

Vol. 97 No. 1 June 2023

# 日大歯学

Nihon University Dental Journal

日本大学歯学会

NIHON UNIVERSITY SOCIETY OF DENTISTRY

日大歯学  
Nihon Univ.  
Dent. J.

ISSN 0385-0102

# 日 大 歯 学

第 97 卷 1 号      令和 5 年 6 月

## 目 次

### 原 著

日本大学歯学部附属歯科病院における最近5年間の患者動向とアンカースクリュー使用状況について	増 山 萌 子ほか	1
Propiece IL-1 $\alpha$ の核内への輸送機構と核内機能	石 山 雄 一	7
IL-1 receptor type 2による細胞内pIL-1 $\alpha$ の細胞外分泌抑制	定 村 正 之	12
高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響	清 水 なつ生	18
ヒト線維芽細胞HeLa におけるinterleukin-1 receptor type 2のdecoy receptorとしての機能	花 山 真知子	27
MeCP2変異ヒト歯髓細胞およびMeCP2欠損マウス 迷走神経背側運動核ニューロンについての免疫組織化学的研究	星 ま な み	33
急性期病院における誤嚥性肺炎患者の生命予後に関連する因子について	渡 邊 真 央	42

日本大学歯学会会則

日本大学歯学会表彰規定

「日大歯学」投稿の手引き - 投稿申込用紙, 確認書, チェックリスト, 承諾書 -

# Nihon University Dental Journal

Vol.97, No.1

June 2023

## CONTENTS

### Original Article

- Five-year trends in the demographics of orthodontic patients and anchor-screw use at Nihon University School of Dentistry Dental Hospital Moeko Masuyama and others 1
- The mechanism of pIL-1  $\alpha$  nuclear transport and its function Yuichi Ishiyama 7
- Inhibition of pIL-1  $\alpha$  extracellular secretion by intracellular IL-1 receptor type 2 Masayuki Sadamura 12
- Effect of high glucose concentration on mineralization in mature osteoblasts Natsuo Shimizu 18
- The decoy receptor function of interleukin-1 receptor type 2 in human fibroblastic cell line HeLa Machiko Hanayama 27
- Immunohistochemical studies of MeCP2-mutated human dental pulp cells and the dorsal motor nucleus of the vagus neurons in Mecp2-deficient mice Manami Hoshi 33
- Factors associated with life prognosis in patients with aspiration pneumonia in an acute care hospital Mao Watanabe 42
- Nihon University Dental Society Constitution
- Nihon University Society of Dental Award Regulations
- " Nihon University Dental Journal " Submission Guide  
-Submission Application Form, Confirmation, Checklist, Consent Form-

# 日本大学歯学部付属歯科病院における最近5年間の患者動向と アンカースクリュー使用状況について

増山 萌子<sup>1</sup> 馬谷原 琴枝<sup>1,2</sup> 稲葉 瑞樹<sup>1,2</sup> 本吉 満<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>日本大学歯学部歯科矯正学講座

<sup>2</sup>日本大学歯学部総合歯学研究所臨床研究部門

## 要旨

**【目的】** 日本大学歯学部付属歯科病院歯科矯正科における矯正治療受診患者動向及び診療動態を調査、検討することで、地域歯科医療へ一層の貢献のため今後の対応に生かすことを目的とした。

**【方法】** 当科の2016年度から2020年度までの5年間における初診患者を調査対象とし、治療開始登録患者（登録患者）数、男女比率、年齢別分布、治療内容、アンカースクリュー使用状況について調査を行った。

**【結果】** 5年間に当科を受診した初診患者数は2739名で、年間平均初診患者数は547.8名であった。5年間の登録患者率は平均53.7%であり、2019年では57.5%、2020年では58.6%と増加していた。登録患者の男女比は1:1.5であり、治療開始登録年齢は男女ともに学童期と青年期の2度ピークを示していた。また、治療内容分布においては保険治療の割合が36.8%であった。治療内容においては、自費診療で叢生が最も多く診断され、次いで上顎前突、下顎前突であり、保険診療では下顎前突が最も多かった。5年間のアンカースクリュー使用率は26.3%であり、アンカースクリュー植立部位は上顎歯槽部が50.0%を占めており、次いで下顎歯槽部が36.2%であった。

**【結論】** 2016年から2020年までの5年間は2009年から2003年までの5年間に比べて、初診患者数、登録患者数共に増加していた。前回調査と比較すると、男女比はほとんど変わらず保険診療の割合が増えていた。アンカースクリューは、上顎歯槽部に最も多く植立されていた。

**キーワード：** 矯正歯科治療患者、実態調査、歯科矯正用アンカースクリュー

## Five-year trends in the demographics of orthodontic patients and anchor-screw use at Nihon University School of Dentistry Dental Hospital

Moeko Masuyama<sup>1</sup>, Kotoe Mayahara<sup>1,2</sup>, Mizuki Inaba<sup>1,2</sup>, Mitsuru Motoyoshi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

<sup>2</sup>Division of Clinical Research, Research Institute of Comprehensive Dentistry, Nihon University School of Dentistry

## Abstract

**【Purpose】** To aid in the development of policies for community healthcare, we investigated demographic trends among new orthodontic patients who visited the Nihon University School of Dentistry Dental Hospital.

**【Methods】** Data were obtained from patients who visited the Department of Orthodontics, Nihon University Dental Hospital between 2016 and 2020. We compared the male-to-female ratio, age distribution, treatment details, and anchor-screw use between our patients and previous surveys.

**【Results】** Over the 5-year study period, 2,739 patients visited our department for the first time (annual average: 547.8). The percentage of registered patients who initiated treatment during the 5-year study period was 53.7%, increasing to 57.5% in 2019 and 58.6% in 2020. The male-to-female ratio of the patients was 1:1.5, with peaks in the age distribution for school children and adolescents. The percentage of patients who received treatment covered by national health insurance was 36.8%. Crowding was the most common malocclusion type, followed by maxillary protrusion and mandibular protrusion in self-funded treatment. Mandibular protrusion was the most commonly treated condition covered by national health insurance. Orthodontic anchor screws were used in 26.3% of patients over the 5-year study period. The most frequent region of orthodontic anchor-screw placement was the maxillary alveolar region (50.0%), followed by the mandibular alveolar region (36.2%).

**【Conclusion】** The number of first-time patients and the percentage of registered patients who initiated treatment in our department increased in the 5-year study period (2016–2020) compared to a previous 5-year period (2009–2003). The male-to-female ratio in the present study and the previous survey was similar, whereas the percentage of patients covered by national health insurance increased. Orthodontic anchor screws were most commonly placed in the maxillary alveolar region.

**Keywords:** orthodontic treatment patients, survey, orthodontic anchor screw

(受付：令和4年12月16日)

責任著者：馬谷原琴枝

日本大学歯学部歯科矯正学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL：03-3219-8105

FAX：03-3219-8365

E-mail：mayahara.kotoe@nihon-u.ac.jp



## 緒 言

日本大学歯学部付属歯科病院は大正 6 年に開院し、昭和 53 年に矯正歯科が標榜追加され、その後昭和 57 年から唇顎口蓋裂患者、平成 2 年から顎変形症患者の術前術後の矯正歯科治療が保険適用となった。平成 7 年に学校歯科検診に不正咬合の診査項目が追加され、その後、数回にわたる保険診療報酬改定によって保険診療の対象となる先天性疾患等の適応症が拡大した。さらに、平成 26 年には歯科矯正用アンカースクリュー（以下、アンカースクリュー）が保険診療において使用可能となり、矯正歯科治療を受けやすい環境へ変化してきている。

当病院における矯正歯科治療患者の実態調査は、受診する患者の概要を的確に把握し分析することで、今後の施設の改善や患者対応の改善につながると考えられる。またアンカースクリューの使用については、自費および保険診療共に使用可能となったことにより、その使用頻度や部位を検討することで治療の選択肢の変化が明らかになると考えられる。

そこで、当科における診療動態を確認し、地域歯科医療へ一層の貢献のため今後の対応に生かすことを目的として、平成 28 年度から令和 2 年度までの 5 年間に当病院歯科矯正科（以下、当科）を受診した患者の実態を調査し、過去のデータ<sup>1)</sup>と比較検討を行った。

## 資料および方法

平成 28 年度（2016 年）から令和 2 年度（2020 年）までの 5 年間に、当科を受診した患者 2739 名（初診患者）を調査対象とした。

### 1. 調査資料

調査に用いた資料として初診時における氏名、年齢、性別、来院日、主訴などが記録された問診票および精密検査後の分析資料および治療計画書を用いた。今回の実態調査では初診患者のうち、歯科矯正用アンカースクリュー植立依頼のみの患者を除外し、治療を開始した患者を登録患者と表記することとした。本研究は、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した。（許可番号：倫許 2014-15）

### 2. 調査項目

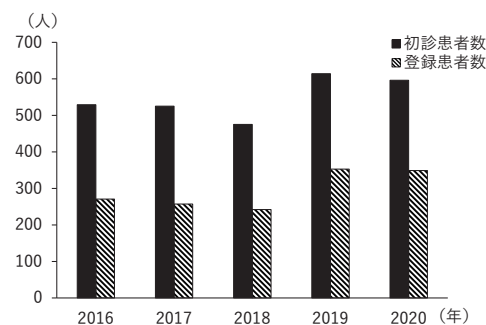
上記の患者について、以下の項目について調査を行った。

- 1) 初診患者数および登録患者の年次推移および登録率
- 2) 登録患者における (1) 男女比, (2) 年齢別分布, (3) 治療内容分布, (4) 不正咬合分布
- 3) アンカースクリュー使用状況について (1) 使用率, (2) アンカースクリュー植立部位分布

年齢別分布には初診時年齢を用い、治療内容は I 期治療、自費による全顎的矯正歯科治療（自費診療）、保険を使用した全顎的矯正歯科治療（保険診療）、部分矯正治療



図 1 歯科矯正用アンカースクリューの植立部位  
A：口蓋正中中部、B：上下顎側側歯槽部、C：頬棚



	2016	2017	2018	2019	2020	合計
■初診患者数 (人)	529	525	475	614	596	2739
▨登録患者数 (人)	271	257	242	353	349	1472
登録率 (%)	51.2	49	50.9	57.5	58.6	53.7

図 2 初診患者数と登録患者数における年次推移および登録率

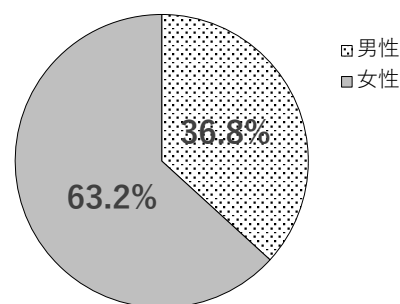


図 3 5 年間の登録患者の男女比

(MTM) に分類した。アンカースクリュー植立部位分布はアンカースクリューを使用し全顎的治療を行った患者を対象とした。アンカースクリュー植立部位は、上顎は小臼歯または大臼歯間の頬側歯槽骨と口蓋正中中部、下顎は小臼歯または大臼歯間の頬側歯槽骨と頬棚に分類した。（図 1）

## 結 果

### 1. 初診患者および登録患者数の年次推移（図 2）

2016 年から 2020 年までの 5 年間に当科を受診した初診患者数は 2739 名で、年間平均初診患者数は 547.8 名であった。2018 年で減少しその後、2019 年では 614 人、2020 年は 596 人となり 2018 年と比較すると、約 150 人増加していた。5 年間の登録率は平均 53.7% であり、2019 年では 57.5%、2020 年において 58.6% と増加していた。

### 2. 登録患者における調査

#### 1) 男女比（図 3）

登録患者のうち男性 546 人（36.8%）で、女性 939 人

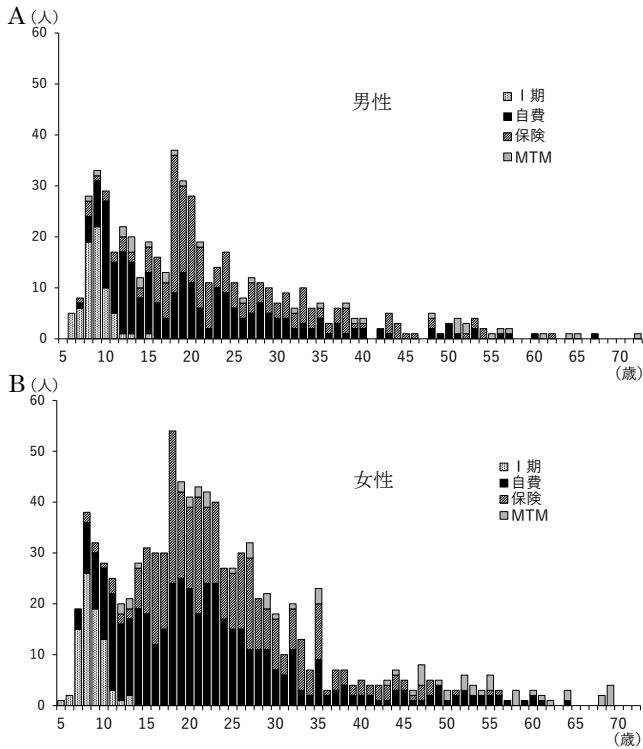


図4 登録患者における年齢別分布  
A：男性，B：女性

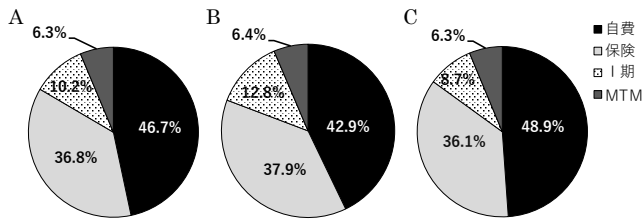


図5 治療内容分布  
A：全体，B：男性，C：女性

(63.2%)であった。男女比は約1：1.5で女性の方が多かった。

2) 登録患者の年齢別分布 (図4 A, B)

5年間で男性は6歳から72歳が、女性では5歳から69歳が登録患者となっていた。男性は9歳で33人、18歳で37人、女性は8歳で38人、18歳で54人の登録患者数となり、男女ともに学童期と青年期と2度のピークを示していた。学童期ではI期治療患者が68.2%、青年期では保険治療患者が62.6%と高い割合を占めていた。さらに、男女ともに高齢になるに従い、MTM患者が増加し一方で全顎の治療である自費治療や保険治療の患者割合は減少する傾向を示していた。

3) 治療内容分布 (図5, 6)

治療内容分布は、自費診療46.7%、保険診療36.8%、I期治療10.2%、MTM6.3%で自費診療が約半数を占めていた。男女別では、男性は、自費診療42.9%、保険診療37.9%、I期治療12.8%、MTM6.4%であり、女性は、自費治療48.9%

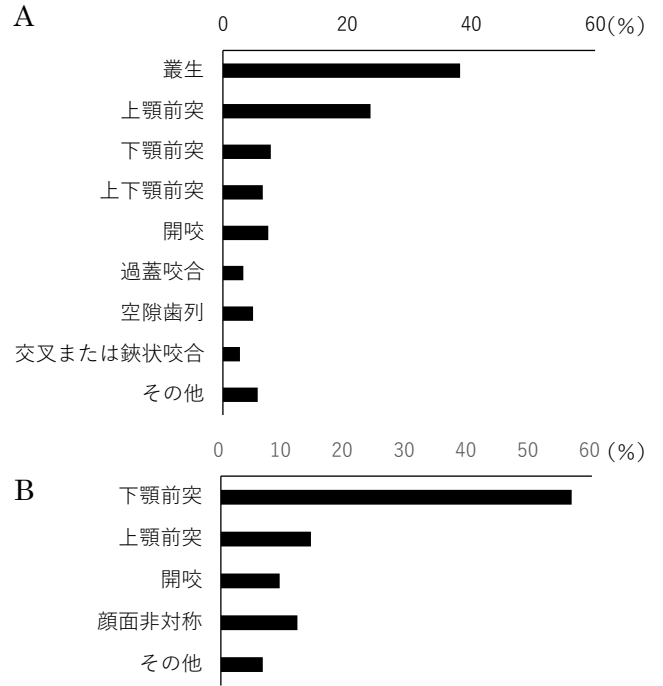


図6 不正咬合別分布  
A：自費診療，B：保険診療

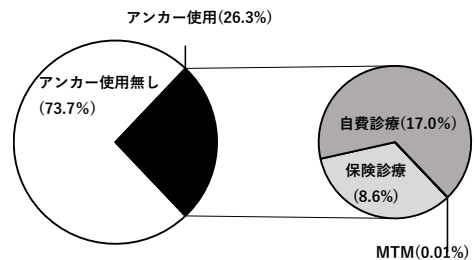


図7 5年間のアンカースクリュー使用率

保険治療36.1%、I期治療8.7%、MTM6.3%で、男性と比較すると自費診療の割合がやや高かった。(図5)

