の共発現を EMT と定義した。臨床的背景因子としては、年齢、性別、部位、T 分類、リンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式について検討した。

AdCC においては、Brachyury、Vimentin、E-cadherin はいずれも 90％以上の症例で発現がみられ、これらの発現と臨床的背景因子との関連は認められなかった。また、Brachyury の発現と EMT との関連も認められなかった。5 年生存率と無病生存率については、E-cadherin の発現のみ負の相関が認められた。

SCC においては、Brachyury の発現は T 分類、リンパ節転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式と、E-cadherin の発現はリンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式と、Vimentin の発現はリンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の浸潤様式と関連が認められた。Brachyury と EMT の関連を検討したところ、Brachyury と Vimentin の発現に関連が認められた。単変量および多変量解析を用いて解析したところ、リンパ節転移は Brachyury および Vimentin の発現と正の相関、E-cadherin の発現と負の相関が認められた。遠隔転移は E-cadherin の発現と負の相関、Vimentin の発現と正の相関が認められ、Brachyury の発現との相関は認められなかった。5 年生存率と無病生存率については、Brachyury と Vimentin の発現は正の相関、E-cadherin の発現は負の相関が認められた。

AdCC は全ての症例が高転移性で解析ができなかったが、この高転移性は Brachyury 陽性率が高いことによると考えられる。しかしながら、SCC では Brachyury の発現と EMT、転移および生存率との

間に強い相関がみられ、SCC の予後因子として臨床応用可能であると考えられた。以上のように、本研究は有為な研究成果を得ており、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	こばやしよう すけ 小 林 洋 輔 (福岡県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	歯博甲第５５５号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	T-box転写因子Brachyuryノックダウンによる新しい治療概念の確立 －腺様嚢胞癌における癌幹細胞を標的とした治療法の開発に向けて－
論文調査委員	(主　査) 教　授　樋 口 勝 規 (副　査) 教　授　吉 浦 一 紀　　教　授　中 西　　博

論　文　内　容　の　要　旨

本研究は、抗癌剤や化学療法に強い抵抗を示す腺様嚢胞癌について、癌幹細胞を標的とした治療法を検討することを目的として行われた。研究の背景として当分野では、培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS に 緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した細胞株 ACCS GFP から、高転移性で癌幹細胞形質を示す ACCS-M GFP を分離した。さらに、ACCS-M GFP の癌幹細胞形質の制御に T-box 転写因子 Brachyury および SOX2 が関与し、Brachyury は SOX2 の発現も抑制する癌幹細胞の制御因子であることを明らかにしている。本研究では、癌幹細胞 ACCS-M GFP を用いて Brachyury ノックダウンにより、①癌幹細胞の遊走能、浸潤能への効果② 抗癌剤、放射線に対する効果③ 造腫瘍性および転移能の抑制効果について検索し、以下の結果が得られた。

1. *in vitro* における Brachyury ノックダウンの腫瘍の浸潤に与える効果

ACCS-M GFP は *in vitro* (原発巣離脱モデル、Wound healing assay) において、ACCS GFP と比較して著明な浸潤能の亢進を認めた。ACCS-M GFP において、Brachyury あるいは SOX2 を short hairpin RNA (sh RNA) を用いてノックダウンすると (それぞれ ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP)、 ACCS-M sh Br. GFP は ACCS GFP と同程度まで浸潤能が抑制された。

2. *in vitro* における Brachyury ノックダウンが抗癌剤および放射線耐性に与える効果

ACCS-M GFP は ACCS GFP よりも抗癌剤に強い耐性をもつことが、生細胞率に基づいた抗癌剤感受性試験により確認された。ACCS-M sh Br. GFP では ACCS GFP と同程度まで抗癌剤耐性が減弱した。ACCS-M GFP は ACCS GFP と比較して放射線にも強い耐性を示すことが、生細胞率に基づいた放射線感受性試験により確認されたが、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP では ACCS GFP 程度まで放射線に対する耐性が減弱した。抗癌剤と放射線の同時併用を行うと、ACCS-M sh Br. GFP において抗癌剤耐性の減弱を認めた。ABC トランスポーター遺伝子の発現は ACCS-M GFP で発現亢進し、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP において発現が減弱した。

3. *in vivo* における Brachyury ノックダウンの造腫瘍性、転移能に与える効果

ヌードマウスを用いた造腫瘍性・転移能実験において ACCS-M GFP と比較して ACCS-M Br. sh GFP では、造腫瘍性 50%、転移能 0% に減弱しており、ACCS-M sh SOX2 GFP でも造腫瘍性 87.5%、転移能 87.5% に減弱した。

以上の結果から、Brachyury をノックダウンする事により、①癌幹細胞の浸潤抑制、②抗癌剤および放射線に対する耐性減弱、③造腫瘍性・転移能の抑制が可能であることが示唆され、癌幹細胞を標的とした遺伝子治療の有用な標的分子となり得ること考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、抗癌剤や化学療法に強い抵抗を示す腺様嚢胞癌について、癌幹細胞を標的とした治療法を検討することを目的として行われた。研究の背景として、当分野では、培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS に 緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入した細胞株 ACCS GFP から、高転移性で癌幹細胞形質を示す ACCS-M GFP を分離した。さらに、ACCS-M GFP の癌幹細胞形質の制御に T-box 転写因子 Brachyury および SOX2 が関与し、Brachyury は SOX2 の発現も抑制する癌幹細胞の制御因子であることを明らかにしている。本研究では、癌幹細胞 ACCS-M GFP を用いて Brachyury ノックダウンにより、①癌幹細胞の遊走能、浸潤能への効果② 抗癌剤、放射線に対する効果③ 造腫瘍性および転移能の抑制効果について検索し、以下の結果が得られた。

1. *in vitro* における Brachyury ノックダウンの腫瘍の浸潤に与える効果

ACCS-M GFP は *in vitro* (原発巣離脱モデル、Wound healing assay) において、ACCS GFP と比較して著明な浸潤能の亢進を認めた。ACCS-M GFP において、Brachyury あるいは SOX2 を short hairpin RNA (sh RNA) を用いてノックダウンすると (それぞれ ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP)、 ACCS-M sh Br. GFP は ACCS GFP と同程度まで浸潤能が抑制された。

2. *in vitro* における Brachyury ノックダウンが抗癌剤および放射線耐性に与える効果

ACCS-M GFP は ACCS GFP よりも抗癌剤に強い耐性をもつことが、生細胞率に基づいた抗癌剤感受性試験により確認された。ACCS-M sh Br. GFP では ACCS GFP と同程度まで抗癌剤耐性が減弱した。ACCS-M GFP は ACCS GFP と比較して放射線にも強い耐性を示すことが、生細胞率に基づいた放射線感受性試験により確認されたが、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP では ACCS GFP 程度まで放射線に対する耐性が減弱した。抗癌剤と放射線の同時併用を行うと、ACCS-M sh Br. GFP において抗癌剤耐性の減弱を認めた。ABC トランスポーター遺伝子の発現は ACCS-M GFP で亢進し、ACCS-M sh Br. GFP、ACCS-M sh SOX2 GFP において減弱した。

3. *in vivo* における Brachyury ノックダウンの造腫瘍性、転移能に与える効果

ヌードマウスを用いた造腫瘍性・転移能実験において ACCS-M GFP と比較して ACCS-M Br. sh GFP では、造腫瘍性 50%、転移能 0% に減弱しており、ACCS-M sh SOX2 GFP でも造腫瘍性 87.5%、転移能 87.5% に減弱した。

以上の結果から、Brachyury をノックダウンする事により、①癌幹細胞の浸潤抑制、②抗癌剤および放射線に対する耐性減弱、③造腫瘍性・転移能の抑制が可能であることが示唆され、癌幹細胞を標的とした遺伝子治療の有用な標的分子となり得ること考えられた。

本研究は、腺様嚢胞癌の治療に寄与する貴重な研究で、学位論文として十分に値するものである。

氏名・(本籍・国籍)	すぎやま ごろう **杉山悟郎**（大分県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５５６号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**タンパク質ホスファターゼPP1及びPP2Aの機能調節分子としてのPRIPの役割解明に関する研究**
論文調査委員	（主　査）教　授　中村誠司 （副　査）教　授　久木田敏夫　　教　授　樋口勝規

論　文　内　容　の　要　旨

タンパク質のリン酸化状態の変化は多岐にわたる細胞機能の重要な制御機構の一つである。リン酸化状態はキナーゼ（リン酸化）とホスファターゼ（脱リン酸化）の活性バランスによって厳密に調節されるが、ヒトでは数百種類のキナーゼが存在するのに対してホスファターゼはその十分の一にも満たない。ホスファターゼが様々なキナーゼの働きに特異的に対応するために、ホスファターゼの活性、基質特異性を調節するとともに時空間的に効率的な反応の場への動員などを調節する結合分子の多様性が重要だと考えられている。さて、研究室では細胞シグナリング研究から見出したタンパク質PRIP（phospholipase C-related, but catalytically inactive protein）がホスファターゼの主要なファミリーであるPP1ならびにPP2Aと複合体を形成すること示した。PRIPは他の結合分子と同様に、これらホスファターゼとの結合を介して細胞内のリン酸化シグナルの制御に関わることが予想される。しかし、２種類のホスファターゼの結合の相互関係などについては不明のままである。

そこで、本研究ではPRIPと両ホスファターゼの結合の相互関係について組換え精製タンパク質を用いた試験管内実験から、培養細胞を用いた実験に至るまで詳細に検討した。大腸菌発現系によりPP1、PP2Aそれぞれの触媒サブユニット（PP1c、PP2Ac）およびグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ（GST）を付加したPRIP-1（アミノ酸残基74-298；以下GST-PRIP-1）を調製し、プルダウンアッセイを行った。PP1c、PP2AcともにGST-PRIP-1と結合したが、両者のPRIPに対する結合は相互に排除的であった。したがってPP1cとPP2Acの結合部位は同一かあるいは立体的に近接していることが示唆された。PRIPに種々の変異を導入して同様の結合アッセイを行ったところ、PP1cとPP2Acとの結合に関与する領域は近接していたものの、直接に結合すると思われるアミノ酸は異なっていることが分かった。それぞれの酵素活性に及ぼす結合の影響も調べたところ、PP1cはPRIPとの結合によって抑制されたが、PP2Acは抑制されなかった。次にPRIPのリン酸化が両ホスファターゼとの結合に及ぼす影響を調べた。試験管内でGST-PRIP-1をプロテインキナーゼA（PKA）によりリン酸化するとPP1cの結合量は減少したが、PP2Acの結合量は変化しなかった。しかし両ホスファターゼが共存する実験系では、PP1cとの結合量の減少に伴ってPP2Acの結合量は増加した。両ホスファターゼを内在するものの、PRIPは内在しない培養細胞（アフリカミドリザル腎臓由来細胞株：COS7）にPRIP遺伝子（野生型とPP1cが結合出来ない変異体）を導入しそれぞれのタンパク質を発現させた細胞を、ホルスコリンで刺激した。細胞抽出液から抗PRIP抗体で免疫沈降し、共沈したPP1cやPP2Acを定量したところ、野生型PRIPを発現させた細胞ではホルスコリン処理によって試験管内実験と同様にPP1cの減少とPP2Acの増加を観察した。