自費診療の内訳は、叢生38.3%、上顎前突23.8%、下顎前突7.7%、上下顎前突6.4%、開咬7.3%、過蓋咬合3.3%、空隙歯列4.9%、交叉または鉗状咬合2.7%、その他(咬合不全、埋伏歯等)5.6%であった。保険診療の内訳は下顎前突56.8%、上顎前突14.6%、開咬9.5%、顔面非対称12.4%、その他(先天性疾患や6歯以上の先天性欠損等)6.7%であった。(図6)

3. アンカースクリュー使用状況

1) アンカースクリュー使用率 (表1, 図7)

登録患者数1484人のうち、アンカースクリューの使用人数は5年間で合計390人であり、26.3%がアンカースクリューを使用し治療を行っていた。アンカースクリュー使用患者のうち65.7%が自費診療(登録患者の17.0%)、32.7%が保険診療(登録患者の8.6%)、1.6%(登録患者の0.01%)がMTMであった。(図7)

治療内容別のアンカースクリュー使用率は、自費診療で

表 1 治療内容別アンカースクリュー使用率

	全治療	保険診療	自費診療	MTM
アンカースクリュー使用患者/登録患者数(5年間合計)	26.3%	23.4%	36.2%	10.3%
2016年	18.9%	20.2%	24.6%	5.9%
2017年	34.0%	36.7%	41.7%	20.0%
2018年	36.2%	28.1%	54.4%	9.1%
2019年	20.8%	23.7%	25.8%	0.0%
2020年	25.1%	14.9%	38.4%	14.3%

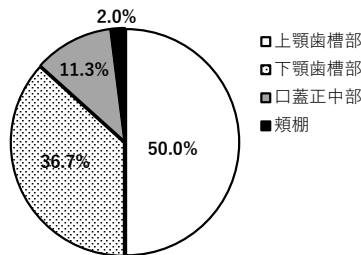


図 8 アンカースクリュー植立部位分布

表 2 治療内容別アンカースクリュー植立部位分布

	保険診療			自費診療		
	上下顎	上顎	下顎	上下顎	上顎	下顎
男性	10.9%	23.5%	7.6%	21.0%	26.9%	10.1%
女性	6.2%	13.5%	9.6%	28.1%	34.6%	8.1%
合計	7.7%	16.6%	9.0%	25.9%	32.2%	8.7%

は36.2%、保険診療では23.4%、MTMでは10.3%であった。年度ごとの使用率は各年に差があるが、すべての年において保険診療と比較し自費診療におけるアンカースクリュー使用率が高かった。(表1)

## 2) アンカースクリュー植立部位 (表2, 図8)

アンカースクリューを使用し全顎的な治療を行った患者を対象に調査を行ったところ、保険診療および自費診療ともに上顎のみにアンカースクリューを使用した患者が最も多かった。また保険診療と比較すると自費診療ではアンカースクリューを上下顎に使用する割合が高いことが示された(表2)。

植立部位については、上顎歯槽部が50.0%を占めており、続いて下顎歯槽部(36.7%)、口蓋正中部(11.3%)となり、最も少ない部位は頬棚(2.0%)であった(図8)。

## 考 察

### 1. 初診患者数および登録患者の年次推移および登録率(図2-4)

2009年から2013年の5年間の初診患者2555人と比較し<sup>1)</sup>、2016年から2020年までの5年間に当科を受診した初診患者数は2739名、年間平均初診患者数は547.8名であり、増加傾向を示した。また2019年、2020年において初診患者数および登録患者数は増加しており、これは、2018年10月に本格稼働となった当病院の新病院建設に伴う一時的な患者数の減少とその後の新病院における診療再開や環境面改善による患者数の増加が考えられる。また、厚生労働

省の平成29年と令和2年患者調査の比較からは1日あたりの矯正初診患者数が800人から2900人へと大幅に増加しており<sup>2,3)</sup>、患者数の増加は当病院のみならず全国的なものであったと考えられる。これは2020年の新型コロナウイルス流行によって、当初数か月間歯科治療は一時敬遠されていたが、その後マスク着用期間が長くなることが想定され、これまで矯正装置が見えることを理由に治療を躊躇していた人が治療を希望したことによるものと考えられた(図2)。

登録患者数の年次推移について、当科では2016年から2020年の5年間では初診患者のうち約53.7%が登録患者であり<sup>1)</sup>、また各年の登録率を比較すると2019年、2020年において60%弱が登録患者となっており登録率が増加傾向にあると考えられた。以前と比較し、インターネット等で矯正歯科治療の情報が容易に入手でき治療が身近なものとなっていること、また当病院ウェブサイトも含めインターネット等で患者本人が前もって情報を得たうえで来院しているためと考えられる。

今後も審美的な目的だけでなく顎機能改善を必要とする患者が増加すると考えられることから、的確な診断、および治療を提供することで登録率を増加させることができると考えられる。

### 1) 男女比(図3)

登録患者数の男女比は約1:1.5であり、この傾向は2016年の当病院での報告<sup>1)</sup>や他の医療機関における結果<sup>4,5)</sup>と同様であるが、2010年の当院の報告1:2.4<sup>6)</sup>と比較すると男性の割合が増加しており、男性の歯並びに対する関心の高まりや受療意識の向上がうかがえた。また、女性の方が多なのは、年齢別分布(図4)でも示されている通り、男性に比べると高齢になっても矯正治療を行う人が多く幅広い年齢層での矯正治療への関心が高い事が推測された。矯正歯科治療の必要性に男女差はないが、男性よりも女性の方が審美的な改善に対する要求が高いものと考えられた。

### 2) 年齢別分布(図4)

治療開始登録年齢は男女ともに学童期と青年期にピークが見られた。これは、学童期のピークは前歯の永久歯交換と第一大臼歯が萌出完了し永久歯交換に伴い歯列不正が発見されやすい時期であり、またI期治療開始のタイミングである<sup>7)</sup>。また青年期のピークは保険診療の割合が高く、顎変形症の治療可能時期と考えられる。これらの傾向は他の医療機関<sup>8,9)</sup>においても同様であった。また、今回の調査では6歳から72歳まで幅広い年齢層で矯正歯科治療が行われており、当科の2016年の調査では<sup>1)</sup>60歳以上の患者はいなかったのに対し今回の調査では7名であった。歯科疾患実態調査においても平成28年の60歳から65歳までで20本以上自分の歯を有する人の割合は85.2%となり増加傾向を示している<sup>10)</sup>。高齢者においても有する歯数が増えたことにより矯正歯科治療の対象者が増加していること、成人においても矯正治療が可能であるという啓発活動による認



知度の増加により、より広い年齢層において矯正歯科治療が行われるようになったと示唆された。また年齢が高くなるにしたがって補綴物、歯周病等も増加することから、成人の矯正歯科治療については、今後より一層他科との連携を行うことが必要であると考えられる。

### 3) 治療内容別分布 (図5, 6)

自費診療と保険診療の割合は56:44(698人:548人)となり当科の以前の報告<sup>1)</sup>では自費診療:保険診療の割合は66:34と比較すると、保険診療の割合が顕著に増加していた。これは患者本人の外科的矯正治療の情報、知識の向上、咬合や顔貌の改善への意識が高くなっていること、また周囲の人の顎変形症に対する理解が高くなり治療を進めやすい環境となっているのではないかと考えられる。

不正咬合別分布では、自費診療においては叢生が約40%と最も多く、次いで上顎前突が約20%となっていた。この傾向はこれまでの当病院の報告<sup>7)</sup>や他医療機関の報告<sup>11,12)</sup>に類似していた。歯科疾患実態調査においても12歳から20歳では叢生は約26%、4mm以上のオーバージェットは約40%<sup>10)</sup>であり、叢生や上顎前突が不正咬合であるとの認識が高く、また矯正歯科治療により歯並びの改善や口元の突出感の改善が可能であるということが周知されてきていると考えられた。一方で下顎前突は保険診療において最も割合が高く約60%を示していた。反対咬合は症状が明瞭であり患者は顔貌の改善を強く望むため多くの患者が骨格的改善を希望していると考えられた。

## 2. アンカースクリュー使用状況について

### 1) 使用状況 (表1, 図7)

登録患者のうちアンカースクリューを使用して治療した患者は26.3%であり、うち自費診療が17.0%、保険診療が8.6%であった。これは他大学病院における2004年から10年間の平均アンカースクリュー使用患者割合9.1%と比較し、かなり高い値を示していた<sup>13)</sup>。この要因としては2014年からアンカースクリューが保険収載され、健康保険が適応となる顎変形症や多数歯欠損等においても使用できるようになり治療対象が拡大したこと、またアンカースクリューに対する知識、研究および臨床データの蓄積によりアンカースクリューを使用した治療が一般的な治療方法となっていること、さらに患者側もネット等を通じて容易に情報が得られるようになったことが考えられる。

### 2) アンカースクリュー植立部位 (表2, 図1, 8)

5年間のアンカースクリュー使用率は26.3%であるが、各年ともに保険診療と比較し自費診療における使用率が高く、診療内容別に見てみると自費診療保険診療ともに上顎骨におけるアンカースクリュー使用率が最も高くこれは、他医療機関の報告<sup>14,15)</sup>と同様な結果であった。これは自費診療においては叢生と上顎前突が多く(図6A)トータルディスクレパンシーが大きい患者が多いこと、また、上顎は下顎と比較しアンカーロスが生じやすいため<sup>16)</sup>大臼歯固

定源としての使用頻度が高かったと考えられる。

アンカースクリュー植立部位について、上顎歯槽部が50.0%、下顎歯槽部が36.7%となっており歯槽部が大部分を占めていた。これは両隣在歯歯根との間に十分なスペースがあることや術野の確保が容易、操作の容易性から植立部位として選択されることが多いと思われる<sup>17)</sup>。また口蓋は11.3%となり歯槽部に比べると使用割合は少ないが、歯根間距離が不足している場合や遠心移動、圧下等のために使用されておりその多様性からも今後幅広い治療法として使用される可能性があり、今後さらにアンカースクリューの植立部位と使用目的を詳細に検討することでより確実な治療メカニクスが確立すると考えられる。

## 結 論

平成28年度から令和2年度の5年間に日本大学歯学部付属歯科病院歯科矯正科を受診した患者の実態調査を行った結果、以下の結論が得られた。

1. 5年間の初診患者総数は2739人、登録患者総数は1472人、登録率は53.7%であり、当科の以前の報告と比較し増加していた。
2. 年齢別では学童期と青年期に相当する年齢層が多く、当科の以前の報告と比較しより高齢患者の増加を認められた。
3. 治療内容別では保険診療患者の割合は36.9%となり、当科の以前の報告と比較し2.6%のわずかな増加を認めた。
4. アンカースクリューの使用率は登録患者の26.3%であり、内訳として自費診療の使用率が17.0%、保険診療の使用率が8.6%、MTMの使用率が0.01%であった。
5. アンカースクリュー植立部位は上顎歯槽部50.0%、下顎歯槽部36.7%であり、歯槽部への植立が大多数を占めていた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 小川麻衣, 高橋康代, 伏木怜奈, 堀貫恵利, 馬谷原琴枝, 清水典佳 (2016) 日本大学歯学部付属歯科病院歯科矯正科における実態調査—来院患者数及びその分布について—. 日大歯学90, 53-60.
- 2) 厚生労働省. 平成29年患者調査 上巻(全国), 上巻第54表, 歯科診療所の推計患者数, 初診-再来×性・歯科分類別. [https://www.e-stat.go.jp/dbview?sid=0003\\_318613](https://www.e-stat.go.jp/dbview?sid=0003_318613) (2022年11月26日アクセス)
- 3) 厚生労働省. 令和2年患者調査 全国編, 閲覧(報告書非掲載表) 第109表, 歯科診療所の推計患者数, 初診-再来×性・歯科分類別. [https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00450022&kikan=00450&tstat=000001031167&cycle=7&tclass1=000001166809&tclass2=000001166811&tclass3=000001166812&tclass4=000001166814&result\\_page=1&tclass5val=0](https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00450022&kikan=00450&tstat=000001031167&cycle=7&tclass1=000001166809&tclass2=000001166811&tclass3=000001166812&tclass4=000001166814&result_page=1&tclass5val=0) (2022年11月26日アクセス)
- 4) 金澤成美, 山本隆昭, 高田賢二, 藤井元太郎, 石橋抄織, 佐

- 藤嘉見, 原口直子, 今井 徹, 中村進治 (1998) 北海道大学歯学部附属病院を受診した矯正患者の過去15年間の変遷. 日矯歯会誌57, 92-102.
- 5) 眞館幸平, 丹原 惇, 高橋功次朗, 佐藤知弥子, 坂上 馨, 竹山雅規, 齋藤 功 (2021) 新潟大学医歯学総合病院矯正歯科における初診患者の臨床統計調査—2005年から2017年の13年間のデータをもとに—. 新潟歯会誌51, 79-87.
- 6) 滝本清美, 浅野雅子, 田村隆彦, 清水典佳 (2007) 日本大学歯学部附属歯科病院矯正科に来院した外科矯正患者の臨床統計的調査. 日大歯学81, 207-212.
- 7) 中川弘二, 永田 温, 菅居達昌, 納村晋吉 (2002) 日本大学歯学部附属歯科病院矯正科における患者の統計的観察. 日大歯学76, 171-176.
- 8) 廣瀬将邦, 中村真治, 黒田栄子, 福井和徳, 氷室利彦 (2006) 奥羽大学歯学部附属病院における過去5年間の矯正歯科患者の統計学的観察. 日矯歯会誌65, 36-41.
- 9) 森山直子, 宮澤 健, 名和弘幸, 後藤滋巳 (2010) 愛知学院大学歯学部附属病院矯正歯科における来院患者の実態調査. 日矯歯会誌69, 44-50.
- 10) 厚生労働省. 平成28年歯科疾患実態調査. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-28.html> (2022年11月24日アクセス)
- 11) 永田裕保, 山本照子, 岩崎万喜子, 反橋由佳, 田中栄二, 川上正良, 高田健治, 作田 守 (1994) 過去15年間に大阪大学歯学部附属病院矯正科に来院した矯正患者の統計的観察. 日矯歯会誌53, 598-605.
- 12) 伊藤 綾, 喜田賢司, 宮崎晴代, 末石研二, 古賀正忠, 坂本輝雄, 野島邦彦, 原崎守弘, 谷田部賢一, 一色泰成, 渡辺和也 (2001) 東京歯科大学水道橋病院矯正歯科における過去10年間の新規来院患者の動向について. 歯科学報101, 542-550.
- 13) 加藤真麻, 岡嶋侑奈, 野嶋邦彦, 西井 康, 末石研二 (2016) 千葉病院矯正歯科における10年間の歯科矯正用アンカースクリューの臨床調査. 歯科学報116, 43-49.
- 14) 川崎五郎, 馬場信行, 柳本惣市, 山田慎一, 吉富 泉, 河野俊広, 水野明夫, 梅田正博 (2013) 当科において植立した矯正用インプラントアンカーの臨床的検討. 日口診断会誌26, 11-16.
- 15) 山田 聡, 渡邊裕加, 弘部 悠, 三宅真規子, 森 敏雄, 村上翔子, 野井将大, 渋谷亜佑美, 足立 健, 堀澤建介, 服部愛彦, 越沼伸也, 山本 学 (2017) 当科における矯正用インプラントアンカーの臨床統計学的検討. 滋賀歯医師会誌5, 3-6.
- 16) Graber LW, Vanarsdall Jr.RL, Vig KWL, Huang GJ (2016) Orthodontics: Current Principles and Techniques, 6<sup>th</sup> ed, Mosby, St Louis, 131-132.
- 17) 公益社団法人日本矯正歯科学会. 歯科矯正用アンカースクリューガイドライン. <https://www.jos.gr.jp/medical/3885> (2023年1月14日アクセス)

# Propiece IL-1 $\alpha$ の核内への輸送機構と核内機能

石 山 雄 一

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

日本大学歯学部病理学講座

(指導: 浅野正岳 教授, 角田麻里子 助教)

## 要旨

**【目的】** precursor (pIL-1 $\alpha$ ) の N 末端側は propiece IL-1 $\alpha$  (ppIL-1 $\alpha$ ) と呼ばれる。本研究では, ppIL-1 $\alpha$  の核内への輸送機構と核内機能について検討した。

**【方法】** 緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグ付き IL-1 $\alpha$  を導入した HeLa 細胞を用いて, ppIL-1 $\alpha$ , pIL-1 $\alpha$ , mL-1 $\alpha$  の細胞内局在を観察した。ppIL-1 $\alpha$  の核への輸送機構は importin  $\beta$  阻害薬を用いて検索した。また, ppIL-1 $\alpha$  の核内機能は, IL-8 mRNA の発現変化を real-time PCR によって検討した。

**【結果】** 蛍光顕微鏡による観察の結果, mL-1 $\alpha$  は細胞質にびまん性に, pIL-1 $\alpha$  と ppIL-1 $\alpha$  は主に核に局在していることがわかった。ppIL-1 $\alpha$  transfectant に importin  $\beta$  阻害薬を作用させても, ppIL-1 $\alpha$  の核局在に何ら影響を及ぼさなかった。HeLa 細胞における ppIL-1 $\alpha$  の強制発現は IL-8 mRNA の発現を増強した。

**【結論】** ppIL-1 $\alpha$  の核輸送は, importin  $\beta$  非依存的であることが解った。また, ppIL-1 $\alpha$  は核内で IL-8 遺伝子発現の増強に寄与していることが明らかとなった。

**キーワード:** propiece IL-1 $\alpha$  (ppIL-1 $\alpha$ ), alarmin, IL-8

## The mechanism of ppIL-1 $\alpha$ nuclear transport and its function

Yuichi Ishiyama

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Masatake Asano, Assist. Prof. Mariko Tsunoda)

## Abstract

**【Purpose】** N-terminal domain of precursor (p) IL-1 $\alpha$  is designated as propiece (pp) IL-1 $\alpha$ . The purpose of this study was to elucidate the mechanism of ppIL-1 $\alpha$  nuclear transport and its function.

**【Methods】** Subcellular localization of ppIL-1 $\alpha$ , pIL-1 $\alpha$ , and mL-1 $\alpha$  was observed in HeLa cells transfected with green fluorescent protein (GFP) -tagged IL-1 $\alpha$ . ppIL-1 $\alpha$  nuclear transport mechanism was investigated using importin  $\beta$  inhibitor. ppIL-1 $\alpha$  nuclear function was examined by measuring the IL-8 mRNA expression using real-time PCR.

**【Results】** Microscopic examination revealed diffuse cytoplasmic localization of mL-1 $\alpha$ . On the other hand, pIL-1 $\alpha$  and ppIL-1 $\alpha$  were localized mainly in the nucleus. Incubation of ppIL-1 $\alpha$  transfectant with importin  $\beta$  inhibitor did not affect its nuclear localization. Forced expression of ppIL-1 $\alpha$  enhanced IL-8 mRNA expression.

**【Conclusion】** Inhibition of importin  $\beta$  did not affect the transport of ppIL-1 $\alpha$  into the nucleus. In addition, ppIL-1 $\alpha$  contributes to enhancing IL-8 mRNA expression in the nucleus.

**Keywords:** propiece IL-1 $\alpha$  (ppIL-1 $\alpha$ ), alarmin, IL-8

## 緒 言

Alarmin は損傷した細胞から放出される分子であり<sup>1)</sup>, 周囲の組織に炎症反応を誘導し, 生体の自然免疫系や獲得免疫系を活性化する警告信号として機能している。

Interleukin (IL)-1 $\alpha$  は, 細胞が低酸素状態, 酸化ストレスや熱刺激などに晒されたときに放出される代表的な alarmin であり<sup>2)</sup>, 血管新生や創傷治癒など様々な反応に関与している。IL-1 $\alpha$  は細胞質で 31 kDa の precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) として産生された後, Ca<sup>2+</sup> 依存性タンパク質分

(受付: 令和 4 年 12 月 21 日)

責任著者連絡先: 石山雄一

日本大学歯学部病理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8124

FAX: 03-3219-8340

E-mail: deyul8002@g.nihon-u.ac.jp

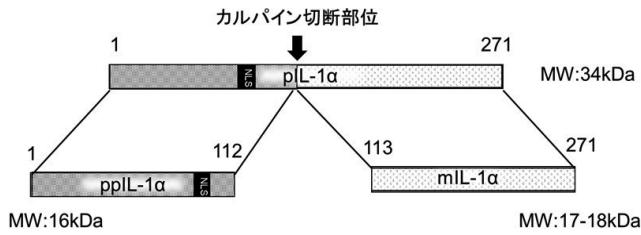


図1 IL-1αの構造

IL-1αは前駆体 IL-1α (pIL-1α) として細胞内で産生される (1-271)。pIL-1αは酵素的に切断されて ppIL-1α (N末端1-112) と mL-1α (C末端113-271) が生成される。核局在配列 (NLS) は79-86に位置する。数字はアミノ酸の位置を示す。

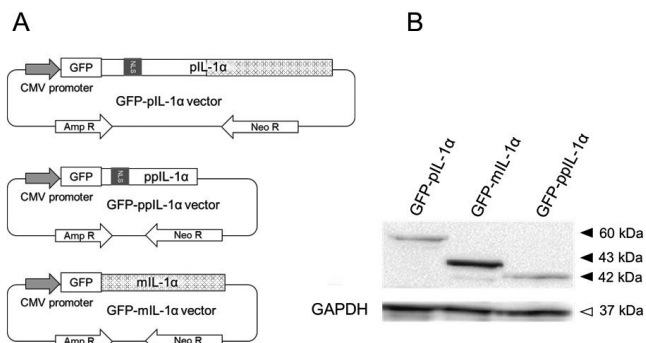


図2 実験に使用した発現ベクターと transfectant におけるそれぞれの発現

(A) 3種類の IL-1α の DNA 断片を pEGFP-C3 ベクターにライゲーションして GFP と融合させた。(B) それぞれのベクターによる transfectant から、細胞溶解液を回収して、WB でタンパク質発現を確認した。

解酵素<sup>3-5)</sup>, granzyme B<sup>6)</sup> や thrombin<sup>7)</sup> などの酵素によって切断される。酵素切断の結果、N末端の propiece IL-1α (ppIL-1α) と C末端の mature IL-1α (mIL-1α) が生成される (図1)<sup>8,9)</sup>。pIL-1α と mL-1α は細胞外に分泌され、IL-1 receptor type I を介してシグナル伝達し機能を発揮する<sup>10)</sup>。さらに、pIL-1α と ppIL-1α は核局在配列 (NLS) の存在により核に輸送され<sup>11)</sup>、標的遺伝子の転写制御に寄与するとされている<sup>8,12)</sup>。また、pIL-1α は核クロマチン<sup>13)</sup> や他の核内タンパク質に結合することが報告されている<sup>14,15)</sup>。しかしながら、ppIL-1α の核内輸送のメカニズムや核内機能は完全には解明されていない。そこで、本研究では、ppIL-1α の核内輸送メカニズムの解明を目指すとともに、核内における遺伝子発現への関与について検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞

ヒト子宮癌由来の線維芽細胞 (HeLa 細胞) は医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 生物資源バンク (大阪) から入手した。細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS)、50 μg/ml ストレプトマイシン、50 U/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養

した。

### 2. プラスミド構築

3種類の IL-1α の DNA テンプレートおよび pcDNA-ppIL-1α ベクターは Sata ら<sup>16)</sup> の方法を用いて作製した。各 IL-1α は pEGFP-C3 ベクター (Clontech, San Jose, CA, USA) に挿入し、N末端の緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグに融合した (GFP-pIL-1α, GFP-mIL-1α, GFP-ppIL-1α ベクター) (図2)。Transfection のために、各プラスミド (250 ng) と Plus 試薬 (0.75 μl) および Lipofectamin 3000 (0.75 μl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を、それぞれ 25 μl OPTI-MEM (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) に溶解した。両溶液を混合し、室温で15分間反応させた後、培養液に添加し 37°C で18時間培養した。以上のように処理した細胞を transfectant として、その後の実験に供した。

### 3. cover slip 実験

HeLa 細胞 (5 × 10<sup>4</sup>/well) を 24well プレートに入れた cover slip (直径10mm: 松波硝子工業, 東京) 上に播種した。37°C、18時間培養後、上記方法によって GFP-pIL-1α, GFP-mIL-1α, GFP-ppIL-1α を transfection した。細胞を 37°C に加温したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。さらに PBS で洗浄後、DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いて cover slip をスライドガラスに封入した。観察および画像の撮影には、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を使用した。また、エネルギー依存性の ppIL-1α 核内輸送の有無を調べるために、importin β の阻害薬である importazole (10 nM, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) の存在下または非存在下で 37°C、6時間培養し、観察を行った。

### 4. real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

HeLa 細胞 (1 × 10<sup>5</sup>/48 well plate) に、pcDNA または pcDNA-ppIL-1α を transfection した。18時間後、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を精製した。相補的 DNA は、Superscript III 逆転写酵素 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を用いて合成した。

表1 プライマーの配列

Target gene	Oligonucleotide sequence	Genbank acc. no.
IL-8	Forward: 5' - ATGACTTCCAAGCTGGCC - 3'	NM_000584.4
	Reverse: 5' - CTTCTCCACAACCCTCTGC - 3'	
β - Actin	Forward: 5' - GGAGCAAGTATCTTGATCTTC - 3'	NM_007393
	Reverse: 5' - CCTTCTGCGCATGGAGTCCTG - 3'	



real-time PCRは、CFX 96 real-time system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) でTB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を用いて行った。本研究で使用したプライマーを表1に示す。pcDNA transfectant および ppIL-1 transfectant における IL-8 の遺伝子発現を内在性コントロール ( $\beta$ -actin) に対する比として  $\Delta\Delta$ CT 法で算出した。前者の値を1とした時の、これに対する ppIL-1a transfectant における遺伝子の増幅量をデータとして示した。

### 5. ウェスタンブロッティング (WB)

作製した transfectant を PBS で2回洗浄し、500 $\mu$ l の細胞溶解液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100) を用いて溶解させた。BioRad protein assay kit (Bio-Rad) を用いて総タンパク濃度を測定し、40ng のタンパクを12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。WBはOmigariら<sup>17)</sup>の方法に従って行った。一次抗体として、マウス抗 GFP 抗体 (Proteintech, Rosemont, IL, USA;  $\times$ 10,000) を1% BSA diluted in 0.1% Tween-20/PBS (1% BSA-PBST) で希釈し、室温で1時間反応させた。二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA;  $\times$ 8,000) を用い、室温で1時間反応させた。なお、核抽出液は NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) で精製し、WBに供した。核の内在性コントロールには Lamin B を用いた。一次抗体としてウサギ抗ヒト Lamin B 抗体 (Proteintech;  $\times$ 1,000) および二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch;  $\times$ 6,000) を使用した。

### 6. 統計学的解析

統計解析は、正規性を Shapiro-Wilk 検定、等分散性を Levene 検定で確認した後、Student's *t*-test を用いた。結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表した。0.05未満の *p* 値は統計的に有意であるとみなした。

## 結 果

#### 1. IL-1 $\alpha$ の細胞内局在

GFP-pIL-1a, GFP-ppIL-1a, GFP-mIL-1a の3種類 (図2A) の分子の発現について WB で確認したところ、GFP-pIL-1a は60 kDa, GFP-mIL-1a は43 kDa, GFP-ppIL-1a は42 kDa の単一のバンドとして検出された (図2B)。次に、IL-1 $\alpha$  分子の細胞内局在について検索した。その結果、mIL-1a は細胞質にびまん性に分布し、pIL-1a と ppIL-1a は主に核に局在していた (図3A)。この結果を確認するために、transfectant から核抽出液を調整し WB により検討したところ、ppIL-1a のバンドが検出された (図3B)。

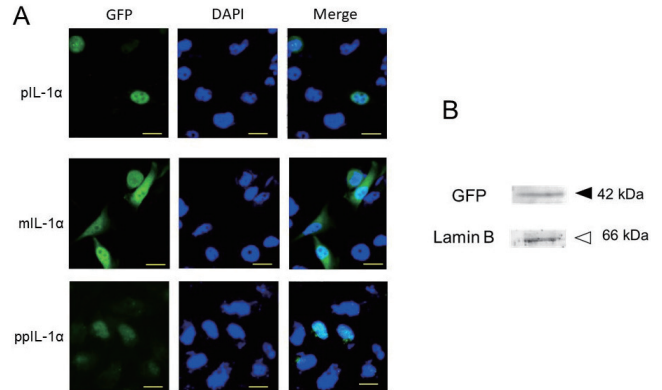


図3 IL-1 $\alpha$  の細胞内局在

(A) HeLa 細胞に GFP-pIL-1 $\alpha$ , GFP-mIL-1 $\alpha$ , および GFP-ppIL-1 を transfection した。transfection 後、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。核は DAPI で染色した (scale bar: 10  $\mu$ m)。 (B) GFP-ppIL-1 $\alpha$  transfectant から核抽出液を調整し、WB に供した。核内部コントロールとして Lamin B を用いた。

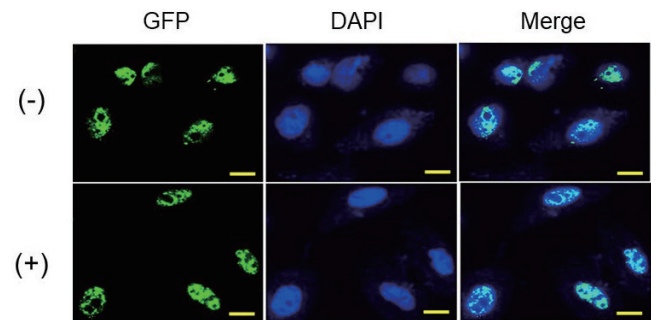


図4 ppIL-1 $\alpha$  の核への輸送

GFP-ppIL-1 $\alpha$  transfectant を、importin  $\beta$  阻害薬である importazole (10 nM) 存在下 (+: 下段) または非存在下 (-: 上段) で6時間培養した (scale bar: 10  $\mu$ m)。その後、細胞内 GFP-ppIL-1 $\alpha$  の局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。

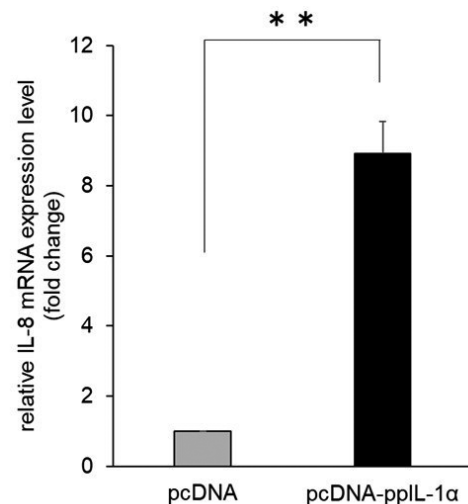


図5 ppIL-1 $\alpha$  による IL-8 mRNA の発現増強

HeLa 細胞に pcDNA (control) または pcDNA-ppIL-1 $\alpha$  ベクターを transfection し、18時間培養した。その後、total RNA を精製し、real-time PCR により IL-8 mRNA の発現量を測定した。内在性コントロール ( $\beta$ -actin) の発現量を1として、これに対する ppIL-1 $\alpha$  transfectant における IL-8 発現量を比で表した。プライマー配列を表1に示した。\*\**p* < 0.01 (n = 5)。