以上より、PRIPには異なる２種類のホスファターゼの触媒サブユニットが相互排除的に直接結合し、その結合はPRIP自身のリン酸化によって調節されることが分かった。PRIPはホスファターゼの脱リン酸化酵素活性や細胞内局在などを制御する調節サブユニットとして機能することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

PRIP(phospholipase C-related, but catalytically inactive protein)は主要なホスファターゼであるPP1ならびにPP2Aと複合体を形成し、細胞内のリン酸化シグナルの制御に関わると考えられるが、2種類のホスファターゼとの結合の相互関係などについては判っていない。そこで、本研究ではPRIPと両ホスファターゼの結合の相互関係について検討した。

大腸菌発現系によりPP1とPP2Aのそれぞれの触媒サブユニットであるPP1cとPP2AcおよびグルタチオンS-トランスフェラーゼを付加したPRIP-1(GST-PRIP-1)を調製してプルダウンアッセイを行ったところ、PP1cとPP2Acはともに GST-PRIP-1と結合したが、両者のPRIPに対する結合は相互に排除的であった。PRIPに種々の変異を導入して同様の結合アッセイを行ったところ、PP1cとPP2Acとの結合に関与する領域は近接していたものの、直接に結合すると思われるアミノ酸は異なっていることが判った。それぞれの酵素活性に及ぼす結合の影響を調べたところ、PP1cはPRIPとの結合によって抑制されたが、PP2Acは抑制されなかった。

次にPRIPのリン酸化が両ホスファターゼとの結合に及ぼす影響を調べたところ、試験管内でGST-PRIP-1をプロテインキナーゼAによりリン酸化するとPP1cの結合量は減少したが、PP2Acの結合量は変化しなかった。しかし、両ホスファターゼが共存する場合には、PP1cとの結合量の減少に伴ってPP2Acの結合量は増加した。PRIPを内在しない培養細胞(COS7)にPRIP遺伝子を導入してホルスコリンで刺激し、抗PRIP抗体で共沈したPP1cやPP2Acを調べたところ、試験管内と同様にホルスコリン処理によってPP1cの減少とPP2Acの増加がみられた。

以上より、PRIPには異なる2種類のホスファターゼの触媒サブユニットが相互排除的に直接結合し、その結合はPRIP自身のリン酸化によって調節されることが分かった。本研究により、PRIPはホスファターゼの脱リン酸化酵素活性や細胞内局在などを制御する調節サブユニットとして機能することが示唆され、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	きたむらりょうじ 北村亮二(佐賀県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	歯博甲第557号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**口腔扁平上皮癌の分化におけるサイトケラチン17の発現に関する検討**
論文調査委員	(主査)教授　坂井英隆 (副査)教授　樋口勝規　　教授　森　悦秀

論文内容の要旨

口腔扁平上皮癌(oral squamous cell carcinoma: OSCC)は診断の遅れや、放射線療法および化学療法に抵抗性を持つOSCC細胞の存在により予後不良となることが多い。よって、OSCCを早期診断し、組織学的特徴を把握するために、より精度の高い診断方法を確立することが重要である。以前よりサイトケラチン(cytokeratin: CK)は固形癌の診断のためにその有用性が検討されているが、特にCK17は子宮頸部や喉頭の扁平上皮癌において過剰に発現していることが報告されている。そこで本研究は、OSCCにおいてCK17を含む7種類のCKの発現様式を解析した。また、OSCC

の分化に着目し、白板症や正常口腔粘膜上皮（normal oral epithelium: NOE）における発現について検討した。

Ⅰ．　OSCCや白板症、NOEにおけるCK17の発現

病理組織学的にOSCCと診断された105 例の生検組織材料を用い、7種類の抗CK抗体（抗CK13抗体、抗CK14抗体、抗CK16抗体、抗CK17抗体、抗CK18抗体、抗CK19抗体、抗CK20抗体）を用いて免疫組織化学的染色を行った。また、臨床的に白板症と診断された108例の生検材料を用い、抗CK17抗体と抗CK13抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。対照群としてNOE 10例を用いた。

OSCCにおける7種類のCKの発現頻度はCK13が3/105例（2.9%）、CK14が102/105例（97.1%）、CK16が60/105例（57.1%）、CK17が101/105例（96.2%）、CK18が21/105例（20.0%）、CK19が39/105例（37.1%）、CK20が22/105例（21.0%）であった。NOEにおける発現頻度はCK13が10/10例（100%）、CK14が10/10例（100%）、CK16が4/10例（40.0%）、CK17が0/10例（0%）、CK18が2/10例（20.0%）、CK19が4/10例（40.0%）、CK20が0/10例（0%）であった。CK17のみNOEにおいて発現を認めず、OSCCにおいて高発現した（$p<0.01$）。臨床病理学的所見と比較すると、低分化型よりも高分化型OSCCにおいて有意にCK17の発現を認めた（$p<0.01$）。また、CK17の発現頻度とその他の臨床病理学的所見との間に関連は認めなかった。白板症全体では55/108例（50.9%）においてCK17の発現を認めた。上皮性過形成を伴う（hyperplasia）症例では36/74例（48.6%）において発現を認めたのに対し、上皮性異形成を伴う（dysplasia）症例では19/34例（55.9%）において有意に発現頻度が高かった（$p<0.01$）。OSCCではほとんど発現がみられなかったCK13は、白板症全体では63/108例（58.3%）において発現を認めた。hyperplasia症例では52/74例（70.3%）において発現を認めたのに対し、dysplasia症例では11/34例（32.4%）において有意に発現頻度が低かった（$p<0.01$）。

Ⅱ．　OSCCの分化によるCK17の発現様式

CK17の発現とOSCC細胞の分化との関連を検索するため、上皮幹細胞のマーカーであり、低分化OSCC細胞との関連が示唆されるΔNp63を用いて免疫組織化学染色を行った。また、高分化型OSCC由来のHSC-2、低分化型OSCC由来のHSC-3およびSAS、OSCC再発症例由来のSQUU-A、同じく再発症例で高転移能を有するSQUU-Bといった5種類の細胞株におけるCK17 mRNA発現量をreal-time reverse transcriptase polymerase chain reaction（RT PCR）法にて解析し、OSCC細胞の分化の違いによるCK17 mRNAの発現の差異を検索した。ΔNp63の発現頻度は102/105例（97.1%）であり、核に特異的に発現していた。ΔNp63は上皮基底層や癌胞巣の最外層に発現し、癌胞巣の内側に発現するCK17とは相対する発現を認めた。ΔNp63の発現様式とOSCCの臨床病理学的所見との間に有意な発現はみられなかった。HSC-2におけるCK17 mRNA発現量は、HSC-3およびSASと比較して有意に多かった（$p<0.01$）。また、SQUU-BよりSQUU-Aにおいて発現量が有意に多かった（$p<0.01$）。以上から、CK17は高分化なOSCC細胞に発現することが示唆された。

CK17は正常上皮と比較して異型上皮やOSCCにおいて発現頻度が上昇し、OSCCでは臨床病理学的に分化との関連が認められた。さらに、CK17は高分化OSCC細胞株に高発現していた。以上から、CK17は悪性度の低い高分化型OSCCのマーカーであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）、白板症（上皮性過形成、hyperplasiaと上皮性異形成、epithelial dysplasia）、正常口腔粘膜上皮（normal oral epithelium: NOE）におけるサイトケラチン（cytokeratin: CK）の発現について免疫組織化学的手法により検索し、以下のような結果を得た。

１．検索した７種類のCKのうち、CK13とCK17はNOE、白板症、OSCCでそれぞれ特徴的な発現状況を示した。CK13はNOE、上皮性過形成、上皮性異形成、OSCC、の順に発現頻度が低下した。一方CK17は、NOEでは発現を認めず、上皮性過形成、上皮性異形成、OSCC、の順に発現頻度が上昇した。また上皮性過形成と上皮性異形成との比較では、CK13は上皮性過形成で発現頻度か高く、CK17は上皮性異形成で高いという負の相関示し、CK13とCK17の免疫染色を併用することにより正確な上皮性異形成の診断が可能となることが示唆された。

２．上皮幹細胞のマーカーであるΔNp63を用いて免疫組織化学染色を行い、CK17との比較を行った結果、ΔNp63は上皮基底層や癌胞巣の最外層に発現し、癌胞巣の内側に発現するCK17とは相対する発現を認めた。分化度の異なる癌組織から樹立された細胞株を用いてCK17のmRNA発現を定量解析した結果、分化度の高い癌組織から樹立された細胞にCK17の高い発現がみられ、CK17は分化度の高いOSCC細胞のマーカーであることがわかった。

以上の結果は口腔癌の多段階発癌過程におけるCK発現の変化、および口腔癌組織の分化度との関連性など、口腔癌の生物学的特性に新たな知見を示したものであり、学位に相当する業績と判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ご とう ゆう いち **後 藤 雄 一** (大分県)
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	歯博甲第５５８号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における△Np63を介した上皮-間葉転換に関する研究**
論 文 調 査 委 員	（主　査）教　授　久木田　敏　夫 （副　査）教　授　平　田　雅　人　　教　授　森　　悦　秀

論　文　内　容　の　要　旨

近年、癌抑制遺伝子 p53 のホモログであるΔNp63 が、器官発生に必須である上皮- 間葉転換（epithelial-to-mesenchymal transition: EMT）に関与していることが報告されている。EMT が誘導された細胞は線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現量減少、間葉系マーカーの発現量増加、遊走能の亢進、増殖能の低下、細胞間接着の減弱などの表現型を示し、このような細胞特性が癌の浸潤・転移に寄与していることが最近の研究により示唆されている。しかしながら、その分子機構については明らかではない。本研究では、口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）の浸潤・転移の分子機構を解明するために、浸潤・転移におけるΔNp63 を介した EMT の関与について検討を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. OSCC 細胞株における ΔNp63 の発現および機能に関する研究