## 2. ppIL-1 $\alpha$ の核への輸送

ppIL-1 $\alpha$ の核への局在は、核と細胞質との間の受動拡散によるものではないことが Kudo ら<sup>18)</sup>により確認されている。そこで、エネルギー依存的核輸送に必須の importin  $\beta$  の関与について、importin  $\beta$ 阻害薬である importazole の存在下および非存在下で ppIL-1 $\alpha$  transfectant を培養することにより確認した。その結果、核における ppIL-1 $\alpha$ の局在には何ら変化が認められなかった (図 4)。

## 3. ppIL-1 $\alpha$ による IL-8 mRNA の発現増強

ppIL-1 $\alpha$ は、核において IL-8 遺伝子発現を増強することが報告されている<sup>19)</sup>。そこで、HeLa 細胞においても ppIL-1 $\alpha$ の強制発現が IL-8 mRNA 発現を増強させるかという点について検討した。その結果、IL-8 mRNA 発現レベルは、ppIL-1 $\alpha$ の組み込まれていない pcDNA transfectant に比べて ppIL-1 $\alpha$  transfectant で  $8.9 \pm 0.91$  倍に増加していた (図 5)。

## 考 察

GFP タグ付き IL-1 $\alpha$ 発現ベクターを用いた本研究では、mIL-1 $\alpha$ は細胞質にびまん性に分布し、pIL-1 $\alpha$ と ppIL-1 $\alpha$ は主に核に局在することが確認された。これまでの研究から、pIL-1 $\alpha$ の N 末端および C 末端へのタグの付与は、その機能に何ら影響を及ぼさないことが報告されており<sup>12)</sup>、これら分子の核局在は、従来の報告と一致するものであった。また、これらの分子の核局在には、NLS が極めて重要であり、NLS を欠失させることにより細胞質への移行を促すことが知られている<sup>18)</sup>。NLS は、importin  $\alpha$ または importin  $\beta$ などの核移行を担う分子によって認識される配列であり<sup>20)</sup>、IL-1 $\alpha$ が NLS を有していること自体がエネルギー依存性に核移行することを示唆している。しかし、IL-1 $\alpha$ の核内輸送のメカニズムについては Luheshi ら<sup>21)</sup>の報告があるのみで、低分子量 G タンパク質である Ran に依存する核内輸送とされている。そこで、importin  $\beta$ の阻害薬である importazole 存在下での ppIL-1 $\alpha$  transfectant の培養は ppIL-1 $\alpha$ の核局在に変化を及ぼすものと予測した。しかし本研究の結果、ppIL-1 $\alpha$ が NLS を有しながらも、importazole による影響を受けなかったことから、ppIL-1 $\alpha$ の核局在は importin  $\beta$ 非依存性であることが示唆された。これまで importin  $\alpha$ は、核内輸送される分子と importin  $\beta$ との結合を仲介するアダプター分子と考えられてきたが<sup>20)</sup>、近年の研究で、importin  $\alpha$ のみによって核内輸送される機構があることが判明している<sup>22)</sup>。当研究室のこれまでの実験で、pIL-1 $\alpha$ が importin  $\alpha$ と結合することを免疫沈降実験により確認している。また、IL-1 $\alpha$ 分子内に存在する NLS 配列を、細胞膜を通過できない分子に融合させると、この分子が脂質 2 重膜を通過することが知られている<sup>23)</sup>。従って、NLS を欠失した IL-1 $\alpha$ を細胞に transfection すること

により発現させた細胞では、IL-1 $\alpha$ が脂質 2 重膜である核膜を通過できずに細胞質に拡散した結果である可能性も考えられる。ppIL-1 $\alpha$ の核内への輸送については今後さらに検討を加える必要がある。

一方、核に輸送された ppIL-1 $\alpha$ は、どのようなメカニズムで核局在しているのであろうか。ppIL-1 $\alpha$ に結合する分子としては、これまでに HAX-1 や Necdin などが報告されている<sup>14, 15)</sup>。この中で、アポトーシスに関連する分子としての HAX-1 は、pIL-1 $\alpha$ の N 末端側に結合部位が存在するとされている<sup>14)</sup>。しかし、細胞内局在や機能が多様であることから、pIL-1 $\alpha$ の核局在に果たす役割については未だ不明である。マウスのマクロファージでは、pIL-1 $\alpha$ が核クロマチンに結合しているとの報告もあるが<sup>13)</sup>、ヒトにおいてはこの事実は確認されていない。pIL-1 $\alpha$ は、細胞膜貫通タンパク質や分泌タンパク質が有するシグナルペプチドを欠いており<sup>24)</sup>、一般的なタンパク質の産生ルートである小胞体—ゴルジ体輸送を経由しないとされている。従って、細胞外への分泌メカニズムも解決されておらず、多くの疑問点が残されている。

ppIL-1 $\alpha$ は、様々なタンパク質の遺伝子発現に寄与していることが示されている<sup>12)</sup>。なかでも、IL-8 遺伝子の発現に対する機能は着目されている。これは IL-8 が、炎症増悪とともに、血管新生など創傷治癒にも寄与するなど多彩な機能を有するためである<sup>25)</sup>。本研究によって、線維芽細胞である HeLa 細胞においても、ppIL-1 $\alpha$ の過剰発現が IL-8 mRNA の発現を増大させることが明らかとなった。このことは、ppIL-1 $\alpha$ が IL-8 遺伝子発現を転写レベルで増強させ、その分泌を促進し、炎症反応または血管新生反応を拡大していく機能を有するものと考えられた。

本研究の結果、ppIL-1 $\alpha$ の核への輸送は importin  $\beta$ 非依存性であり、核内では、IL-8 などの遺伝子発現に転写レベルで関与している可能性が示唆された。

## 結 論

本研究では、3 種類の IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ , mIL-1 $\alpha$  および ppIL-1 $\alpha$ ) を HeLa 細胞に transfection することで、各 IL-1 $\alpha$  の細胞内における局在および ppIL-1 $\alpha$ の核内輸送や核内機能について検討した。その結果、以下の知見を得た。

1. 細胞内で、mIL-1 $\alpha$ は細胞質に拡散的に分布し、pIL-1 $\alpha$ と ppIL-1 $\alpha$ は主に核に局在した。
2. ppIL-1 $\alpha$ の核局在は、importin  $\beta$ に依存しなかった。
3. ppIL-1 $\alpha$ は IL-8 遺伝子発現に転写レベルで関与していた。

以上の結果から、ppIL-1 $\alpha$ は核内において、IL-8 の発現増強を介して、炎症反応を拡大することが示唆された。

本研究の推進にあたり、病理学講座 浅野正岳教授、角田麻里子助教および講座員の皆様にご指導頂いた。ここに深甚なる感謝の意を表す。本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White RM, Dinarello ACh, Apte N R (2011) IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187, 4835-4843.
- 3) Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *U S A* 87, 5548-5552.
- 4) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 $\alpha$  precursor. *J Biol Chem* 266, 12162-12167.
- 5) England H, Summersgill HR, Edye ME, Rothwell NJ, Brough D (2014) Release of interleukin-1 $\alpha$  or interleukin-1 $\beta$  depends on mechanism of cell death. *J Biol Chem* 289, 15942-15950.
- 6) Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 $\alpha$ . *Mol Cell* 44, 265-278.
- 7) Burzynski LC, Humphry M, Pyrillou K, Wiggins KM, Chan JNE, Figg N, Kitt LL, Summers C, Taham KC, Martin PB, Bennett MR, Clarke MCH (2019) The coagulation and immune systems are directly linked through the activation of interleukin-1 $\alpha$  by thrombin. *Immunity* 50, 1033-1042.
- 8) Stevenson FT, Turck J, Locksley RM, Lovett DH (1997) The N-terminal propiece of interleukin 1 $\alpha$  is a transforming nuclear oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 508-513.
- 9) Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R (2015) Processing of interleukin-1 family cytokines: variations on a common theme. *Immunity* 42, 991-1004.
- 10) Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, Azam T, Kim S, Dinarello CA (2013) The interleukin-1 $\alpha$  precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front Immunol* 4, 391.
- 11) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 $\alpha$  and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 12) Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello AC, Apte NR (2004) The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2434-2439.
- 13) Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C (2013) Endogenous IL-1 $\alpha$  is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 63, 135-144.
- 14) Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L (2001) Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 15, 122-137.
- 15) Hu B, Wang S, Zhang Y, Feghali CA, Dingman JR, Wright TM (2003) A nuclear target for interleukin- 1 $\alpha$ : interaction with the growth suppressor necdin modulates proliferation and collagen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10008-10013.
- 16) Sata E, Takada L, Kaetsu R, Fukasawa M, Ohtsu M, Motoyoshi M, Asano M (2020) A new enzyme-linked immunosorbent assay system against the N-terminal propiece of interleukin-1 $\alpha$ . *J Oral Sci* 62, 340-343.
- 17) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K (2009) Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 156, 294-302.
- 18) Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M (2022) Nuclear localization of propiece IL-1 $\alpha$  in HeLa cells. *J Oral Sci* 64, 151-155.
- 19) Yang HT, Cohen P, Rousseau S (2008) IL-1 $\beta$ -stimulated activation of ERK1/2 and p38 $\alpha$  MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- $\alpha$  in HeLa cells. *Cell Signal* 20, 375-380.
- 20) Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1439-1457.
- 21) Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D (2009) The dynamics and mechanisms of interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  nuclear import. *Traffic* 10, 16-25.
- 22) Ogawa Y, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y (2012) The interaction between importin-  $\alpha$  and Nup153 promotes importin-  $\alpha/\beta$  -mediated nuclear import. *Traffic* 13, 934-946.
- 23) Koo JH, Yoon H, Kim WJ, Lim S, Park HJ, Choi JM (2014) Cell membrane penetrating function of the nuclear localization sequence in human cytokine IL-1 $\alpha$ . *Mol Biol Rep* 41, 8117-8126.
- 24) Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74, 213-218.
- 25) Fousek K, Horn LA, Palena C (2021) Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol Ther* 219, 107692.

IL-1 receptor type 2による細胞内 pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌抑制

定村正之

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

日本大学歯学部病理学講座

(指導: 浅野正岳 教授)

## 要旨

**【目的】** Interleukin-1 (IL-1) receptor (IL-1R) family の一員である IL-1R type 2 (IL-1R2) は、マクロファージ内において precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) と結合して、その分泌を抑制することが知られている。本研究では、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞においても、この抑制効果が維持されるか、その効果に細胞膜貫通領域の関与があるのかという点について検討した。

**【方法】** HeLa 細胞に、pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 を単独または co-transfection し、pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌量を ELISA にて測定した。また、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失した mutant ( $\Delta$ TM) を作製し、同様に pIL-1 $\alpha$  細胞外分泌量を測定した。それぞれの分子の細胞内局在を蛍光免疫染色により確認した。また、pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 の結合を免疫沈降実験とこれに続く western blot により検出した。

**【結果】** HeLa 細胞において、pIL-1 $\alpha$  は核に、IL-1R2 は細胞質に拡散して存在した。IL-1R2 存在下では、pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌を抑制した。また、 $\Delta$ TM は wild type IL-1R2 よりも pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌を強く抑制した。さらに、pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 は HeLa 細胞内で結合していることが確認された。

**【結論】** HeLa 細胞において、IL-1R2 は pIL-1 $\alpha$  と細胞内で結合し、pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌を抑制していることが示唆された。また、IL-1R2 の細胞膜貫通領域の存在は、pIL-1 $\alpha$  分泌に対して促進的に作用する可能性が考えられた。

**キーワード:** IL-1 $\alpha$ , IL-1R2, decoy receptor, 細胞膜貫通領域

Inhibition of pIL-1 $\alpha$  extracellular secretion by intracellular IL-1 receptor type 2

Masayuki Sadamura

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry

(Director: Prof. Masatake Asano)

## Abstract

**【Purpose】** Interleukin-1 (IL-1) receptor type 2 (IL-1R2) is a member of the IL-1R family. IL-1R2 was shown to bind with precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) in macrophage and inhibit its extracellular secretion. Using the human uterine cervical cancer-derived fibroblastic cell line (HeLa cell), the inhibitory function of IL-1R2, especially the transmembrane region, on pIL-1 $\alpha$  extracellular secretion was examined.

**【Methods】** HeLa cells were transfected with pIL-1 $\alpha$ , IL-1R2 or in combination with both plasmids and the pIL-1 $\alpha$  concentration in the culture supernatants were measured by ELISA. In addition, the plasmid containing the mutant IL-1R2 lacking the transmembrane region ( $\Delta$ TM) was constructed and examined as well. Intracellular localization of pIL-1 $\alpha$  and IL-1R2 was examined by immunofluorescence staining. The binding between pIL-1 $\alpha$  and IL-1R2 was detected with immunoprecipitation followed by western blot.

**【Results】** pIL-1 $\alpha$  was localized mainly in the nucleus. On the other hand, IL-1R2 was localized diffusely in the cytoplasm in HeLa cell. Intracellular IL-1R2 inhibited the extracellular secretion of pIL-1 $\alpha$ . The  $\Delta$ TM much highly suppressed pIL-1 $\alpha$  extracellular secretion. Moreover, both pIL-1 $\alpha$  and IL-1R2 bind each other and made an intracellular complex in the cytoplasm.

**【Conclusion】** Intracellular IL-1R2 inhibits the extracellular secretion of pIL-1 $\alpha$  by binding directly with intracellular pIL-1 $\alpha$  in the HeLa cell. The transmembrane region of IL-1R2 may have enhancing effect on pIL-1 $\alpha$  extracellular secretion.

**Keywords:** IL-1 $\alpha$ , IL-1R2, decoy receptor, transmembrane region

(受付: 令和5年1月13日)

責任著者連絡先: 定村正之

日本大学歯学部病理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8124

FAX: 03-3219-8340

E-mail: dema18018@gnihon-u.ac.jp

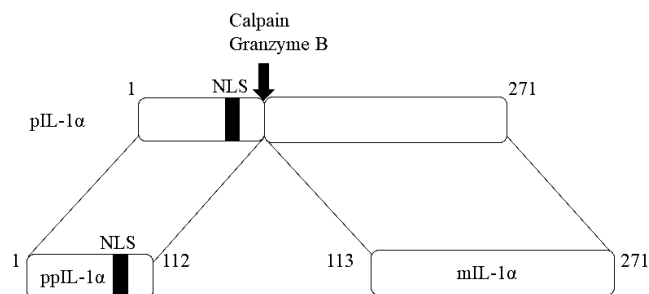


図1 pIL-1αの processing

IL-1αは pIL-1αとして細胞質内で産生されたのち、calpain や granzyme B などの酵素により分子のほぼ中央部で切断され、N 末端側の ppIL-1αと C 末端側の mIL-1αに分離する。ppIL-1α側に nuclear localization sequence (NLS) 配列が存在する<sup>2)</sup>。

## 緒言

細胞が障害を受けたときに放出される分子は alarmin と総称される<sup>1)</sup>。Interleukin-1 (IL-1) αは代表的な alarmin として知られている。IL-1αは細胞内で約31 kDaの前駆体 precursor IL-1α (pIL-1α) として産生され、図1に示すように calpain や granzyme B などの酵素によって propiece (pp) IL-1αと mature (m) IL-1αに切断される<sup>2)</sup>。

IL-1αの主要な受容体サブユニットとして、IL-1 receptor type 1 (IL-1R1) と type 2 (IL-1R2) が知られている。IL-1R1はシグナルを伝達できるのに対し、シグナル伝達に必要な配列である Toll/IL-1 Receptor (TIR) ドメインを欠く IL-1R2はシグナル伝達できない。このことから、IL-1R2は decoy receptor と呼ばれている<sup>3)</sup>。IL-1R2は、IL-1α および IL-1βと直接結合することでシグナル伝達を阻止するだけでなく、IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) とも複合体を形成し、IL-1α結合に伴うシグナル伝達を抑制する<sup>3,4)</sup>。IL-1R2ノックアウトマウスの解析から、IL-1R2の上記のような decoy receptor としての特性はマクロファージにおいて機能していることが明らかとなっているが、マクロファージ以外の細胞における IL-1R2の機能は未だ不明な点が多い<sup>4)</sup>。

Zheng ら<sup>5)</sup>は、IL-1R2は細胞膜上または細胞外で decoy receptor として機能しているだけでなく、細胞質内で pIL-1αと結合して pIL-1αの細胞外分泌を阻害することにより、無菌性炎症を抑制することを報告した。また、リポポリサッカライド (LPS) 刺激による caspase 活性化を介した細胞質内の IL-1R2分解は、pIL-1αと IL-1R2との結合を切断して pIL-1αの細胞外分泌を促進するとも報告している<sup>5)</sup>。本研究では、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞に IL-1R2と pIL-1αを強制発現させ、同様に pIL-1αの細胞外分泌抑制が起きるのかという点について検討を行った。また、IL-1R2の細胞膜貫通領域の pIL-1α細胞外分泌に対する役割についても解析した。

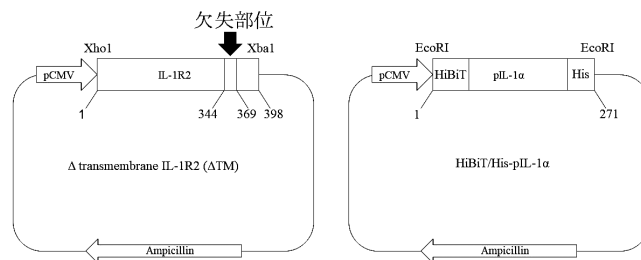


図2 Transfection に用いたベクター

ベクターの XhoI, XbaI間に IL-1R2を挿入した pCMV-SPORT 6 IL-1 receptor type 2 (pCMV-R2) を鋳型として transmembrane 領域 (黒矢印) である344-369のアミノ酸配列を欠失させたΔ transmembrane IL-1R2 (ΔTM) を作製した (左図)。pcDNA の EcoRI間へ N 末端に HiBiT-tag が付与されている pIL-1αを挿入した HiBiT-pIL-1αの C 末端に histidine-tag を付与した HiBiT/His-pIL-1αを作製した (右図)。

## 材料および方法

### 1. 細胞

本研究には、ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) を用いた。培養は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific) および1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) を添加したものを用い、インキュベータ (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) で行った。HeLa 細胞を24-well plate に  $5 \times 10^4$  cells/well となるように播種した。

### 2. Plasmid の構築と transfection

HeLa 細胞への IL-1R2の強制発現には、pCMV-SPORT 6 IL-1R2 (pCMV-R2, 理研 BRC, つくば) を用いた。このベクターを鋳型として細胞膜貫通領域の26アミノ酸残基 (ASSTFSWGIVLAPLSLAFLVLGGIWM) を欠失させた Δ transmembrane IL-1R2 (ΔTM plasmid) を、Quick change site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により作製した (図2)。また、Kudo ら<sup>6)</sup>が作製した HiBiT-pIL-1αの C-末端に histidine-tag を同 kit で挿入し、このベクターを HiBiT/His-pIL-1αとした。ΔTM 作製時に使用した primer 配列は次の通りである (forward 5'-CAC CAC AGT CAA GGA ACA CAG ACG GTG CAA AC-3' reverse 5'-GTT TGC ACC GTC TGT GTT CCT TGA CTG TGG TG-3')。作製したすべての plasmid は、DNA sequence 解析 (ファスマック, 厚木) によって DNA 配列に間違いがないことを確認した。なお、pCMV-R2の transfection によって発現する IL-1R2を wild type IL-1R2とした。

Transfection は、Lipofectamine 3000 reagent kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、次のように行った。それぞれの plasmid (250 ng) を OPTI-MEM (25 μl; GE



表1 pIL-1 $\alpha$ とIL-1R2の複合体の検出のための免疫沈降とwestern blotの条件

沈殿物	IPに用いたreagent	容量	WB検出reagent	検出物	図
①pIL-1 $\alpha$	Nickel-agarose beads	30 $\mu$ l	Nano Glo HiBiT	pIL-1 $\alpha$	図 6 A
	Nickel-agarose beads	30 $\mu$ l	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	IL-1R2	図 6 B
②IL-1R2	mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体	30 $\mu$ l	mouse anti-HiBiT 抗体	pIL-1 $\alpha$	図 6 C

免疫沈降実験において使用したbeadsおよび抗体を示す。

Healthcare, Chicago, IL, USA) に溶解し, 同 kit に含まれる3000 Reagent (0.75  $\mu$ l) と混和した。つぎに, 同 kit 中の Lipofectamine 3000 (0.75  $\mu$ l) を OPTI-MEM (25  $\mu$ l) に溶解した。両溶液を混合し, 室温で15分間反応させた。反応後, 混合液を培養液に添加し, 細胞と共に18時間培養した。培養後の細胞を transfectant として実験に用いた。

### 3. 蛍光免疫染色

HeLa 細胞 (5  $\times$  10<sup>4</sup> cell/well) を24-well plate 中に置いたカバースリップ (10 mm diameter, 松浪硝子工業, 大阪) に播種し, 18時間培養した。培養後, pIL-1 $\alpha$ およびIL-1R2を transfection し, 更に18時間培養した。上清を吸引除去し, カバースリップを0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後, 2% パラホルムアルデヒドにて室温で10分間固定した。再び PBS にて洗浄し, 1% Triton-X 100/PBS を加え, 室温で10分間処理した。PBS で洗浄し, 1% BSA/PBS にて室温で10分間非特異的のブロッキングを行った。蛍光免疫染色には, 一次抗体として mouse anti-histidine monoclonal 抗体 ( $\times$ 100希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA), mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 ( $\times$ 100希釈, Santa Cruz, Dallas, TX, USA) を, 二次抗体として FITC 標識 goat anti-mouse IgG monoclonal 抗体 ( $\times$ 100希釈, Proteintech) を用いた。核染色は, DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いて行った。細胞像は, オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を用いて観察し, 撮影した。

### 4. ELISA による pIL-1 $\alpha$ の定量

Transfection 後に培養液を交換し, 3, 6, 9 および12時間後に回収した培養上清を遠心分離し (16,900 $\times$ g, 1分間), 抽出した上清をサンプルとした。Quantikine human IL-1 $\alpha$  ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて pIL-1 $\alpha$ を定量した。

### 5. Western blot (WB) 法

Transfectant を PBS で洗浄後, 細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.5) にて細胞を溶解した。溶解液を遠心分離し, 抽出された上清を回収してサンプルとした。BioRad protein assay kit (BioRad Hercules, USA) を用いてサンプルの総タンパ

表2 wild type IL-1R2および $\Delta$ TMのpIL-1 $\alpha$ 分泌抑制

transfectant	pIL-1 $\alpha$ 量 (%)
pIL-1 $\alpha$ + pcDNA	100
pIL-1 $\alpha$ + wild type IL-1R2	47.0 $\pm$ 0.2*
pIL-1 $\alpha$ + $\Delta$ TM	26.4 $\pm$ 0.1*

pIL-1 $\alpha$  transfectant における細胞外pIL-1 $\alpha$ 分泌量を100%とし, wild type IL-1R2または $\Delta$ TMとのco-transfectant における細胞外pIL-1 $\alpha$ 分泌量を示した。5 サンプルを測定し, 結果を平均値  $\pm$  標準偏差で示した。\*:  $p < 0.05$  vs. pIL-1 $\alpha$  + pcDNA

ク量を定量し, 40 ng のタンパクを12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。Immobilon Transfer Membrane (Merck, Darmstadt Germany) に泳動後のタンパクを転写し, 1% BSA-PBS でブロッキングした。IL-1R2の検出には, 1次抗体として mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 ( $\times$ 500希釈, Santa Cruz), 2次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 ( $\times$ 5,000希釈, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) を用いた。pIL-1 $\alpha$ の検出は, 1次抗体として mouse anti-HiBiT monoclonal 抗体 ( $\times$ 1,000希釈, Promega Madison, USA), 2次抗体として HRP 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 ( $\times$ 5,000希釈, Jackson Immuno Research) を使用した。

### 6. 免疫沈降 (IP) と WB による pIL-1 $\alpha$ と IL-1R2 の複合体の検出

pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 の複合体形成の有無について, IP と WB により確認した。pIL-1 $\alpha$  の IP は, His-tag に特異的に結合する Nickel-agarose beads (タカラバイオ, 草津) を用いた (表1)。また, IL-1R2 の IP は, mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体 (Santa Cruz) と protein G sepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いた。それぞれの IP 後の WB による pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 の検出は, 表1 に示した抗体または検出試薬を用いた。このうち, HiBiT-tag の検出は, HiBiT に特異的に結合する Lg-BiT に HRP を結合させた Nano Glo HiBiT blotting system (Promega) を用いた。

### 7. 統計学的解析

データの正規性を Shapiro-Wilk 検定, 等分散性を Levene 検定で確認した。表2 は一元配置分散分析後 Tukey の多重比較を用いて解析した。図5 は ANOVA の分散分析法

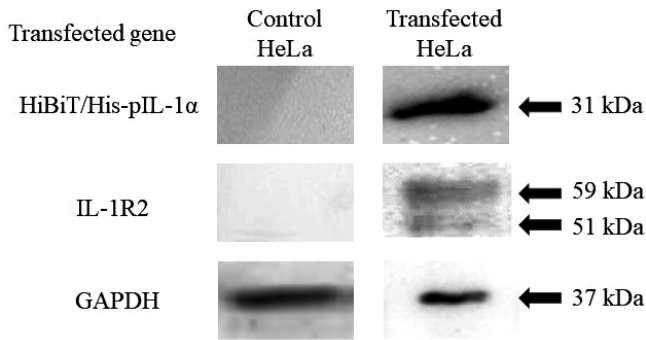


図3 Transfectant における pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 の発現  
pIL-1 $\alpha$  は 31 kDa の単一のパンドとして、IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のパンドとして検出された。Control HeLa 細胞ではパンドが検出できなかった。

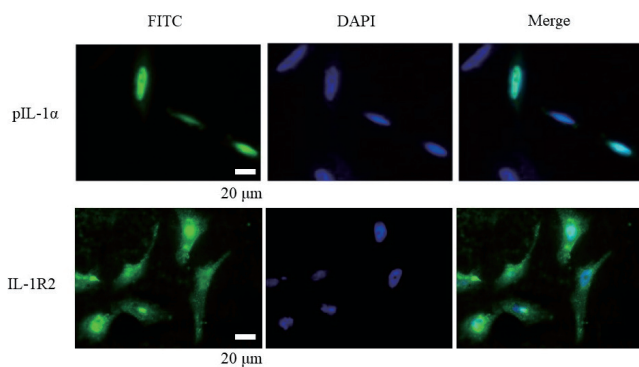


図4 Transfectant における pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 の細胞内局在  
pIL-1 $\alpha$  または IL-1R2 を transfection した HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

を用いて解析した。結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表した。0.05 未満の  $p$  値は統計学的に有意であるとみなした。

## 結 果

### 1. pIL-1 $\alpha$ および IL-1R2 の細胞内局在

Transfectant における pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 の発現を WB により確認した。その結果、pIL-1 $\alpha$  は 31 kDa の単一のパンドとして、また IL-1R2 は 59 kDa と 51 kDa の 2 本のパンドとして検出された (図 3)。一方、pcDNA transfectant では、パンドは検出されなかった。以上の結果から、HeLa 細胞においては内在性の pIL-1 $\alpha$  および IL-1R2 は存在しないことが明らかとなった。次に、それぞれの分子の細胞内局在について免疫蛍光染色により確認したところ、pIL-1 $\alpha$  は主に核に局在し、IL-1R2 は核および細胞質に拡散して存在することが明らかとなった (図 4)。

### 2. pIL-1 $\alpha$ 分泌量の経時的変化

pIL-1 $\alpha$  transfectant の培養上清中の pIL-1 $\alpha$  量を、ELISA を用いて経時的に測定した。培地交換後、3 時間で 149.7  $\pm$

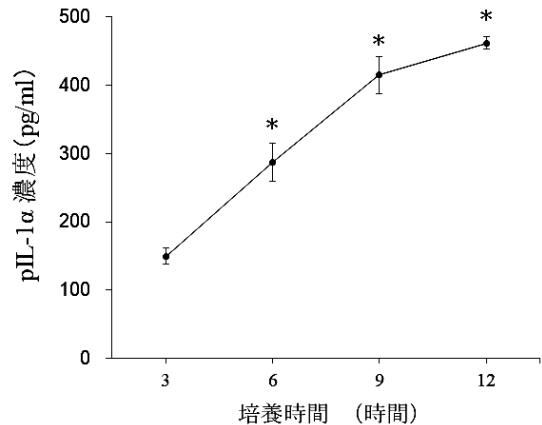


図5 pIL-1 $\alpha$  分泌量の経時的変化

同じ実験を 5 回繰り返し、それぞれのサンプルを triplicate で測定した。平均値  $\pm$  標準偏差でデータを示した。\*:  $p < 0.05$  vs. 3 時間後の pIL-1 $\alpha$  濃度

11.7 pg/ml, 6 時間で 287.0  $\pm$  27.9 pg/ml, 9 時間で 414.8  $\pm$  27.0 pg/ml, 12 時間で 461.9  $\pm$  8.6 pg/ml となり、経時的に培養上清中の pIL-1 $\alpha$  濃度は上昇した (図 5)。一方、insert の入っていないコントロールベクターである pcDNA transfectant では pIL-1 $\alpha$  量は検出限界以下であった。以上の結果から、培地交換後 6 時間で、培養上清中に ELISA によって検出可能な量の pIL-1 $\alpha$  分泌が認められたことから、以下の実験では、培地交換 6 時間後の培養上清中の pIL-1 $\alpha$  濃度を測定することとした。

### 3. IL-1R2 による pIL-1 $\alpha$ の分泌抑制

IL-1R2 が pIL-1 $\alpha$  の分泌にどのような影響を及ぼすのか検討するために、IL-1R2 存在下および非存在下で培養上清中の pIL-1 $\alpha$  量を測定した。その結果、pIL-1 $\alpha$  をコントロールベクター pcDNA と共に co-transfection した細胞における pIL-1 $\alpha$  量を 100% としたとき、IL-1R2 と pIL-1 $\alpha$  の co-transfectant した細胞では、pIL-1 $\alpha$  量は 47.0  $\pm$  0.2% に低下した (表 2)。次に、IL-1R2 の細胞膜貫通領域の pIL-1 $\alpha$  分泌に対する影響を確認するために、IL-1R2 の細胞膜貫通領域を欠失させた  $\Delta$ TM plasmid を pIL-1 $\alpha$  と共に transfection し、培養上清中の pIL-1 $\alpha$  量を測定した。その結果、pIL-1 $\alpha$  量は、pIL-1 $\alpha$  のみ transfectant した細胞と比較して、26.4  $\pm$  0.1% にまで低下した (表 2)。この結果から、細胞膜貫通領域を欠失した IL-1R2 は、wild type IL-1R2 よりも、pIL-1 $\alpha$  分泌に対する抑制効果が高いことが明らかとなった。

### 4. pIL-1 $\alpha$ と IL-1R2 の結合の確認

pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 の細胞内での結合の有無について、IP とこれに続く WB により確認した。その結果、表 1 に示す ① 上段の条件で、pIL-1 $\alpha$  単独および pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 の co-transfectant の両者において 31 kDa の pIL-1 $\alpha$  のバンド