OSCC 細胞株（HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS）およびヒト胎児由来腎細胞（HEK293）を用いて、ΔNp63、上皮系マーカーである E-cadherin、cytokeratin (CK) 5 および CK14、間葉系マーカーである vimentin と N-cadherin の発現を検討した。その結果、ほとんどの細胞株においてΔNp63 の発現を認めたが、高転移株である SQUU-B 細胞ではΔNp63 の発現を認めず、vimentin の発現を認めた。次に、OSCC 細胞の増殖、分化、および遊走におけるΔNp63 の機能について検討した。まず、ΔNp63 を高発現していた HSC-2 細胞に small interfering RNA（siRNA）を導入し、*ΔNp63* をノックダウンしたところ、多角形であった HSC-2 の細胞形態が紡錘形へと変化

し、細胞増殖活性の低下および遊走能の亢進が認められた。また、上皮系マーカーの発現量は減少し、間葉系マーカーの発現量は増加した。次に、ΔNp63 の発現を認めなかった SQUU-B 細胞に *ΔNp63* 発現ベクターを導入し、同様に機能解析を行った。その結果、empty ベクターを導入した SQUU-BC 細胞は紡錘形であったのに対し、*ΔNp63* を過剰発現させた SQUU-BO 細胞は多角形に変化し、SQUU-BC 細胞と比較して細胞増殖活性の亢進、遊走能の低下、上皮系マーカーの発現量増加、および間葉系マーカーの発現量減少を認めた。

2. OSCC 生検材料における ΔNp63、vimentin および E-cadherin の免疫組織化学的検討

OSCC 生検材料における ΔNp63、E-cadherin および vimentin の発現を免疫組織化学的に検索した。腫瘍中心部では、ΔNp63 と E-cadherin は癌細胞のほぼ全てに発現を認めたが、浸潤先端部では両者の発現が減弱している癌細胞を認め、これらの細胞では vimentin の発現が亢進していた。次に、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率を算出し、臨床病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、vimentin 陰性群（<5%）に比べ、陽性群（≥5%）では、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。また、浸潤先端部の癌細胞における ΔNp63 発現強度の減弱の有無についても同様に検討を行ったところ、ΔNp63 発現強度の減弱を有する群では頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度の発生頻度が有意に高かった。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率は、vimentin 陽性群および ΔNp63 の発現強度の減弱を有する群は、vimentin 陰性群および ΔNp63 の発現強度の減弱を認めない群とそれぞれ比較して有意に低く、予後不良であった。

本研究により、OSCC 細胞において ΔNp63 の発現減弱が EMT を誘導し、間葉系細胞様の形質獲得に関与していることが示された。また、生検材料の浸潤先端部で ΔNp63 および E-cadherin の発現が減弱し、vimentin の発現が亢進している癌細胞を認めたことから、EMT が誘導されている可能性が示された。さらに、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率および ΔNp63 の発現強度の減弱の有無は、頸部リンパ節転移や遠隔転移と強い関連を示した。以上より、ΔNp63 を介した EMT は OSCC の浸潤・転移に関与することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである ΔNp63 が、器官発生に必須である上皮ー間葉転換（epithelial-to-mesenchymal transition: EMT）に関与していることが報告されている。EMT が誘導された細胞は線維芽細胞様の形態変化、上皮系マーカーの発現量減少、間葉系マーカーの発現量増加、遊走能の亢進、増殖能の低下、および細胞間接着の減弱などの表現型を示し、このような細胞特性が癌の浸潤・転移に寄与していることが最近の研究により示唆されている。しかしながら、その分子機構については明らかではない。本研究では、口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）の浸潤・転移の分子機構を解明するために、浸潤・転移における ΔNp63 を介した EMT の関与について検討を主たる目的とした。

1. OSCC 細胞における ΔNp63 の発現および機能解析：OSCC 細胞株（HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS）およびヒト胎児由来腎細胞（HEK293）を用いて ΔNp63、上皮系マーカーである E-cadherin、cytokeratin（CK）5、および CK14、間葉系マーカーである vimentin と N-cadherin の発現を検討した。その結果、ほとんどの細胞株において ΔNp63 の発現を認めたが、高転移株である SQUU-B では ΔNp63 の発現を認めず、vimentin の発現を認めた。次に、OSCC 細胞の増殖、分化、および遊走における ΔNp63 の機能について検討した。まず、ΔNp63 を高発現していた HSC-2 に siRNA を導入し、ΔNp63 をノックダウンしたところ、多角形であった HSC-2 の細胞形態が紡錘形へと変化し、細胞増殖活性の低下、遊走能の亢進が認められた。また、上皮系マーカーの発現量は減少し、間葉系マーカーの発現量は増加した。次に、ΔNp63 の発現を認めなかった SQUU-B に ΔNp63 発現ベクターを導入し、同様に機能解析を行った。その結果、紡錘形であった細胞形態は多角形に変化し、細胞増殖活性の亢進、遊走能の低下、上皮系マーカーの発現量は増加し、間葉系マーカーの発現量は減少した。

2. OSCC 生検材料における ΔNp63、vimentin、および E-cadherin の免疫組織化学的検討：OSCC 生検材料における ΔNp63、E-cadherin、および vimentin の発現を免疫組織化学的に検索した。OSCC において、ΔNp63 および E-cadherin は癌細胞のほぼ全てに発現を認めたが、浸潤先端部では ΔNp63 および E-cadherin の発現が減弱している癌細胞を認め、これらは vimentin の発現が亢進していた。次に、浸潤先端部の癌細胞における vimentin 陽性率を算出し、臨床病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、vimentin 陰性群（<5%）に比べ陽性群（≥5%）において、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。また、浸潤先端部の癌細胞における ΔNp63 発現減弱の有無についても同様に検討を行ったところ、ΔNp63 発現減弱を有する群においてこれらの発生頻度が有意に高かった。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率において、vimentin 陽性群および

ΔNp63の発現減弱を有する群はvimentin陰性群およびΔNp63の発現減弱を認めない群と比較して有意に低く、予後不良であった。本研究により、OSCC細胞においてΔNp63の発現減弱がEMTを誘導し、間葉系細胞様の形質発現に関与していることが示された。また生検材料においても、浸潤先端部でΔNp63およびE-cadherinの発現が減弱し、vimentinの発現が亢進している癌細胞を認めたことから、EMTが誘導されている可能性が示された。さらに、浸潤先端部の癌細胞におけるvimentin陽性率およびΔNp63の発現減弱の有無は、頸部リンパ節転移や遠隔転移と強い関連を示した。以上より、ΔNp63を介したEMTはOSCCの浸潤・転移に関与することが示唆され、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	はらだ　しおり **原　田　志　織**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５５９号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Differential activation of proapoptotic molecules between mouse and rat models of distal motor trigeminal denervation（三叉神経運動枝除神経モデルにおけるラットとマウスのアポトーシス関連分子活性の差異）
論文調査委員	（主　査）教　授　中　西　　博 （副　査）教　授　坂　井　英　隆　　教　授　二ノ宮　裕　三

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］口腔外科領域における進行癌の手術における欠損部の再建法として、現在血管吻合を用いた筋皮弁移植術が行われているが、咀嚼、嚥下、構音といった機能的再建は充分ではない。その原因として、移植した筋皮弁には適切な神経支配が再生されないことが挙げられる。これを改善するためには末梢における軸索再生を促すとともに中枢における運動神経細胞死を防ぐことが必要である。我々は先行研究で、中枢における神経細胞の保護療法に向けた基礎的知見を得るべく、口腔外科手術後の状態を模倣したラット咬筋・側頭筋切除による三叉神経運動枝除神経モデルを作出した。ラット傷害側三叉神経運動核は萎縮したが、神経細胞に中心性染色質融解やアポトーシスは観察されず細胞死は明らかでなかった。しかし樹状突起およびシナプスに変性が生じており、障害側運動核には軸索損傷により変性応答が起こっていることが明らかとなった。運動神経の軸索損傷では、ラットに比べてマウスの方が運動核神経細胞の脆弱性が高いことが報告されている。そこで今回我々は、マウスで同様のモデルを作成し、三叉神経運動核の変性過程についてラットモデルと比較した。

［材料および方法］成体マウスおよびラットの咬筋・側頭筋切除により三叉神経運動枝の除神経モデルを作成した。術後3, 7, 14, 28, 42, 56日に三叉神経運動核の病理学的変化を免疫組織化学的に検討した。

［結果］マウス、ラットともに術後経過が進むにつれて三叉神経運動核は萎縮する傾向にあったが、神経細胞の減少は明らかではなかった。p53に発現誘導されるアポトーシス誘導因子Noxaは術後1週目で神経細胞に発現し、経時的に発現が亢進し、8週目ではラットに比べマウスでより強い発現を認めた。また、マウスではcleaved caspase-3が持続的に発現していたがラットではその発現を認めなかった。ところが、核内でDNA断片化を引き起こすcaspase非依存性アポトーシス誘導因子であるapoptosis-inducing factor (AIF)は、マウス、ラットともにその活性化を表す核内移行を示さなかった。

［考察と結論］マウスとラットにおいて軸索損傷後の運動神経のアポトーシス経路の活性化に違いがあることが分かった。我々のモデルではcaspase非依存性アポトーシス経路の活性化が起こらな

いことや、既発表の軸索損傷モデルと比べて遠位で軸索を損傷したため長い距離に渡って軸索が残存することが運動神経細胞の生存に関与している可能性がある。今後、口腔外科手術後の末梢神経障害に対する神経保護機構の解明および神経保護戦略への一助となる知見と考える。