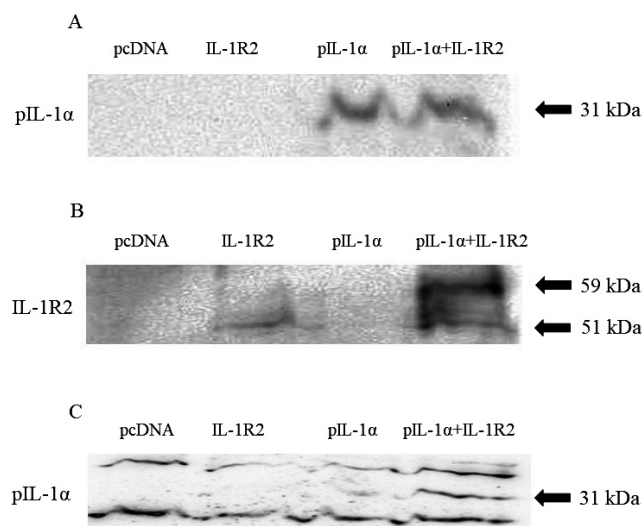


図6 pIL-1 $\alpha$ とIL-1R2の結合

pcDNA 単独, IL-1R2 単独, pIL-1 $\alpha$  単独および pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 の co-transfectant の細胞溶解液を調整し, 表2の方法によって IP および WB を行った。A: 表1①の方法で IP を行い, Nano Glo HiBiT により pIL-1 $\alpha$  を検出した。B: 表1①の方法で IP を行い, mouse anti-human IL-1R2 monoclonal 抗体で IL-1R2 の検出を行った。C: 表1②の方法で IP を行い, mouse anti-HiBiT 抗体で pIL-1 $\alpha$  の検出を行った。

が検出された(図6A)。また, 同じメンブレンを抗IL-1R2抗体にてWBを行ったところ(表1①下段), pIL-1 $\alpha$  とIL-1R2のco-transfectantにおいてのみ, IL-1R2のバンド(59 kDaおよび51 kDa)が検出された(図6B)。また, 抗IL-1R2抗体でIPしたものは(表1②の条件), pIL-1 $\alpha$  とIL-1R2のco-transfectantにおいてのみ, pIL-1 $\alpha$ のバンド(31 kDa)が検出された(図6C)。以上の結果から, pIL-1 $\alpha$ とIL-1R2が, 細胞質内で結合していることが明らかとなった。

## 考 察

pIL-1 $\alpha$ は, processingの結果ppIL-1 $\alpha$ とmIL-1 $\alpha$ に分断されるが, これら3種類の分子のうちpIL-1 $\alpha$ およびmIL-1 $\alpha$ のみが機能的分子であるとされる<sup>2)</sup>。また, サイトカインとしての活性は後者の方が高いとされ<sup>7)</sup>, 細胞内でprocessingされることによってより活性の高いmIL-1 $\alpha$ が細胞外に分泌され, 効率的に炎症を惹起するものと考えられている。活性は異なるものの, pIL-1 $\alpha$ およびmIL-1 $\alpha$ は細胞外に分泌され, 細胞膜表面で両者ともにIL-1R1に結合する。その後, アクセサリータンパクであるIL-1RAcPが会合し, 複合体を形成することでシグナルが伝達される。これによって転写因子NF- $\kappa$ BやAP-1カスケードが活性化され, 種々のサイトカインが産生されるなどして炎症反応が進行する<sup>2)</sup>。IL-1 familyには, 構造的に類似した11種類の分子があるが, この中でIL-1 receptor antagonistは, IL-1R1に結合した後, IL-1RAcPとの複合体を形成で

きないため, シグナルが伝達されない<sup>8,9)</sup>。また, IL-1 familyに属する分子であるIL-1R2はIL-1 $\alpha$ またはIL-1 $\beta$ と結合し, さらにIL-1RAcPとの複合体を形成するにも関わらず, 細胞内領域にTIRドメインを持たないため, シグナルを伝達できない<sup>4,8)</sup>。このようにIL-1 $\alpha$ シグナルの抑制系が複数存在することは, 炎症制御の多様性を示すものであるが, これに加えてZhengら<sup>5)</sup>は, I型の膜貫通タンパクであるIL-1R2が細胞質内でpIL-1 $\alpha$ と結合し, pIL-1 $\alpha$ の細胞外分泌を抑制するという新たなメカニズムを発見した。これによると, HeLa細胞と同様に内因性のIL-1R2の発現が見られない血管平滑筋細胞に対して, IL-1R2をtransfectionし, LPSとATPを作用させるとmIL-1 $\alpha$ 分泌が促進された<sup>5)</sup>。これは, LPSとATPによる刺激がinflammasomeを活性化させ, その構成成分であるcaspaseを活性化させることにより, 基質であるIL-1R2を分解することによるものであった。これによってpIL-1 $\alpha$ とIL-1R2との結合が解消され, pIL-1 $\alpha$ が細胞内でcalpainによる分解を受け, 生成されたmIL-1 $\alpha$ を細胞外に分泌するとされた<sup>5)</sup>。

本研究では, HeLa細胞においてもpIL-1 $\alpha$ の細胞外分泌抑制メカニズムが機能するの点について検討した。その結果, HeLa細胞においてもマクロファージなどと同様に, pIL-1 $\alpha$ とIL-1R2との結合に起因したpIL-1 $\alpha$ の細胞外分泌抑制が見られた。さらに, IL-1R2の細胞膜貫通領域を欠失した $\Delta$ TMでは, wild type IL-1R2よりもさらに高い抑制効果を示した。

また, IL-1R2はIL-1 $\alpha$ の第2のレセプターとしてクローニングされ, 細胞膜表面で機能すると考えられている<sup>10)</sup>。IL-1R2は, 細胞膜外でmatrix metalloproteinaseであるa disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (ADAM17)によって切断される<sup>11)</sup>。これまでの研究から, IL-1R2をHeLa細胞に強制発現させると, IL-1R2断端が細胞外領域に遊出されることを確認している。このような切断されたIL-1R2の細胞外領域はリガンド結合部を含んでおり, 血液中や細胞外液中に放出されるとIL-1 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ と結合し, IL-1 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の作用を抑制することで炎症を終息させる<sup>12,14)</sup>。これも, pIL-1 $\alpha$ の効果を減弱させるメカニズムの一つと考えられる。さらに, pIL-1 $\alpha$ のみtransfectionされたHeLa細胞から, 非常に多くのpIL-1 $\alpha$ が放出されていた。従って, 細胞外に分泌されたpIL-1 $\alpha$ が, HeLa細胞の細胞膜表面に発現されたIL-1R2に結合する可能性がある。あるいは, 放出されたpIL-1 $\alpha$ が, 細胞膜表面から酵素的に切断されたIL-1R2の細胞外領域と結合する可能性も考えられる。さらに, こうして形成されたpIL-1 $\alpha$ とIL-1R2複合体は, 本研究で用いたELISAでは検出不可能であったのかもしれない。このことは, IL-1R2が細胞質内でpIL-1 $\alpha$ 細胞外分泌を抑制しているという解釈とは相容れない現象であることから, 本研



究で得られた IL-1R2 による pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌抑制メカニズムの詳細についてはさらに検討する必要がある。

IL-1R2 による IL-1 $\alpha$  の細胞外分泌制御は、炎症反応の調節にも深く関係していると考えられる。IL-1R2 による IL-1 $\alpha$  の細胞外分泌機能調節メカニズムの解明は多くの病態の改善や治療法の開発にも貢献しうる可能性があり、今後更なる研究を行う必要があると考える。

## 結 論

IL-1R2 および pIL-1 $\alpha$  を transfection した HeLa 細胞を用いて、以下の結論を得た。

1. HeLa 細胞において、細胞内 IL-1R2 は pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌を抑制した。
2. Transmembrane 領域を欠失した IL-1R2 は、wild type IL-1R2 よりもさらに高い pIL-1 $\alpha$  の細胞外分泌抑制効果を示した。
3. HeLa 細胞内で IL-1R2 と pIL-1 $\alpha$  は結合し、複合体を形成していた。

以上のことから、HeLa 細胞内に存在する IL-1R2 は、pIL-1 $\alpha$  細胞外分泌抑制効果を維持していることが示唆された。しかし、IL-1R2 による pIL-1 $\alpha$  細胞外分泌抑制の詳細なメカニズム解明には、さらなる研究が必要であると考えられた。

本研究の遂行にあたり、病理学講座 浅野正岳教授および講座員の皆様にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表す。本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Jiang L, Shao Y, Tian Y, Ouyang C, Wang X (2020) Nuclear alarmin cytokines in inflammation. *J Immunol Res* 2020, 7206451.
- 2) Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y, Liu H (2021) IL-1 $\alpha$  processing, signaling and its role in cancer progression. *Cells* 10, 92.
- 3) Supino D, Minute L, Mariancini A, Riva F, Magrini E, Garlanda C (2022) Negative regulation of the IL-1 system by IL-1R2 and IL-1R8: relevance in pathophysiology and disease. *Front Immunol* 13, 804641.
- 4) Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, Iwakura Y (2015) IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. *J Immunol* 194, 3156-3168.
- 5) Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 $\alpha$ , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 38, 285-295.
- 6) Kudo Y, Tamagawa T, Nishio K, Kaneko T, Yonehara Y, Tsunoda M (2022) Nuclear localization of propeptide IL-1 $\alpha$  in HeLa cells. *J Oral Sci* 64, 151-155.
- 7) Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH, Azam T, Kim S, Dinarello CA (2013) The interleukin-1 $\alpha$  precursor is biologically active and is likely a key alarmin in the IL-1 family of cytokines. *Front Immunol* 4, 391.
- 8) Schlüter T, Schelmbauer C, Karram K, Mufazalov IA (2018) Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2. *J Mol Med*, 96, 983-992.
- 9) Boraschi D (2022) What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. *Front Immunol* 13, 872155.
- 10) Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB (1996) Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *J Biol Chem* 271, 20965-20972.
- 11) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K (2015) ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine* 71, 238-245.
- 12) Conti P, Panara MR, Porrini AM, Gambi D, Barbacane RC, Reale M, Bongrazio M, Dempsey RA (1992) Inhibition of interleukin-1 (alpha and beta), interleukin-2 secretion and surface expression of interleukin-2 receptor (IL-2R) by a novel cytokine interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra). *Scand J Immunol* 36, 27-33.
- 13) Peters VA, Joesting JJ, Freund GG (2013) IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. *Brain Behav Immun* 32, 1-8.
- 14) Molgora M, Supino D, Mantovani A, Garlanda C (2018) Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol Rev* 281, 233-247.



# 高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響

清水 なつ生

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

日本大学歯学部歯科矯正学講座

(指導: 本吉 満 教授, 藤原恭子 准教授)

## 要旨

**【目的】** 過度の糖負荷が骨の形成過程における基質の石灰化を抑制し、骨の脆弱性を生むことは知られているが、その詳細な機序については不明な点が多い。本研究では高濃度グルコースを加えて培養した成熟骨芽細胞の石灰化抑制メカニズムを解明することを目的とした。

**【方法】** ラット骨肉腫由来株化細胞の ROS17/2.8 を異なるグルコース濃度を含む培地で7日間培養し、alkaline phosphatase 染色と基質の石灰化を alizarin red 染色によって確認した。同時に染色した石灰化物をギ酸で溶解し、その吸光度を測定することによって石灰化レベルを数値化した。骨芽細胞関連因子の発現は quantitative PCR で検出し、細胞の生存レベルは WST8 アッセイで評価した。ピロリン酸 (PPi)、モノリン酸 (Pi) および ATP の濃度測定は市販のキットを利用した。

**【結果】** 通常の 5.5 mM グルコースを含む培地で培養した対照群と比べ、11 mM あるいは 22 mM の高濃度グルコースを加えた実験群では石灰化の強い抑制が認められた。細胞の生存レベルは高く、またマンニトールを加えて対照群と実験群との浸透圧を同等にしても両群間の石灰化レベルは変化がなかったことから、高濃度グルコースによる石灰化の抑制は、細胞死あるいは浸透圧の上昇には起因しないことが明らかになった。RUNX2, type I collagen, osteocalcin および osteopontin の遺伝子発現は対照群と比べて実験群で高く、5日目に高濃度グルコースを含む培地に交換することで、石灰化を顕著に抑制できた。石灰化を阻害するピロリン酸 (PPi) と石灰化の基質となるモノリン酸 (Pi) の濃度を測定した結果、培養上清中に含まれる細胞外 PPi は実験群で増加し、反対に細胞内・外の Pi は減少した。この時に測定された同じ濃度の PPi を 5.5 mM のグルコースを含む培地に加えたところ、石灰化は強く抑制された。さらに対照群に比べて実験群の細胞内 ATP は軽度に増加し、細胞外 ATP は減少した。

**【結論】** 高濃度のグルコースを加えて培養した ROS17/2.8 の石灰化抑制は、培養液中の PPi 濃度の増加によって生じた可能性が考えられた。

**キーワード:** 高濃度グルコース, 成熟骨芽細胞, 石灰化, ピロリン酸, モノリン酸

## Effect of high glucose concentration on mineralization in mature osteoblasts

Natsuo Shimizu

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Orthodontics

Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Mitsuru Motoyoshi and Assoc. Prof. Kyoko Fujiwara)

## Abstract

**【Purpose】** Excessive glucose is known to inhibit the mineralization during bone formation, leading to the bone fragility in skeletal system. However, the exact mechanism how glucose prevents the mineralization remains unclear. A purpose of this study is to define the inhibitory effect of high glucose concentration on mineralized matrix formation in mature osteoblasts.

**【Methods】** A rat osteosarcoma-derived cell line ROS17/2.8 was cultured for 7 days in medium containing high glucose (11 or 22 mM), and normal glucose (5.5 mM) as a control. Mineralization was estimated by alizarin red staining and absorbance of the solution eluted from AR-stained matrix. Gene expression of osteoblast specific markers was detected by quantitative PCR. Alkaline phosphatase activity and cell viability was measured by NT staining and WST8 assay, respectively. In addition, concentration of pyrophosphate (PPi), monophosphate (Pi) and ATP was detected by commercial assay kits.

**【Results】** High glucose clearly showed the decrease in mineralization, but ALP activity did not change between the cells in high glucose and control. Since high glucose increased cell viability and adding high mannitol in control did not inhibit mineralization, the influence of osmotic pressure was negligible in high glucose culture. High glucose also increased the expression of osteoblast specific markers, RUNX2, type I collagen, osteocalcin and osteopontin.

(受付: 令和5年1月20日)

責任著者: 清水なつ生

日本大学歯学部歯科矯正学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8105

FAX: 03-3219-8365

E-mail: dena19014@g.nihon-u.ac.jp

During 7 days culture, the change in medium containing high glucose at day 5 strongly decreased mineralization compared to those at days 1 and 3. Furthermore, high glucose not only increased extracellular PPi, which prevents the formation of calcium phosphate, but also decreased intra-and extra-cellular concentrations of Pi, which is a substrate for mineralization. When sodium pyrophosphate was added in control at the concentration equal to extracellular PPi in high glucose culture, mineralization was remarkably inhibited. Nevertheless, high glucose decreased extracellular ATP, which is a molecule required for PPi synthesis, although it slightly increased intracellular ATP.

**【Conclusion】** These results suggest that inhibitory effect of high glucose on mineralization in ROS17/2.8 was in part due to increasing extracellular PPi.

**Keywords:** high glucose concentration, mature osteoblasts, mineralization, pyrophosphate, monophosphate

## 緒 言

歯科矯正治療では歯牙移動装置からの外力によって、歯槽骨の改変が誘導され、歯を目的の位置に移動させることができる。この際、圧迫側の歯槽骨には破骨細胞分化の促進によって骨吸収が起こり、反対に牽引側では骨芽細胞の機能が活性化され骨の添加が起こる。このような破骨細胞と骨芽細胞による骨の改変現象は、全身の骨の成長や骨の損傷治癒過程でも生じており、血中グルコース濃度が様々な影響を与えることが知られている<sup>1)</sup>。

これまでに、高血糖が骨の脆弱性を生む報告が数多くなされている。例えば糖尿病が骨粗鬆症のリスクファクターであることは良く知られている<sup>2-5)</sup>。また、高濃度グルコースによって活性酸素が産生され、骨芽細胞の機能阻害や破骨細胞の活性化が起こり<sup>6)</sup>、骨組織中のコラーゲンに非酵素的なグリコシル化が生じることも報告されている<sup>7)</sup>。さらに、グルコースとタンパクの非酵素的な糖化反応によって生じる終末糖化産物の蓄積がインスリン様増殖因子に対する骨芽細胞の反応性を低下させ、その結果、骨形成の抑制が起きる報告もある<sup>8,9)</sup>。しかし、高濃度グルコースが骨形成を抑制する詳しいメカニズムは、いまだに解明されていない。

グルコースは骨芽細胞の主なエネルギー源であり、骨組織では活発なグルコースの取り込みが観察されている<sup>10)</sup>。また、最近の研究から骨芽細胞の分化過程でグルコース代謝が大きく変化することも知られている。例えば、前骨芽細胞の増殖には解糖系が、また骨芽細胞への分化には解糖系とミトコンドリア呼吸の両方が、そして成熟骨芽細胞へ分化すると再び解糖系が主なグルコース代謝経路となっている<sup>11,12)</sup>。一方、初代骨芽細胞を利用した研究から、骨芽細胞の成熟過程において解糖系で機能するヘキソキナーゼやピルビン酸キナーゼ、グルコース輸送体である glucose transporter 1 の発現が上昇することが知られている<sup>13)</sup>。さらに、骨芽細胞のグルコースの取り込みによって AMP-activated protein kinase が活性化され、その結果、骨芽細胞分化関連転写因子の runt-related transcription factor 2 (RUNX2) の発現が誘導され、骨芽細胞分化が促進する<sup>14)</sup>。これらの知見は、グルコース代謝の制御が骨芽細胞の分化

において重要な役割を持つことを意味している。

高濃度グルコースによる骨芽細胞分化や基質の石灰化に与える影響については、マウス前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 を使った培養系で研究されている。しかしながら、報告ごとに結果が異なり、一定の見解が得られていないのも事実である。例えば、11 mM から 33 mM のグルコースが MC3T3-E1 の骨芽細胞への分化と石灰化を促進するという報告がある<sup>15-17)</sup>。一方、15.5 mM のグルコースは、MC3T3-E1 の増殖や分化、石灰化を促進するが、25.5 mM または 35.5 mM のグルコースでは、抑制的に機能する場合もある<sup>18)</sup>。MC3T3-E1 は BMP-2 を含む培地で 3 から 4 週間培養することによって、石灰化能をもつ成熟骨芽細胞に分化するが、最初の 1 週間だけ高濃度グルコースを含む培地にするだけでも石灰化は促進する。しかし、最後の 1 週間のみを高濃度グルコースにしても変化は見られない<sup>19)</sup>。すなわち、高濃度グルコースが、前骨芽細胞から骨芽細胞、さらに成熟骨芽細胞へ分化する過程で異なる影響を及ぼす可能性があり、MC3T3-E1 を利用した研究において、一定の見解が得られていない理由の一つであると考えられる。

本研究では成熟骨芽細胞の性質をもつラット骨肉腫由来株化細胞 ROS17/2.8<sup>20,21)</sup> を使用して、高濃度グルコースが基質の石灰化を抑制するメカニズムについて検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞の培養

ラット骨肉腫由来株化細胞 ROS17/2.8 (理化学研究所バイオリソースセンター、つくば) は alpha modified Eagle's minimum essential medium (αMEM, 富士フィルム和光純薬, 大阪) に 10% 牛胎児血清 (FBS, ニチリョー, 東京), 600 mg/L glutamine, 100 IU/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と 100 mg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を添加した培地で、湿度 100%, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。なお、通常の 10% FBS が含まれた αMEM のグルコース濃度は 5.5 mM に設定されているため<sup>22)</sup>、この培地で培養した細胞を対照群とし、終濃度が 11 mM と 22 mM になるようにグルコースを加えて培養した細胞を実験群とした。

細胞は 5 × 10<sup>4</sup> 個 / ml の密度で 96 ウェルプレートまたは

24ウェルプレートに播種し、1日後に10 mMの $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)と異なるグルコース濃度を含む培地に置換し、7日間の培養を行い、3日目と5日目に培地交換を行った。

## 2. Alkaline phosphatase (ALP) 活性の評価

24ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し、phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで、10分間固定した。各ウェルを超純水で4回洗浄し、0.19 mg/mlの5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphateと0.4 mg/mlのnitro blue tetrazolium chlorideを含む水溶液を加え、10分間室温でインキュベートした後、超純水で1回洗浄し、発色したプレート面をスキャナー (LiDE400, キヤノン, 東京) で撮影した。

## 3. 石灰化の評価

基質の石灰化はalizarin red (AR) 染色と吸光度法によって調べた。24ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し、PBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒドによって10分間室温で固定した。その後、各ウェルを超純水で1回洗浄し、1% AR水溶液で10分間染色した。超純水で再度洗浄した後、プレート面をスキャナー (LiDE400) で撮影した。さらに、石灰化レベルを数値化するために、染色後の各ウェルに5%ギ酸500  $\mu$ lを加えて10分間振盪することで色素を溶出させた。そのうち100  $\mu$ lを96ウェルプレートに移し、波長425 nmの吸光度をプレートリーダー (SpectraMax ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) によって計測した。バックグラウンドは100  $\mu$ lの5%ギ酸を使用し、測定値からバックグラウンドの吸光度を減じた数値を評価した。

## 4. 生存レベルの評価

細胞の生存レベルを評価するためにWST8試薬 (ナカライテスク, 京都) を使用した。96ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し、1/10濃度のWST8試薬を含む100  $\mu$ lの培地を加え、1時間培養し、波長450 nmの吸光度をSpectraMax ABS Plusで計測した。バックグラウンドは1/10濃度のWST8試薬を含む100  $\mu$ lの培地を使用し、測定値からバックグラウンドの吸光度を減じた数値を生存レベルとした。

## 5. マンニトールが石灰化に与える影響

細胞浸透圧の変化が石灰化に影響を及ぼすか調べるため、24ウェルプレートに播種した細胞を通常培地で5日間培養した後に、終濃度が11 mMあるいは22 mMになるようにマンニトールを加えて2日間培養した。その後、石灰化を上述の3にしたがって調べた。

表1 qPCRに使用したプライマー

遺伝子	塩基配列 (5' - 3')
RUNX2 forward	CAAGTGGCCAGGTTCAACGA
RUNX2 reverse	TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
COL1A1 forward	CAGATTGAGAACATCCGCAGC
COL1A1 reverse	CGGAACCTTCGCTTCCATACTC
OPN forward	GATGAACAGTATCCCGATGCC
OPN reverse	CCCTCTGCTTATACTCCTTGGAC
OCN forward	GACAAGTCCCACACAGCAACT
OCN reverse	GGACATGAAGGCTTTGTCAGA
B2M forward	CGAGACCGATGTATATGCTTGC
B2M reverse	GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA

COL1A1 : type I collagen, OCN : osteocalcin, OPN : osteopontin, B2M : beta-2-macroglobulin

## 6. Quantitative RT-PCR (qPCR)

RNAの抽出はRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) で、またRNAからcDNAの合成はiScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を使用した。qPCRはSYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を利用した。骨芽細胞関連因子の検出に使用したプライマーの塩基配列を表1に示す。反応は95 $^{\circ}$ C, 30秒の前処理後、95 $^{\circ}$ C, 5秒と58 $^{\circ}$ C, 30秒の反応サイクルを40回繰り返した。サーマルサイクラーはCFX Maestro (Bio-Rad laboratories) を使用し、測定はすべて3回ずつ行った。なお、cDNAを段階希釈して得られた標準曲線から各遺伝子の相対的な発現レベルを求めた。この際、beta-2-microglobulin (B2M) の値を内因性コントロールとした。

## 7. ピロリン酸 (PPi) 濃度の測定

96ウェルプレートに播種した細胞のPPi濃度の測定は、Pyrophosphate Assay Kit (ab234040, Abcam, Cambridge, UK) を利用した。培養上清をMicrocon-10 (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) に移し、10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心後、上清を回収した。得られた上清は測定バッファーで10分の1に希釈し、細胞外PPiの測定に使用した。同時に細胞を100  $\mu$ lの測定バッファーに懸濁させ、遠心後、上清を回収し、測定バッファーで10分の1に希釈したものを細胞内PPiの測定に使用した。それぞれの上清から得られた50  $\mu$ lの希釈液と50  $\mu$ lの検出試薬を96ウェルプレートのウェル中で混合し、37 $^{\circ}$ Cで30分間のインキュベート後、波長570 nmの吸光度をSpectraMax ABS Plusで計測した。PPi標準液から検量線を作成し、その吸光度から細胞内・外のPPi濃度を求めた。さらに、測定に使用しなかったウェルで培養した細胞のDNA量を計測し、PPi濃度を補正した。



## 8. モノリン酸 (Pi) 濃度の測定

Pi 濃度は、ホスファCテストワコー（富士フィルム和光純薬）によって定量した。96ウェルプレートに播種した細胞の培養上清を回収し、遠心後、上清を蒸留水で10分の1に希釈して、細胞外 Pi 濃度の測定に使用した。同時に細胞を20  $\mu$ l の RIPA バッファー（Thermo Fisher Scientific）で溶解し、細胞内 Pi 濃度の測定に使用した。5  $\mu$ l の上清希釈液または細胞溶解液と400  $\mu$ l の検出試薬を1.5 ml チューブ中で混合し、37°C で20分間インキュベートした。チューブを水冷後、100  $\mu$ l を96ウェルプレートの各ウェルに移し、波長750 nm の吸光度を SpectraMax ABS Plus で計測した。Pi 標準液で検量線を作成し、吸光度から細胞内・外の Pi 濃度を求めた。さらに、測定に使用しなかったウェルで培養した細胞の DNA 量を計測し、Pi 濃度を補正した。

## 9. ピロリン酸ナトリウム (PPNa) が石灰化に与える影響

24ウェルプレートに播種した細胞を5日間培養した後、25, 50, 250  $\mu$ M の PPNa（富士フィルム和光純薬）を含んだ培地と交換し、2日間培養した。その後、上述の3に従って石灰化を評価した。

## 10. ATP 濃度の測定

細胞内 ATP 濃度は Intracellular ATP 測定キット Ver.2 IC2-100（東洋ビーネット、東京）によって定量した。96ウェルプレートに播種した細胞を PBS で1回洗浄し、100  $\mu$ l の ATP 抽出バッファーをウェルに加えて、5分間ゆっくり振盪した。その後、20  $\mu$ l の抽出バッファーを回収し、200  $\mu$ l の ATP 発光試薬と反応後、ルミノメーター（Lu-Mini, Vitl Life Science Solutions, Ashland, VA, USA）で発光量を計測した。さらに、細胞外 ATP 濃度の定量は Extracellular ATP 測定キット EX2-100（東洋ビーネット）を利用した。96ウェルプレートに播種した細胞から回収した100  $\mu$ l の培養上清と100  $\mu$ l の ATP 発光試薬を反応させた後、Lu-Mini で発光量を計測した。最終的に細胞内・外の ATP 濃度は、ATP 標準液の発光量から得られた検量線をもとに算出した。さらに、測定に使用しなかったウェルで培養した細胞の DNA 量を計測し、ATP 濃度を補正した。

## 11. 統計解析

サンプル間の有意差検定は one-way ANOVA と Turkey 検定で行なった。すべての統計解析は、統計解析ソフト JMP バージョン11.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。データは、すべて3回あるいはそれ以上の実験の平均値  $\pm$  standard deviation (SD) で表し、 $p$  値0.05 以下を統計学的有意とした。

## 結 果

### 1. 高濃度グルコースが ALP 活性と石灰化に与える影響

通常の10% FBS が含まれた  $\alpha$ MEM のグルコース濃度は5.5 mM であり、この値は正常なヒトの空腹時血糖にほぼ等しい<sup>23)</sup>。一方、糖尿病患者では血糖値6.9 mM~20 mM 以上にまで上昇することから<sup>24, 25)</sup>、今回は11 mM と22 mM を高濃度グルコースとした。異なる濃度のグルコースを含む培地で ROS17/28 を培養し、7日目に ALP 活性と基質の石灰化を調べた。その結果、いずれのグルコース濃度でも ALP 活性の変化は見られなかったが、5.5 mM グルコースで培養した細胞（対照群）と比較して、高濃度グルコースを加えて培養した細胞では、石灰化の抑制が認められた。AR 染色後の基質を5% ギ酸で溶解し、染色レベルを数値化した結果、この石灰化抑制は、対照群を1とした場合、11 mM グルコース添加群で  $0.53 \pm 0.15$  ( $p < 0.01$ )、また22 mM グルコース添加群では  $0.13 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) となった（図1 A）。

高濃度グルコースによる石灰化の抑制が、細胞浸透圧の上昇によって生じた可能性も否定できない。そこで、対照群に5.5 mM と16.5 mM のマンニトールを加え、浸透圧を11 mM と22 mM グルコース添加群と同等にし、7日間の培

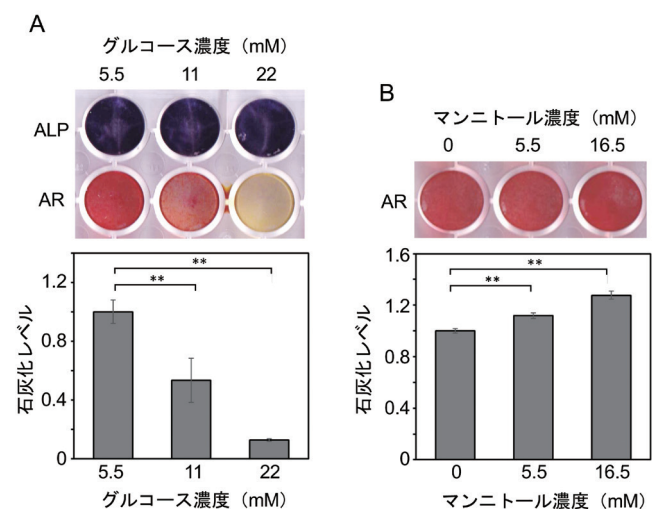


図1 高濃度グルコースが石灰化に与える影響

(A) ROS17/28を7日間培養し、5.5 mM グルコースを加えた群（対照群）と、11 mMあるいは22 mM グルコースを加えた群（実験群）との間の ALP 活性と石灰化の違いについて調べた。ALP 染色と AR 染色を写真（上）で、また AR 染色後の溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ（下）で示す。(B) 対照群の浸透圧を実験群と同じになるよう、対照群に5.5 mM と16.5 mM のマンニトールをそれぞれ加えて培養し、石灰化の違いを調べた。AR 染色の写真（上）と、AR 染色後の基質溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ（下）で示す。なお、(A) と (B) の吸光度から得られた石灰化レベルは対照群とマンニトール非添加のものをそれぞれ1とした場合の割合で表した。計測値は、4回の測定結果の平均値  $\pm$  SD で示す。\*\* $p < 0.01$

養を行った。AR染色の結果、マンニトール添加群の石灰化抑制は認められなかった（図1B）。

## 2. 高濃度グルコースが細胞の生存レベルと骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に与える影響

高濃度グルコースによる石灰化抑制が、細胞の生存レベルの低下によって生じたものかを明らかにするため、WST8アッセイを行った。その結果、生存レベルは対照群と比較して11 mMと22 mMグルコース添加群で増加を示し、対照群を1とした場合、11 mMグルコース添加群で

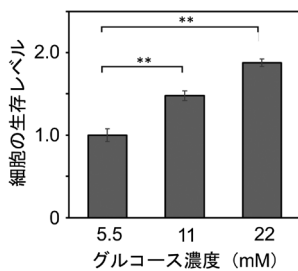


図2 高濃度グルコースが細胞の生存レベルに与える影響  
ROS17/28を7日間培養し、細胞の生存レベルを調べた。11 mMと22 mMグルコースで培養した細胞の生存レベルは、5.5 mMグルコースを加えた細胞の生存レベルを1とした場合の割合で表した。計測値は4回の測定結果の平均値 ± SDで示す。\*\* $p < 0.01$