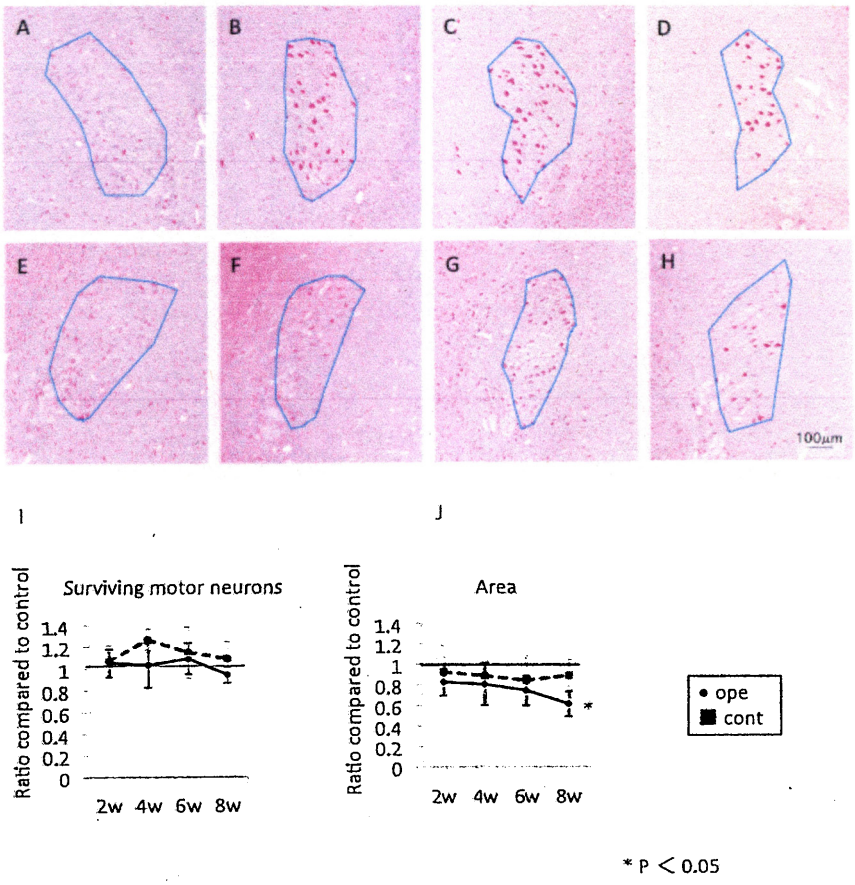


図１A-J　マウス三叉神経運動核の経時的組織学的変化

左側咬筋、側頭筋切除術後２週（A、E）、４週（B、F）、６週（C、G）、８週（D、H）のマウス三叉神経核の代表的なパラフィン切片 HE 染色像。同側（A、B、C、D）と反対側（E、F、G、H）を示す。同側で核のサイズ減少はみられるが、神経細胞の消失は明らかではない。定量的解析（I、J）では術後８週で同側三叉神経運動核はサイズが縮小するが、運動神経細胞の数に有意な変化はみられない。データは平均値±標準誤差を示す（n = 3; *P < 0.05）。スケールバー: 100 μ m (A-H)

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

口腔外科手術による末梢神経損傷後の中枢における神経核の病理的変化を明らかにするため、先行研究としてラット咬筋・側頭筋切除による三叉神経運動枝除神経モデルを用いて解析を行ってきた。しかし、この病理的変化には種差があることが知られており、ラットと比較してマウスの方が軸索損傷に対する運動神経細胞の脆弱性が高いことが報告されている。そこで本研究では、マウスで同様のモデルを作製し、三叉神経運動核の変性過程についてラットモデルとの比較を行った。

成体マウスおよびラットの咬筋・側頭筋切除により三叉神経運動枝の除神経モデルを作成し、術後 3、7、14、28、42、56 日に三叉神経運動核を組織学的に検討した。その結果、マウスならびにラットともに術後経過が進むにつれて三叉神経運動核は萎縮する傾向にあったが、神経細胞数の減少は明らかではなかった。軸索切断によりマウス運動神経に

誘導されるアポトーシス誘導因子であるNoxaは術後1週目で神経細胞に発現し、経時的に発現が亢進し、8 週目ではラットに比べマウスでより強い発現が認められた。また、マウスでは主要なアポトーシス実行因子であるcleaved caspase-3が持続的に発現していたが、ラットではその発現は認められなかった。一方、核内で DNA 断片化を引き起こすアポトーシス誘導因子である apoptosis-inducing factor (AIF)は、マウス、ラットともにその活性化を表す核内移行を示さなかった。

以上、本研究よりマウスとラットにおいて軸索損傷後の運動神経のアポトーシス経路の活性化に違いがあることが明らかとなった。本研究で用いたモデルでは caspase 非依存性アポトーシス経路の活性化が起こらないことや、既発表の軸索損傷モデルと比べて遠位で軸索を損傷したため長い距離に渡って軸索が残存することが運動神経細胞の生存に関与している可能性が示唆された。これらの知見は、今後、口腔外科手術後の末梢神経障害に対する神経保護戦略の一助となるものと考えられる。従って、本論文は学位論文に値するものと判断される。

氏名・(本籍・国籍)	まえはら　たかし **前　原　　隆**（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５６０号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**シェーングレン症候群とミクリッツ病の病態形成におけるThサブセットの関与に関する研究**
論文調査委員	（主　査）教　授　久木田　敏　夫 （副　査）教　授　中　西　　博　　教　授　平　田　雅　人

論　文　内　容　の　要　旨

シェーグレン症候群（Sjögren’s syndrome: SS）は、唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患である。導管周囲へのリンパ球浸潤を特徴とし、さらに病態進展とともに胚中心（germinal center: GC）を形成することもあり、様々な浸潤様式を呈する。SSの発症や病態進展の機序についての詳細は不明な点が多いが、ヘルパー T（Th）細胞の産生するサイトカインの関与が報告されている。そこで、本研究では第一に、自己免疫疾患に重要な役割を果たすといわれている Th サブセットが産生する特異的なサイトカインおよび転写因子に着目し、SS 患者の口唇腺（labial salivary gland: LSG）におけるこれらの分子の発現について検討した。さらに、病態進展のメカニズムを解析するために、Laser Capture Microdissection（LCM）を用いて同一患者の浸潤様式の異なる部位を分離採取し、Th サブセットの発現と局在について検討を行った。

一方、ミクリッツ病（Mikulicz’ disease: MD）は、涙腺や唾液腺の腫脹を特徴とし、病理組織学的類似性から SS の一亜型として認識されてきた。しかし近年、MD に高免疫グロブリン(Immunoglobulin: Ig) G4 血症や腺組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤が認められることから、MD は SS と全く異なった機序で生じる疾患であることが示唆されている。また、MD のもう一つの特徴として、腫脹した腺組織における GC の形成が SS より高頻度に認められることが挙げられる。最近の報告では、一般に GC 形成には Tfh が産生する IL-21 が必須とされており、さらにIgG4 へのクラススイッチにも関与するといわれている。そこで、本研究では第二に、MD 患者のLSG における IL-21 の発現を検索し、GC 形成や IgG4 産生との関連について検討を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. SS 患者の LSG における Th サブセットの発現と局在の検討

SS 患者 54 例と健常者 16 例を対象とした。real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて Th1、Th2、Th17、regulatory T: Treg、および follicular helper T: Tfh 特異的なサイトカインおよび転写因子について messenger RNA (mRNA) 発現を検討したところ、SS 患者の LSG では健常者と比較して、全ての Th サブセット関連分子の発現が亢進していた。また、SS 患者をリンパ球の浸潤程度で軽度と重度の 2 群に分け比較したところ、重度では Th2 関連分子 (IL-4、GATA binding protein 3: GATA3) および Tfh 関連分子 (B cell lymphoma-6: Bcl-6) の発現が亢進していた。次に病態進展のメカニズムを解析するために、同一患者での導管周囲の病変局所と GC 形成部における Th サブセットの発現を比較検討した。SS 患者 54 例のうち、LSG の新鮮結切片において GC の形成が認められた 8 例を対象とした。新鮮凍結切片において導管周囲に浸潤しているリンパ球を GC (-) とし、GC および GC 周囲のリンパ球を GC (+) として、それぞれ LCM を用いて分離採取した。同一患者での GC (-) と GC (+) の 2 群において real-time PCR 法を用いて、Th サブセット関連分子の mRNA 発現を検討した。その結果、Th1 関連分子 (interferon-γ: IFN-γ、IL-12、T box transcription factor: T-bet) および Th17 関連分子 (IL-17、retinoic acid-related orphan receptor C2: RORC2) の発現は、GC (-) で亢進していた。一方、Th2 関連分子 (IL-4, GATA3) および Tfh 関連分子 (IL-21、Bcl-6) の発現は、GC (+) で亢進していた。Treg 関連分子については、両群間で有意な差は認めなかった。免疫組織化学染色でも同様に、IFN-γ および IL-17 は GC (-) に、IL-4 および Bcl-6 は GC (+) に強く発現していた。また、forkhead box p3 (Foxp3) の発現は、両群間で明らかな差は認められなかった。

2. MD 患者の LSG における GC 形成と IgG4 産生に関わる分子の検討

MD 患者 12 症例、SS 患者 15 症例、健常者 15 症例を対象とした。検討した MD は、全症例 LSG のリンパ球浸潤程度が重度であるため、比較対象とした SS は、全て重度の症例を選択した。まず real-time PCR 法を用いて、 Tfh 関連分子 (IL-21、Bcl-6、CXC chemokine receptor: CXCR5) について検討を行った。その結果、すべての Tfh 関連分子の発現は、SS および MD とも健常者と比べて有意に亢進していた。また、免疫組織化学染色にてそれらの局在をみたところ、SS 患者ではすべての Tfh 関連分子は、GC のみに強く発現していた。一方 MD 患者では、Bcl-6 および CXCR5 は、SS 患者と同様に GC に強く発現していたが、IL-21 は LSG 全体に強い発現を認めた。つまり、MD における IL-21 産生細胞は Tfh の他にもある可能性が示唆された。IL-21 は主に Tfh が産生するといわれているが、その他にも IL-21 産生能を有するとの報告がある Th2 および Th17 についても、同様の検討を行った。その結果、MD では、免疫組織化学染色にて Th2 関連分子 (IL-4、CC chemokine receptor 4: CCR4、c-Maf) は、IL-21 と同様に GC だけでなく LSG 全体に強い発現を認めた。一方、Th17 関連分子 (IL-17) は、ほとんど発現を認めなかった。また、MD の IgG4 産生と IL-21 との相関をみたところ、IL-21 の mRNA 発現量は、IgG4 の mRNA 発現量および IgG4 陽性細胞率と正の相関を認めた。

研究 1. より、SS 患者の唾液腺では Th サブセットの局在が認められ、Th1 および Th17 が導管周囲に集積することで SS の発症に関与し、Th2 および Tfh が集積することで病態の進展、特に GC の形成に関与していることが示された。また研究 2. より、MD 患者の唾液腺では Th2 を主体とする IL-21 の産生により高頻度に GC が形成され、IgG4 へのクラススイッチが誘導されることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

シェーグレン症候群 (Sjögren's syndrome: SS) は、唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害を受ける臓器特異的自己免疫疾患である。導管周囲へのリンパ球浸潤を特徴とし、さらに病態進展と

もに胚中心（germinal center: GC）を形成することもあり、様々な浸潤様式を呈する。SS の発症や病態進展の機序について、ヘルパー T（Th）細胞の産生するサイトカインの関与が報告されている。本研究では自己免疫疾患に重要な役割を果たすといわれている Th サブセットが産生する特異的なサイトカインおよび転写因子に着目し、SS 患者の口唇腺（labial salivary gland: LSG）におけるこれらの分子の発現について検討した。病態進展のメカニズムを解析するために、Laser Capture Microdissection（LCM）を用いて同一患者の浸潤様式の異なる部位を分離採取し、Th サブセットの発現と局在について検討を行った。SS 患者の LSG おける Th サブセットの発現と局在を検討した結果、Th1 関連分子（interferon-γ: IFN-・、IL-12、T box transcription factor: T-bet）および Th17 関連分子（IL-17、retinoic acid-related orphan receptor C2: RORC2）の発現は、GC 以外の部位で亢進していた。一方 Th2 関連分子（IL-4, GATA3）および Tfh 関連分子（IL-21、Bcl-6）の発現は、GC で亢進していた。Treg 関連分子については、両群間で有意な差は認めなかった。免疫組織化学染色でも同様に、IFN-・および IL-17 は GC 以外の部位で、IL-4 および Bcl-6 は GC に強く発現していた。一方、ミクリッツ病（Mikulicz' disease: MD）は、涙腺や唾液腺の腫脹を特徴とし、病理組織学的類似性から SS の一亜型として認識されてきた。しかし近年、MD に高免疫グロブリン（Immunoglobulin: Ig）G4 血症や腺組織への IgG4 陽性形質細胞の浸潤が認められることから、MD は SS と全く異なった機序で生じる疾患であることが示唆されている。また、MD のもう一つの特徴として、腫脹した腺組織における GC の形成が SS より高頻度に認められることが挙げられる。最近の報告では、一般に GC 形成には Tfh が産生する IL-21 が必須とされており、さらに IgG4 へのクラススイッチにも関与するといわれている。本研究では MD 患者の LSG における GC 形成と IgG4 産生に関わる分子の検討を行なった結果、すべての Tfh 関連分子の発現は、SS および MD とも健常者と比べて有意に亢進していた。また、免疫組織化学染色にてそれらの局在をみたところ、SS 患者ではすべての Tfh 関連分子は、GC のみに強く発現していた。一方 MD 患者では、Bcl-6 および CXCR5 は、SS 患者と同様に GC に強く発現していたが、IL-21 は LSG 全体に強い発現を認めた。Th2 および Th17 についても検討した。その結果、MD では免疫組織化学染色にて Th2 関連分子（IL-4、CC chemokine receptor 4: CCR4、c-Maf）は IL-21 と同様に GC だけでなく LSG 全体に強い発現を認めた。一方、Th17 関連分子（IL-17）はほとんど発現を認めなかった。また、MD の IgG4 産生と IL-21 との相関をみたところ、IL-21 の mRNA 発現量は、IgG4 の mRNA 発現量および IgG4 陽性細胞率と正の相関を認めた。本研究より、SS 患者の唾液腺では Th サブセットの局在が認められ、Th1 および Th17 が導管周囲に集積することで SS の発症に関与し、Th2 および Tfh が集積することで病態の進展、特に GC の形成に関与していることが示された。また MD 患者の唾液腺では Th2 を主体とする IL-21 の産生により高頻度に GC が形成され、IgG4 へのクラススイッチが誘導されることが示唆され、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	た なか ひろ と 田 中 寛 人 (福岡県)
学 位 の 種 類	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	歯博甲第５６１号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Phospholipase C-related catalytically inactive proteinによるGABA$_A$受容体の発現調節が摂食調節中枢に与える影響に関する研究
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授　中 村 誠 司 (副 査) 教 授　野 中 和 明　教 授　森　悦 秀

論 文 内 容 の 要 旨

GABA$_A$受容体は、中枢神経における主要な抑制性神経伝達系として機能し、精神的および行動的状態を含めて脳機能を多面的に調節している。GABA$_A$受容体は5つのサブユニットからなるヘテロ5量体構造をとっており、その構成サブユニット、特にαサブユニットの多様性がGABA$_A$受容体の生理学的・薬理学的な応答特性を決定している。phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) は、D-*myo*-イノシトール 1,4,5-三リン酸結合性タンパク質として単離された新規分子であり、これまでに我々は、PRIPがγサブユニットを含むGABA$_A$受容体の細胞内輸送系を調節する機能分子であることを、*PRIP* ノックアウト (PRIP-KO) マウスを用いて明らかにしてきた。PRIP-KOマウスは、ジアゼパムに対する感受性が低下しており、本研究では、まずジアゼパム感受性受容体が構築される分子基盤について詳しく検討した。

PRIP-KOマウスのGABA$_A$受容体の各サブユニットの発現量を測定したところ、小脳におけるα6サブユニットのmRNAおよびタンパク質の発現量が有意に増加していた。しかし、他のサブユニットの発現量に変化は認めなかった。ラジオアイソトープを用いたリガンド結合実験を行ったところ、PRIP-KOマウスにおいて、ジアゼパム非感受性GABA$_A$受容体 (α6/γ2サブユニット構成) の発現が増加し、一方ジアゼパム感受性GABA$_A$受容体 (α1/γ2サブユニット構成) の発現が減少していることが明らかとなった。更に、電気生理学的研究によって、PRIP-KOマウスの小脳顆粒細胞では、ジアゼパムに対するGABA$_A$受容体の応答が低下していることを確認した。これらの結果から、減少したα1/γ2サブユニットを含むGABA$_A$受容体に換わって、α6/γ2サブユニットからなるGABA$_A$受容体が機能していると結論した。

さて、PRIP-KOマウスの解析の結果、野生型に比べて体重が減少しているにもかかわらず摂餌量が多いことが分かった。PRIP-KOマウスは末梢における脂肪代謝が亢進し、その結果体重が減少していると考えられるものの、血中遊離脂肪酸濃度は増加しており、このことが摂餌量の増加の原因である可能性は低い。そこでPRIPの遺伝子欠損によるGABA$_A$受容体の機能変化が、摂食行動の中枢神経系による制御に対して、どの様に影響するかについて検討した。PRIP-KOマウスの感覚機能としての4基本味に対する嗜好性に有意な差はなかった。また、自発運動量および顎運動機能を測定した結果、これらの運動機能についても野生型マウスと有意な差を認めなかった。そこで、摂食中枢におけるGABA$_A$受容体の機能変化を明らかにするために、弓状核近傍の第3脳室にブレタゼニル (α/γサブユニットリガンド) を投与して摂餌量変化を観察した。すると、野生型マウスにおいてブレタゼニル投与で増加した摂餌量は、PRIP-KOマウスではその増加率は有意に低かった。一方、ムシモール (α/βサブユニットリガンド) を投与して同様の実験を行ったところ、PRIP-KOマウスで野生型マウスに比べて摂餌量の増加を認めた。よって、PRIP-KOマウスで観察された摂餌量亢進には、摂食中枢におけるGABA$_A$受容体のサブユニット構成の変化が関与している可能性が示された。

PRIP-KOマウスで観察されたジアゼパムに対する感受性の低下とGABAリガンドに対する感受性亢進は、PRIPの欠損による$GABA_A$受容体の細胞内輸送が変調した結果、細胞膜表面の$GABA_A$受容体のサブユニット構成が変化することに起因すると考えられる。PRIPが仲介するこうした変化は、摂食中枢が制御する摂食行動調節にも関与していることが本研究から明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

phospholipase C-related catalytically inactive protein（PRIP）は$_D$-*myo*-イノシトール1,4,5-三リン酸結合性タンパク質であり、$GABA_A$受容体の細胞内輸送系を調節する機能分子である。PRIPノックアウト（PRIP-KO）マウスではジアゼパムに対する感受性が低下することと摂餌量が多いことが判っているので、本研究ではジアゼパム感受性受容体が構築される分子基盤とその摂食行動への関与を検討した。

PRIP-KOマウスの$GABA_A$受容体の構成サブユニットの発現量を測定したところ、小脳におけるα6サブユニットのmRNAおよびタンパク質の発現量は有意に増加していた。しかし、他のサブユニットの発現量には変化はなかった。ラジオアイソトープを用いたリガンド結合実験を行ったところ、PRIP-KOマウスではジアゼパム非感受性$GABA_A$受容体（α6/γ2サブユニット構成）の発現が増加していたが、ジアゼパム感受性$GABA_A$受容体（α1/γ2サブユニット構成）の発現は減少していた。さらに、PRIP-KOマウスの小脳顆粒細胞では、ジアゼパムに対する$GABA_A$受容体の電気生理学的応答が低下していた。

次に、PRIP-KOマウスにおける$GABA_A$受容体の機能変化が摂食行動の中枢神経系による制御に影響を及ぼしているかどうかを検討した。弓状核近傍の第3脳室にブレタゼニル（α/γサブユニットリガンド）を投与して摂餌量変化を観察したところ、野生型マウスではブレタゼニル投与で摂餌量が明らかに増加したが、PRIP-KOマウスでは摂餌量の増加は軽度であった。一方、ムシモール（α/®サブユニットリガンド）を投与したところ、PRIP-KOマウスでは野生型マウスに比べて摂餌量のより明らかな増加を認めた。

PRIP-KOマウスで観察されたジアゼパムに対する感受性の低下とGABAリガンドに対する感受性亢進は、PRIPの欠損による$GABA_A$受容体の細胞内輸送が変調した結果、細胞膜表面の$GABA_A$受容体のサブユニット構成が変化することに起因すると考えられた。さらに、PRIPを介したこのような変化は、摂食中枢が制御する摂食行動調節にも関与していることが明らかとなった。以上のように、本研究は有為な研究成果を得ており、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	おかだ　やえ **岡　田　八　栄**（兵庫県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５６２号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**ヒト臍帯血CD34陽性細胞を材料とした樹状細胞の大量増幅法の確立**
論文調査委員	（主　査）教授　中村誠司 （副　査）教授　森　悦秀　　教授　坂井英隆

論　文　内　容　の　要　旨

悪性腫瘍に対する樹状細胞（DC）を用いた免疫療法は、一部でその有効性が確認されつつあるが、未だ十分ではない。我々はこれまでに、その原因として考えられる様々なパラメータのうち、投与されるDCの数が治療成績を左右する重要なファクターであり、理論的に体重比より試算して現臨床プロトコールの10ー100倍のDCが必要になることを明らかにしてきた。しかしながら、DCの大量増幅に成功した報告はこれまで存在しなかった。そこで本研究は、治療成績の向上を目指したヒトDCの体外大量増幅技術を開発することを目的とした。

ヒト臍帯血CD34陽性細胞を材料として、GM-CSF（granulocyte macrophage colony-stimulating factor）及びSCF（stem cell factor, c-Kitリガンド）（GM/SCF）共存在下で行う一段階培養法、及びGM/SCFでの培養の後、GM-CSF及びIL-4（GM/IL-4）存在下での培養に切り替える二段階培養法を開発した。いずれにおいてもMPC（2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine）コーティングされたプレートを用いて浮遊系での培養を行い、得られたDCについて各種機能解析を行った。

上記の培養法により、ヒト臍帯血CD34陽性細胞は5週間の増幅培養で総細胞数100,000倍にまで増幅され、その過程で80%以上がCD11c陽性となった。得られたCD11c陽性細胞は、形態（樹状突起の発現）、各種表面マーカー（接着分子、HLA-DR、共刺激分子）の発現、炎症性サイトカイン/ケモカイン（TNF-α、IL-12p70、IL-1α等）の産生量、抗原取り込み能、及びアロT細胞増殖刺激能において、従来法で得られたDCと同等の性質を示し、これがmyeloid系DCに酷似した、治療に用いるのに必要と考えられる性質を保持しているDCであることを確認した。

本研究はDCの体外での大量増幅が可能であることを示し、投与DC数の問題を解決する大きな足掛かりとなると考えられる。本技術により、悪性腫瘍に対するDCを用いた細胞療法の治療成績の向上、アフェレーシス回数削減による低侵襲化、及び適用範囲の拡大が期待される。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

がん治療における第４の治療法として樹状細胞（DC）を用いたがんワクチン療法が期待されている。しかし、現時点での臨床における治療効果は十分とは言い難く、その理由の一つとして投与するDC数が十分ではないことが考えられる。そこで本研究では、ヒトDCの体外大量増幅法を確立することを目的とした。

ヒト臍帯血およびヒト末梢血由来のCD34陽性細胞を材料として、granulocyte macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）とstem cell factor（SCF）の存在下で培養する方法とGM/SCFで培養の後にGM-CSFとインターロイキン(IL)-4の存在下で培養する方法を比較検討した。いずれの方法においても、2-methacryloyloxyethylphosphorylcholineでコーティングされたプレートを用いて浮遊培養を行った。得られたDCについて、表面マーカー、サイトカイン産生能、抗原取り込み能、同種異系細胞を用いた混合リンパ球反応を測定した。

上記のいずれの培養法においても、ヒト臍帯血由来のCD34陽性細胞は5週間の培養で10,000倍から100,000倍にまで増幅され、その80%以上がCD11c陽性となった。得られたCD11c陽性細胞は、形態（樹

状突起の発現）、各種表面マーカー（接着分子、HLA-DR、共刺激分子）の発現、炎症性サイトカイン/ケモカイン（TNF-α、IL-12p70、IL-1β等）の産生量、抗原取り込み能および同種異系細胞を用いた混合リンパ球反応において、従来法で得られたDCとほぼ同様の結果を示し、治療に用いるのに必要と考えられる性質を保持しているmyeloid系のDCであることを確認した。また、同様の培養をヒト末梢血由来のCD34陽性細胞を用いて培養したところ、ヒト臍帯血由来のCD34陽性細胞程ではないものの、およそ1,000倍の十分な増幅が得られた。

本研究はヒトDCの体外での大量増幅が可能であることを示し、投与DC数の問題を解決する大きな足掛かりとなると考えられる。本技術により、DCを用いたがんワクチン療法の治療成績の向上、アフェレーシス回数削減による低侵襲化、そして適用範囲の拡大が期待される。以上のように、本研究は有為な研究成果を得ており、学位論文として十分に値するものと判断された。

氏名・(本籍・国籍)	ふじ の ひろ こ **藤 野 寛 子**（福岡県）
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	歯博甲第５６３号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学 位 論 文 題 目	**周術期の糖代謝管理による異化の抑制およびインスリン抵抗性の減弱効果の検討**
論 文 調 査 委 員	（主　査）教 授　森　悦 秀 （副　査）教 授　中 村 誠 司　教 授　二ノ宮 裕 三

論　文　内　容　の　要　旨

周術期の代謝栄養管理には3つの問題がある。第一は、周術期の高血糖は免疫機能を抑制し、虚血再灌流障害を増悪して予後を不良にすることである。そのため、手術中のブドウ糖投与は長年控えられてきた。第二に、全身麻酔下で手術を受ける場合、麻酔導入時の嘔吐による誤嚥の防止目的に前日から飲食が厳しく制限される。さらに口腔外科手術症例では、術前から食事の摂取に障害を抱え、栄養状態が悪いケースが多い。この2つの問題により、周術期には軽度の飢餓ストレスがかかった状態で手術と麻酔管理が行われてきた。第三に、手術後にはインスリンは正常に分泌されても高血糖状態が惹起されることである。つまりインスリン感受性が低下したインスリン抵抗性 (IR) の増大という糖尿病の病態にも似た状態が問題になる。

われわれは周術期のブドウ糖投与の必要性について検討し、ブドウ糖投与を行わなければケトン体産生が異常に亢進するが、適切なブドウ糖投与でそれが改善できることをすでに報告した。そこで今回の目的は、周術期の適切なブドウ糖投与によって異化を抑制し、高血糖を惹起することなく糖代謝をより正常化できるかどうかを検討した。本試験を遂行するには、適切な持続血糖値モニタリングとIRの評価が重要になる。IRの評価方法として、Glucose Clamp法 (GC法) とHomeostasis Model Assessment-Insulin Resistance法 (HOMA-IR法) がある。IRの評価方法として至適基準となるGC法は、費用や手間がかかる。それに対して、HOMA-IR法は日常臨床において簡便に測定できるが信頼性が確認されていない。そこで本研究の第1章では、HOMA-IR法が臨床的に有用であるかを比較検討した。手術前日と翌日に人工膵臓STG®-22を用いてGC法でグルコース注入率 (GIR) を測定し、得られたGIRを目標血糖値で補正した値 (M値) をIRの指標として算出した。M値の低下をIRの増大と評価した。また手術前後で空腹時血糖値と空腹時インスリン濃度を測定しHOMA-IRを算出し、その上昇をIRの増大と評価した。その結果、M値は全症例で手術後に有意に低下した (p=0.0049) のに対し、HOMA-IRは術前と比較して平均値は増加していたが、有意な変化は認めなかった (p=0.389)。

HOMA-IR法は糖尿病患者と健常者の比較でGC法と良好な相関を認めたという報告もあるが、今回の研究では周術期のIRの評価には信頼性が低いことが示唆された。

第2章では、麻酔中のブドウ糖投与による異化の抑制効果について評価し、周術期の持続血糖値モニタリングを行い、高血糖を来たすことなく術後のIRの増大を抑制できるかを検討した。手術中にブドウ糖を投与しないR群 (n=11) と、1.5%ブドウ糖を投与したG群 (n=11) の2群に分け、手術前日と翌日にGC法を行い、さらに血糖値、インスリン、ケトン体、3メチルヒスチジンを測定した。周術期の平均血糖値は両群ともに150 mg/dL以下で推移した。ケトン体は、術前と比較して手術終了時には、R群が有意に上昇した (p=0.0035) のに対し、G群では有意に減少した (p=0.0077) 。術前に対する術後のM値の変化率は、R群が57.7±9.3%の減少に対し、G群では43.3±20.7%の減少と有意に小さかった (p=0.041) 。すなわち、全身麻酔中の0.15 g/kg/hrのブドウ糖投与により、高血糖を来たすことなく脂肪分解によるケトン体産生を抑制し、IRの増大も減弱することが示唆された。

周術期は、手術侵襲による過大なストレス反応によりIRが高まり、ストレス誘導性高血糖が生じる。高血糖は白血球機能を障害するため創損傷部の治癒を遅らせ、術後感染症のリスクを高める。しかし、本研究により適切なブドウ糖投与を行うことで、脂肪分解によるケトン体上昇を抑制し、手術侵襲により増大したIRを改善することで、術後の高血糖を防げれば、予後の改善につながる可能性が高い。今後は、麻酔中の呼吸商や代謝量も含めて評価し、より適正なブドウ糖投与量を含めた周術期代謝栄養管理についての検討を進めたい。

論文審査の結果の要旨

本研究は、周術期の適切なブドウ糖投与によって異化を抑制し、高血糖を惹起することなく糖代謝をより正常化できるかどうかを検討した。前半では、適切なインスリン抵抗性(IR)の評価方法として、Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance 法 (HOMA-IR 法) が臨床的に有用であるかを至適基準であるグルコースクランプ法(GC 法)と比較検討した。手術前日と翌日に人工膵臓 STG®-22 (日機装社製) を用いて GC 法でグルコース注入率 (GIR) を測定し、得られた GIR を目標血糖値で補正した値 (M 値) を IR の指標として算出し、M 値の低下を IR の増大の指標とした。また手術前後で空腹時血糖値と空腹時インスリン値を測定し、HOMA-IR を算出し、M 値の推移と比較検討した。その結果、M 値は全症例で手術後に有意に低下した (p=0.0049) が、HOMA-IR は術前と比較して平均値は増加していたが、有意な変化は認めず(p=0.389)、周術期においては HOMA-IR の信頼性が低いことを示唆する結果が得られた。

後半では、麻酔中のブドウ糖投与による異化の抑制効果について評価し、周術期の持続血糖値モニタリングを行い、高血糖を来たすことなく術後の IR の増大を抑制できるかを検討した。手術中にブドウ糖を投与しない R 群 (n=11) と、1.5%ブドウ糖を投与した G 群 (n=11) の 2 群に分け、手術前日と翌日に GC 法を行い、さらに血糖値、インスリン、ケトン体、3 メチルヒスチジンを測定した。両群ともに周術期の平均血糖値は 150 mg/dL 以下で推移した。ケトン体は、術前と比較して手術終了時には、R 群で有意に上昇した (p=0.0035) のに対し、G 群では有意に減少した (p=0.0077) 。術後の M 値の減少率は、R 群 57.7±9.3%に対して G 群 43.3±20.7%が有意に小さかった (p=0.041) 。すなわち、全身麻酔中の 0.15 g/kg/hr 程度のブドウ糖投与により、高血糖を来たすことなく、脂肪分解によるケトン体産生を抑制し、また IR の増大も減弱するという結果が得られた。

周術期は、手術侵襲による過大なストレス反応により術後に IR が高まり、ストレス誘導性高血糖が生じると考えられている。本研究の結果は、適切なブドウ糖投与を行うことによって、脂肪分解によるケトン体上昇を抑制し、また IR を改善できることを示しており、周術期管理に有意義な知見を与えている点より、博士(歯学)の授与に値すると判断された。

氏名・(本籍・国籍)	いまい ゆうこ 今井裕子（福岡県）
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	歯博甲第５６４号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	ホスファチジルイノシトール（4,5）ニリン酸―ジアシルグリセロール代謝と連繋したTRPC3/C6/C7チャネルにおける自律的制御機構の解明
論文調査委員	（主　査）教授　二ノ宮裕三 （副　査）教授　平田雅人　　教授　久木田敏夫

論　文　内　容　の　要　旨

ホスホイノシチド(PIPs)は、種々のイオンチャネルの重要な制御因子であることが知られている。しかしその機序の詳細や機能的意義に関しては未だ混沌としている。本研究では、神経・消化管・心血管系など広範囲に発現し、細胞の興奮性の一端を担う受容体作動型の非選択的カチオンチャネルである Transient Receptor Potential (TRP) C3/C6/C7 チャネルに着目した。これらのチャネルは G_q 蛋白質共役型受容体(G_qPCR)-ホスホリパーゼ C(PLC)系の活性化によりホスホイノシチド(PIPs)の一種、ホスファチジルイノシトール(4,5)ニリン酸(PI(4,5)P_2)の代謝産物であるジアシルグリセロール(DAG)により活性化されることが知られている。これらのチャネルの活性化により、Ca^{2+}流入が促進され、血管収縮や細胞の生存、増殖など生物学的機能、さらには血管不全や心肥大などの疾病を引き起こすリモデリングに関与すると考えられている。しかしその制御機構における PIPs の動態については不明な点が多い。そこで、これらの病態、生理的状況下において、TRPC3/C6/C7 チャネルがどのように関与するか調べるため、PIPs の作用を測る研究ツールとして、ゼブラフィッシュ由来電位作動性 PIPs 脱リン酸化酵素 *Danio rerio* Voltage-Sensing Phosphatase (DrVSP)を用いた電気生理学的検討を行った。

まず、HEK293 細胞に TRPC6 と DrVSP を共発現させ、ムスカリン受容体(M1R)のアゴニストであるカルバコール(CCh) を加え、TRPC6 電流(I_{TRPC6})を全細胞型パッチクランプ法により得た。その最中に、強い脱分極刺激(100mV,500ms)により DrVSP を一過的に活性化させると、I_{TRPC6} の一過的抑制 (DrVSP-mediated inhibition / VMI) が観察された(図1)。VMI の程度(脱分極刺激前後の電流の大きさの比 $r = I_{post} / I_{pre}$ により評価する)は、100μM CCh 刺激時において、$r = 0.50 \pm 0.06$ および抑制からの回復時定数 τ-recovery = 1.6 ± 0.2sec(n = 11)であった。同様の抑制現象(VMI)は、DAG 膜透過性アナログである OAG や DAG リパーゼ阻害剤である RHC80267 で惹起した電流においても確認されたことから、VMI が受容体刺激とは独立して生じていることが示唆された。さらに、薬理学的検討や DrVSP 変異体を用いた検討によって、この VMI は、DrVSP の PIPs 脱リン酸化酵素活性が必要であること、さらには PIPs の中でも PI(4,5)P_2 が脱リン酸化され減少することが関与していることを見出した。また、TRPC6 のホモログである TRPC7

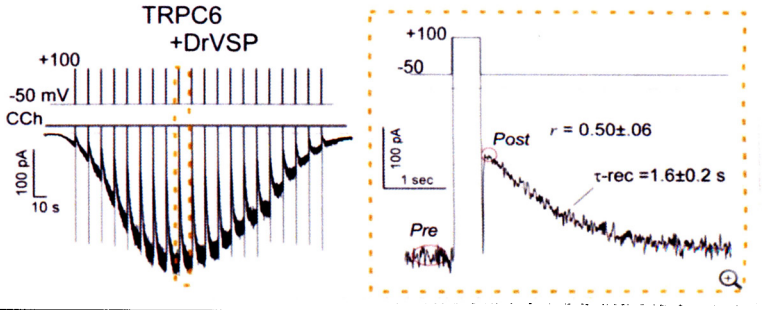


図１；HEK 細胞に TRPC6/DrVSP を共発現させ 100μMCCh 刺激により惹起した C6 電流の脱分極刺激(100mV,500ms,10sec 毎,holding -50mV)に伴う一過的抑制(VMI)。右は点線部位の拡大ト

チャネル電流 (I_{TRPC7}) および TRPC3 チャネル電流 (I_{TRPC3}) においても同様の手順により VMI が観察されたが、その程度および回復時間は、サブタイプ別に異なり、100μM CCh 刺激時においてそれぞれ $r = 0.22 \pm 0.09$, τ-rec = 3.0 ± 0.4 sec(TRPC7/n = 7)、$r = 0.63 \pm 0.06$, τ-rec = 1.1 ± 0.2 sec(TRPC3/n = 7)で、TRPC7 > TRPC6 > TRPC3 の順であることが明らかとなった。

次に、チャネル機能における $PI(4,5)P_2$ の役割を、HEK 細胞に M1R を過剰発現させることで検討した。M1R 過剰発現により、PLC 活性化の促進に伴い急速に $PI(4,5)P_2$ の分解が起こると考えられる。このとき CCh で惹起される TRPC 電流は活性化・不活性化ともに加速され、特に不活性化の促進が顕著であった(図 2)。また、その加速される度合いは、上記 VMI の強度順と同様、TRPC7 > TRPC6 > TRPC3 であった。さらに M1R 過剰発現時の速い活性化・不活性化を示す電流では、VMI が消失(I_{TRPC6} および I_{TRPC3})・減弱(I_{TRPC7})することが分かった。以上より、受容体刺激に伴う電流の速い不活性化には、チャネルに近接した $PI(4,5)P_2$ の急速な減少が関与していることが示唆された。このことは、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動：Fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer)による PI(4,5)P2 の変化量を測定することでも裏付けられ、チャネルサブタイプ別に PI(4,5)P2 との感受性が異なることが明らかになった。

$PI(4,5)P_2$ の減少が TRPC3/C6/C7 チャネル不活性化を促進することを更に確認するため、M1R を過剰発現させた HEK 細胞において、パッチ電極内に diC8-$PI(4,5)P_2$ を添加して、その電流不活性化への影響を観察した。パッチ電極内に diC8-$PI(4,5)P_2$ を加えたとき、CCh で惹起される I_{TRPC6}、I_{TRPC7} および I_{TRPC3} の不活性化過程は、加えた diC8-$PI(4,5)P_2$ の濃度依存的 (100-500μM) に顕著に遅延した。またこのとき、DrVSP を共発現すると、脱分極刺激に伴う VMI が、加えた diC8-$PI(4,5)P_2$ の濃度依存的に再び観察されるようになった。以上より、受容体を介した $PI(4,5)P_2$-PLC-DAG 系シグナルの活性化が、TRPC3/C6/C7 チャネルの活性化に不可欠である一方、その過剰な活性化は、TRPC3/C6/C7 チャネルの不活性化を促進することが明らかとなった。このように、$PI(4,5)P_2$ の代謝が、これらのチャネルにおいて、活性化・不活性化の双方を調節していることが示唆された。

$PI(4,5)P_2$ の減少による影響について、TRPC6 チャネルが内在性に存在しているとされる大動脈平滑筋由来 A7r5 細胞においても検討した。DrVSP を発現させた A7r5 細胞から得られるバソプレッシン (AVP/50nM) 誘発性 TRPC6 様電流の多くは、VMI が生じなかった(16 細胞中 12 例)が、稀に VMI が観察される細胞もあり(16 細胞中 4 例)、多様性が窺えたが、diC8-$PI(4,5)P_2$ 添加による TRPC6 様電流への影響は明白であった。このことから、$PI(4,5)P_2$ の減少は、生理的にも重要な機構であることが示唆された。

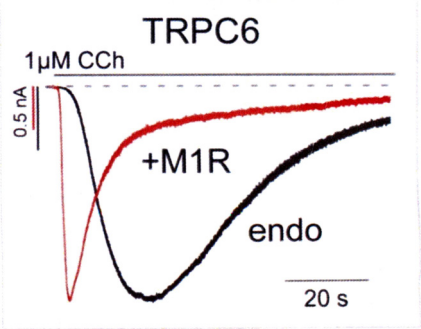


図 2；HEK 細胞に TRPC6 発現させ 1μMCCh 刺激により惹起した C6 電流トレースの重ね合わせ。内在性 M1R のみ刺激時(黒)および M1R 過剰発現時(赤)。

以上より、VMI と強い受容体刺激による電流の不活性化は $PI(4,5)P_2$ の減少という共通の分子機構を介していること、TRPC3/C6/C7 チャネルには $PI(4,5)P_2$-PLC-DAG シグナルを介した自律(自己)的制御機構が存在していること、そして、自律的制御の程度はチャネルごとに異なっていることなどが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ホスホイノシチド(PIPs)は、種々のイオンチャネルの制御因子であることが知られているが、その作用機序の詳細や機能的意義についてはまだ不明である。受容体作動型の非選択的カチオンチャネルである Transient Receptor Potential (TRP) C3/C6/C7 チャネルは神経、消化管、心血管系

など広範囲に発現し、細胞の興奮性に関与し、各器官の生理機能や病態と密接に関連する。これらTRPCチャネル群はGタンパク質共役型受容体-ホスホリパーゼC(PLC)系の活性化によりホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸[PI(4,5)P_2]から産生されるジアシルグリセロール(DAG)によって活性化されることが知られているが、その不活性化機構におけるPIPsの役割については不明である。そこで、本研究は、ゼブラフィッシュ由来電位作動性PIPs脱リン酸化酵素Danio rerio Voltage-Sensing Phosphatase (DrVSP)を用い、その作用を調べることにより、TRPCチャネル群に対するPIPsの役割を検索した。

HEK293細胞にTRPC6とDrVSPを共発現させ、全細胞型パッチクランプ法を用いTRPC6電流を記録したところ、脱分極刺激によるTRPC6電流の一過的抑制(DrVSP-mediated inhibition/VMI)が認められた。また、TRPC3及びTRPC7についても同様の実験を行ったところ、チャネル電流にVMIが認められた。しかし、その強度や回復時間はチャネルサブタイプで異なり、TRPC3<TRPC6<TRPC7の順であった。さらに、薬物やDrVSP変異体を用いた解析を行い、VMIがどのホスホイノシチドと関連しているかを検索したところ、PI(4,5)P_2が関与することが示唆された。またムスカリン受容体(muscarinic type-1 receptor)を過剰発現させたHEK293細胞に、カルバコール刺激を加えると、TRPCチャネル電流の不活性化(減衰)が起こり、その不活性化は、VMIの強度や回復時間の順と同様に、TRPC7が最も早く、次いでTRPC6、TRPC3の順になった。

以上、本研究よりTRPC3/C6/C7チャネル電流のVMIと強い受容体刺激による不活性化にはPI(4,5)P_2が関与していること、すなわち、これらチャネル群にはPI(4,5)P2-PLC-DAGシグナルを介した自律的制御機構が働くこと、そして、自律的制御の程度はチャネルごとに異なっていることが示唆された。これらの知見は、TRPC3/C6/C7チャネルが関与すると思われる神経、消化管、心血管系の生理機能や高血圧など関連する病態の理解に役立ち、新たな治療戦略の構築の一助となるものと考えられる。これらのことから、本論文は学位授与に値するものと評価した。

氏名・(本籍・国籍)	おぎわらようこ 荻原葉子 (東京都)
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	歯博甲第523号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	**マウスとヒトにおけるうま味受容機構に関する研究**
論文調査委員	(主査) 教授　中西　博 (副査) 教授　平田雅人　教授　前田勝正

論文内容の要旨

うま味はL-グルタミン酸ナトリウムや核酸によって引き起こされる味覚で、5基本味の一つとしてアミノ酸摂取に重要な役割を担っていると考えられている。これまでにGタンパク共役型受容体であるT1R1+T1R3ヘテロ二量体や、代謝型グルタミン酸受容体のmGluR1とmGluR4がうま味受容体として機能している可能性が示唆されている。それらうま味受容体候補の中でT1R1+T1R3についてはその詳細な機能が明らかにされつつある。一方、mGluRに関しては、詳細は不明ながら味細胞に発現することが報告され、さらにT1R3を遺伝的に欠損させたマウス(T1R3-KO)で、うま味に対する鼓索神経応答は減少するが消失せず、舌咽神経応答はほとんど変化しないことから、その残存するうま味応答に関与する可能性が示唆されている。

そこで本研究では、うま味受容へのmGluR1ならびにmGluR4の関わりをさらに詳細に調べるために、(1) 野生型マウス、T1R3-KOおよびTRPM5-KOを用いて、うま味物質に対する単一鼓

索神経応答が AIDA (1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid; mGluR1 を含むグループⅠ型アンタゴニスト) および CPPG (RS-α-cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine; mGluR4 を含むグループⅢ型アンタゴニスト) によりどのように影響を受けるかについて解析を行った。さらに、(2) ヒトのうま味感受性への mGluR の関与を調べるために、254 名の健康成人に関する mGluR1 と mGluR4 の遺伝子多型性 (single nucleotide polymorphisms: SNP) について解析を行い、味覚感受性との相関解析を行った。

その結果、(1) T1R3-KO および TRPM5-KO マウスにおいて、甘味に強く応答する甘味ベスト線維のうち、うま味物質に対する相乗効果応答を示す S1-type 線維が消失したが、うま味物質に応答するうま味ベスト線維 (M-type) は正常マウスと同程度維持され、うま味物質への神経応答に影響がみられなかった。さらに正常マウスにおいて、1-10 mM AIDA 添加で M1-type 線維、1-10 mM CPPG 添加で M2-type 線維のうま味応答が有意に抑制されることが明らかとなった。また、(2) ヒト mGluR 遺伝子多型性解析の結果、mGluR1 の 993 番目のアミノ酸変異を伴う SNP が約 50%のマイナーアリル頻度を示し、うま味感受性と相関している可能性が示唆された。mGluR4 では遺伝子多型性はほとんど見られなかった。

以上の結果から、T1R1+T1R3 以外にも、マウスでは mGluR1 と mGluR4 が、ヒトでは mGluR1 が、うま味受容体として機能している可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

うま味は L-グルタミン酸ナトリウムや核酸 (5'-イノシン酸、5'-イグアニル酸) によって引き起こされる味覚で、5 基本味の 1 つとしてアミノ酸摂取に重要な役割を担っていると考えられている。これまで G タンパク共役受容体 (GPCR) である T1R1+T1R3 ヘテロ二量体や、mGluR1 と mGluR4 がうま味受容体として機能している可能性が示唆されている。

うま味受容体候補の中で T1R1+T1R3 についてはその詳細な機能が明らかにされつつある。一方、mGluR に関しては、味細胞に発現することが報告され、さらに、T1R3 を遺伝的に欠損させたマウス (T1R3-KO) で、うま味に対する鼓索神経応答は減少するが消失せず、舌咽神経応答はほとんど変化しないことから、残存するうま味応答に関与する可能性が示唆されているが、詳細は不明である。そこで本研究では、この mGluR1 ならびに mGluR4 のうま味受容への関与を明らかにする目的で以下の解析を行った。

本研究は2部から構成され、第 1 部では正常マウス (C57BL6)、T1R3-KO および TRPM5-KO を用いて、うま味物質に対する単一鼓索神経応答が AIDA (1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid; mGlu1 を含むグループⅠ型アンタゴニスト) および CPPG (*RS*-α-cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine; mGluR4 を含むグループⅢ型アンタゴニスト) によりどのように影響を受けるかについて解析を行った。その結果、T1R3-KO および TRPM5-KO マウスにおいて、甘味に強く応答する甘味ベスト線維のうち、うま味物質への相乗効果応答を示す S1-type 線維が消失したが、うま味物物質に応答するうま味ベスト (M-type) 線維は正常マウスと同程度に維持され、うま味物質への神経応答に影響が見られなかった。さらに正常マウスにおいて、1-10 mM AIDA 添加で M1-type 線維、1-10mM CPPG 添加で M2-type 線維のうま味応答が有意に抑制されることが明らかとなった。

第 2 部では、ヒトのうま味感受性への mGluR の関与を調べるために、241 名の健康成人について mGkuR1 と mGluR4 の遺伝子多型性 (single nucleotide polymorphisms: SNP) について解析を行い、味覚感受性と相関解析を行った。その結果、mGluR1 の 993 番目のアミノ酸変異 (S993P) を伴う SNP が約 50%のマイナーアリル頻度を示し、うま味感受性と相関している可能性が示された。mGluR4 では遺伝子多型性はほとんど見られなかった。

以上、本研究によりマウスとヒトにおいて T1R1+T1R3 以外にも mGluR1 と mGluR4 がうま味受容体として機能している可能性が強く示唆された。従って、本論文は学位論文に値するものと判断される。

氏名・(本籍・国籍)	ファム　チュン　キイエン PHAM　TRUNG　KIEN　(ベトナム)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	歯博甲第５３７号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　歯学府　歯学専攻
学位論文題目	Fully-interconnected macropore forming calcium phosphate cement using α-TCP microspheres(α－三リン酸カルシウム球状粒子を用いた三次元連通孔型リン酸カルシウムセメント)
論文調査委員	(主　査)　教　授　古谷野　潔 (副　査)　教　授　森　悦秀　教　授　久木田　敏　夫

論　文　内　容　の　要　旨

Fully-interconnected macropore forming calcium phosphate cement (FMF-CPC), that forms interconnected pores with diameter of 300-400 μm could be an ideal bone substitute .In this study, FMF-CPC consisting of α-tricalcium phosphate (α-TCP; $Ca_3(PO_4)_2$) microspheres and acidic calcium phosphate solution (0.2 mol/L monocalcium phosphate monohydrate (MCPM; $Ca(H_2PO_4)_2{\cdot}H_2O$)-0.1 mol/L phosphoric acid (H_3PO_4) or MCPM-H_3PO_4 solution)was proposed. When α-TCP microspheres with 1.3 mm diameter were exposed to MCPM-H_3PO_4 solution, brushite ($CaHPO_4{\cdot}2H_2O$) was formed at the interface between α-TCP microspheres. The formed brushite crystals interlocked with each other, resulting in a setting reaction of α-TCP microspheres within 10 min at 37°C. As a result of this setting reaction, a fully-interconnected calcium phosphate macroporous structure with brushite-coated layer was obtained.

After obtaining brushite-coated FMF-CPC, the behavior of set brushite-coated FMF-CPC in the bone defect was simulated using solution that mimics the condition of human blood plasma; simulated body fluid (SBF) solution. The results clearly demonstrated that the surface of brushite-coated FMF-CPC can be transformed to apatite after 3 days immersion into SBF solution. The transformation of brushite to apatite is based on dissolution-precipitation reaction. Since apatite has excellent osteoconduction property, the set brushite-coated FMF-CPC is expected to be used as the bone substitute material.

In conclusion, results obtained in the present study indicated that the brushite-coated FMF-CPC prepared by the present method has potential to become the good candidate for bone substitute material.

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

リン酸カルシウムセメント（CPC）は生体親和性が高く，骨置換材料として幅広く臨床使用されている。本研究ではマクロサイズの三次元連通気孔を持つ CPC（FMF-CPC）を作製することを目的としている。

幾何学計算によると300-500 μmのサイズを持つ三次元連通気孔は直径約1.3 mmの球状体の最密充填構造によって得られることから，セメントの硬化反応を利用してこれらの球状体同士を固着させることができれば，FMF-CPC を作製することができると着想している。三リン酸カルシウム（TCP）とリン酸塩水溶液の反応によって比較的短時間で硬化するブルッシャイト（DCPD）セメントに習い，直径約1.3 mmのα-TCP小球とリン酸塩水溶液との反応によって，FMF-CPCを

作製している。

リン酸塩水溶液の濃度や種類について検討した結果，0.2 mol/L リン酸二水素カルシウム－0.1 mol/L リン酸水溶液（MCPM-H_3PO_4 溶液）を用いればα-TCP 小球同士を 36.5°C で 10 分以内に固着できることを明らかにしている。この反応を利用して作製した FMF-CPC の気孔率は約 50%で，気孔サイズは約 380 μm であることがマイクロ CT を用いて明らかにされている。X 線回折法や電子顕微鏡を用いてα-TCP 小球同士の硬化メカニズムについて調査した結果，小球同士の界面には DCPD の針状結晶が存在しており，結晶の絡み合いによって硬化していることが明らかにされている。

本研究で得られた FMF-CPC を体液の無機イオン濃度を模倣した擬似体液（SBF）に浸漬して，FMF-CPC の生体内において予測される変化挙動を調査している。α-TCP 小球同士の界面に存在する DCPD は SBF 中で 3 日後にはカルシウム欠損型アパタイト（CDHA）に置き換わることを明らかにした。CDHA は骨組織と直接結合する性質を有しているので，本研究で作製した FMF-CPC は骨置換材料として有用であると結論付けている。

本研究で得られた知見は今後の骨置換性材料の開発および関連学術領域の創製に寄与するものであり，本論文は学位論文としての価値があるものと判断された。