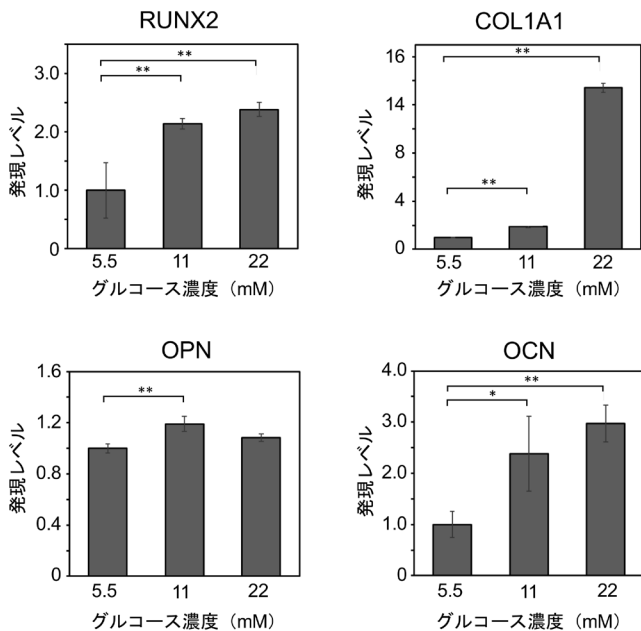


図3 高濃度グルコースが骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に与える影響

ROS17/28を7日間培養し、骨芽細胞関連因子であるRUNX2, COL1A1, OPN, OCNの遺伝子発現について調べた。11 mMと22 mMグルコースを加えて培養した細胞のそれぞれの遺伝子発現レベルは、5.5 mMグルコースで培養した細胞の発現レベルを1とした場合の割合で表した。計測値は3回の測定結果の平均値 ± SDで示す。すべての測定値はB2Mの発現量で補正した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

1.48 ± 0.06 ( $p < 0.01$ ), 22 mMグルコース添加群では1.88 ± 0.04 ( $p < 0.01$ )となった（図2）。

高濃度グルコースが骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。図3に示すように高濃度グルコース添加によってRUNX2, type I collagen (COL1A1), osteocalcin (OCN)の発現は顕著な増加を示した。RUNX2の発現は対照群を1とした場合、11 mMグルコース添加群で2.14 ± 0.09 ( $p < 0.01$ ), 22 mMグルコース添加群では2.38 ± 0.12 ( $p < 0.01$ ), COL1A1は11 mMグルコース添加群で1.91 ± 0.13 ( $p < 0.01$ ), 22 mMグルコース添加群では13.4 ± 0.38 ( $p < 0.01$ )となった。また、OCNの発現は対照群を1とした場合、11 mMのグルコース添加群で2.38 ± 0.73 ( $p < 0.01$ ), 22 mMのグルコース添加群では2.97 ± 0.36 ( $p < 0.01$ )という値を示した。一方、osteopontin (OPN)の発現は対照群を1とした場合、11 mMグルコース添加群で1.20 ± 0.06 ( $p < 0.01$ )を示したが、22 mMグルコース添加群では有意な差は認められなかった（図3）。

## 3. 高濃度グルコースを加えるタイミングが石灰化抑制に与える影響

7日間の培養期間中、どのタイミングで高濃度グルコースを加えると石灰化が抑制されるか検討した。細胞播種後、表2のスケジュールに従って1, 3, 5日目に異なる濃度のグルコースを含む培地に交換し、7日間の培養を行った。グルコース濃度は通常濃度である5.5 mMから高濃度の22 mMへ変化させ、培地交換の日時の違いから表2に示す8つの実験群（#1～#8）に分けた。その結果、図4に示すように5.5 mMのグルコースで7日間培養した対照群の#1と比較して、5日目、3と5日目、1, 3, 5日目、および1と5日目に22 mMグルコースを含む培地に交換した実験群（#2, #3, #4および#8）の石灰化が強く抑制された。数値的には、#1を1とした場合、#2は0.24 ± 0.01 ( $p < 0.01$ ), #3は0.09 ± 0.003 ( $p < 0.01$ ), #4は0.12 ± 0.003 ( $p < 0.01$ ), #8は0.25 ± 0.004 ( $p < 0.01$ )となり、それぞれの群で減少が見られた。また、1と3日目、および3日目に22 mMグルコースを含む培地に交換した実験群（#6と#7）でも石灰化の抑制

表2 培地交換のスケジュール

日*	グルコース濃度 (mM)							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
1	5.5	5.5	5.5	22	22	22	5.5	22
3	5.5	5.5	22	22	5.5	22	22	5.5
5	5.5	22	22	22	5.5	5.5	5.5	22

\*ROS17/28の播種後、1, 3, 5日目に5.5 mMあるいは22 mMのグルコースを含む培地に交換した。#1はすべての期間5.5 mMグルコースを含む培地で培養した細胞（対照群）、また#2～#8は異なるタイミングで5.5 mMグルコースあるいは22 mMグルコースを含む培地に交換して培養した細胞（実験群）を示す。

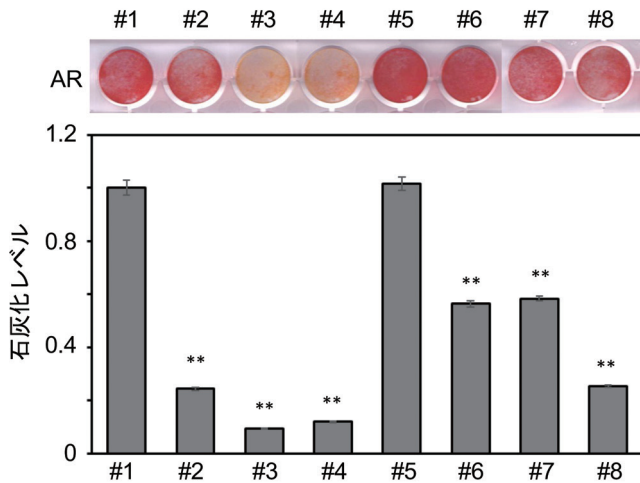


図4 高濃度グルコースを加えるタイミングの違いが石灰化に及ぼす影響

表2のスケジュールに従って通常濃度の5.5 mM グルコースを含む培地から22 mMの高濃度グルコースを含む培地に交換してROS17/2.8の石灰化に及ぼす影響を調べた。AR染色の写真(上)とAR染色後の基質溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ(下)で示す。それぞれの石灰化レベルは#1の吸光度を1とした場合の割合で表した。計測値は、4回の測定結果の平均値 ± SDで示す。

\*\* $p < 0.01$

が認められた。数値的には#1を1とした場合、#6は $0.56 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ), #7は $0.58 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )であった。これらの結果から、5日目に高濃度グルコースを含む培地に交換すれば、1日目と3日目のグルコース濃度の違いに関係なく、石灰化の抑制が起きることが示された。しかし、5日目に通常濃度のグルコースに交換した場合は、1と3日目あるいは3日目の培地に高濃度グルコースが含まれていれば石灰化は抑制されたが、#2, #3, #4, および#8に比べると軽度であった。

#### 4. 高濃度グルコースによるPPiとPiの濃度変化

骨芽細胞が産生するPPiは基質内でリン酸カルシウムの形成を阻害し、石灰化を抑制する<sup>24)</sup>。そこで、高濃度グルコースを含む培地で7日間培養したROS17/2.8が産生するPPiと、PPiの分解によって生じるPiの濃度変化について検討した。

細胞内PPi濃度は、対照群が $22.9 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で $20.9 \pm 0.9$  nmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では $18.4 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNAであった。対照群を1として比較した場合、11 mM グルコース添加群では有意差はなかったが、22 mM グルコース添加群では $0.80 \pm 0.09$  ( $p < 0.05$ )となり、減少が認められた。逆に細胞外PPiは、対照群が $16.2 \pm 0.5$  nmol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で $20.7 \pm 0.4$  nmol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では $26.7 \pm 1.1$  nmol/ $\mu$ gDNAと増加し、対照群を1とした場合、11 mM グル

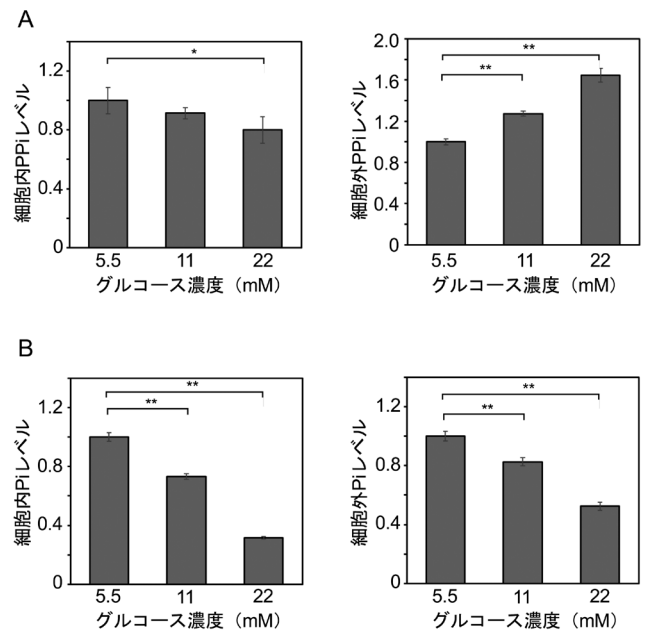


図5 グルコース濃度の違いがPPiとPiレベルに与える影響

ROS17/2.8を7日間培養し、PPiとPiレベルの違いを調べた。(A)細胞内・外のPPiレベルと、(B)細胞内・外のPiレベルの変化を示す。11 mMと22 mM グルコースを加えて培養した細胞のPPiとPiレベルは、5.5 mM グルコースで培養した細胞のPPiとPi濃度をそれぞれ1とした場合の割合で表した。計測値は3回の測定の平均値 ± SDで示す。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

コース添加群で $1.27 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ), 22 mM グルコース添加群では $1.65 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ )という値を示した(図5 A)。

一方、Piの濃度は細胞内・外ともに高濃度グルコース添加群で減少した。対照群の細胞内Piは $0.74 \pm 0.02$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で $0.53 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では $0.23 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNAとなり、対照群を1として比較した場合、11 mM グルコース添加群で $0.73 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ ), 22 mM グルコース添加群では $0.31 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )となった。また、細胞外Pi濃度については対照群が $0.52 \pm 0.02$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 11 mM グルコース添加群で $0.42 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNA, 22 mM グルコース添加群では $0.27 \pm 0.01$   $\mu$ mol/ $\mu$ gDNAとなり、対照群を1として比較した場合、11 mM グルコース添加群で $0.83 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ), 22 mM グルコース添加群では $0.52 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ )という値を示した(図5 B)。

#### 5. PPNaが石灰化に与える影響

DNA量で補正前のPPi濃度は対照群が $72.9 \pm 2.2$   $\mu$ M, 11 mM グルコース添加群で $127.8 \pm 2.6$   $\mu$ M, また22 mM グルコース添加群では $245.7 \pm 9.6$   $\mu$ Mであったことから、通常の5.5 mM グルコースを含む培地で培養した対照群に25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ MのPPNaを添加し、PPNaから



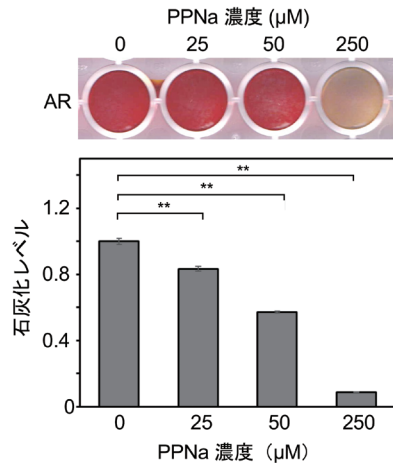


図6 PPNaが石灰化に与える影響

5.5 mM グルコースを含む培地で ROS17/28 を培養し、5 日目に 25, 50, 250 mM の PPNa を加えて、石灰化に与える影響について調べた。培養 7 日目の AR 染色の写真 (上) と AR 染色後の溶解液の吸光度から得られたグラフを示す (下)。グラフは PPNa 非添加の細胞から得られた吸光度を 1 とした場合の割合で表した。計測値は 4 回の測定結果の平均値 ± SD で示す。\*\* $p < 0.01$

解離した PPi が石灰化に及ぼす影響を及ぼすか検討した。細胞播種後 5 日目に PPNa を投与し、7 日目に AR 染色を行った結果、PPNa による石灰化の抑制がみられた。数値的には PPNa 非添加群 (0 μM) の吸光度を 1 として比較した場合、25 μM の PPNa 添加群で  $0.83 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ), 50 μM の PPNa 添加群で  $0.57 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ), 250 μM の PPNa 添加群では  $0.08 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) となった (図 6)。

#### 6. 高濃度グルコースが ATP 産生に与える影響

生体内の PPi は主に ATP の分解によって合成されるため<sup>25, 26)</sup>、高濃度グルコースが細胞内・外の ATP 濃度にどのような影響を及ぼすか調べた。その結果、対照群の細胞内 ATP 濃度は  $73.6 \pm 3.9$  pmol/μgDNA, 11 mM グルコース添加群で  $102.5 \pm 29.9$  pmol/μgDNA, 22 mM グルコース添加群では  $112.3 \pm 13.6$  pmol/μgDNA となり、対照群を 1 として比較した場合、11 mM グルコース添加群では有意差は見られなかったが、22 mM グルコース添加群で  $1.53 \pm 0.18$  ( $p < 0.05$ ) となり、有意な増加がみられた (図 7 A)。一方、細胞外 ATP 濃度については、対照群が  $56.8 \pm 28.2$  pmol/μgDNA, 11 mM グルコース添加群で  $21.2 \pm 14.2$  pmol/μgDNA, 22 mM グルコース添加群では  $13.6 \pm 5.6$  pmol/μgDNA と減少を示し、対照群を 1 として比較した場合、11 mM グルコース添加群で  $0.74 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) 22 mM グルコース添加では  $0.53 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ) という値を示した (図 7 B)。

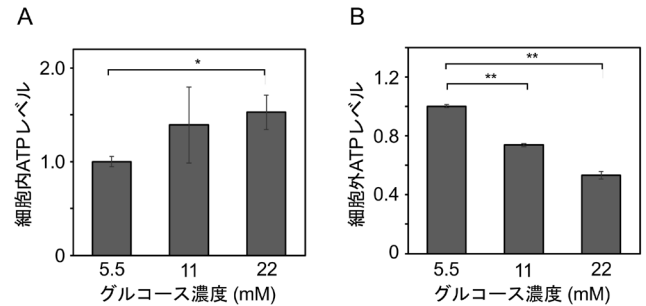


図7 グルコース濃度の違いが ATP レベルに与える影響

ROS17/28 を 7 日間培養し、細胞内 (A) と細胞外 (B) の ATP レベルを調べた。11 mM と 22 mM グルコースを加えて培養した細胞の ATP レベルは、5.5 mM グルコースを加えて培養した細胞から得られた ATP 濃度を 1 とした場合の割合で表した。計測値は 3 回の測定結果の平均値 ± SD で示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## 考 察

成熟骨芽細胞である ROS17/28 の石灰化は、11 mM および 22 mM の高濃度グルコースで培養することによって強く抑制されることが明らかになった。この現象は、高濃度グルコースによって生じる浸透圧の変化や細胞死によるものでなかったことから、過度の糖負荷が骨に脆弱性を与える原因として成熟骨芽細胞の石灰化抑制が深く関わっていると考えられる。一方、高濃度グルコースは ROS17/28 における骨芽細胞関連因子の RUNX2, COL1A1, OCN の遺伝子発現を増加させた。COL1A1 や OCN はリン酸カルシウム沈着の足場となる基質の形成に必要なタンパクであり石灰化を促進する<sup>26)</sup>。しかし、今回、明らかにした高濃度グルコースの石灰化抑制作用は、基質の形成よりも細胞外 PPi 濃度の増加が大きく影響していると思われる。また、高濃度グルコースによって軽度に発現が促進した OPN は、動脈硬化症における血管内皮へのカルシウム塩の沈着を阻害する働きをもつことが知られている<sup>27)</sup>。したがって高濃度グルコースによって OPN や matrix Gla protein<sup>28)</sup> などの石灰化抑制タンパクが増加した可能性も否定できない。さらに、高濃度グルコースによって発現が増加した RUNX2 は、骨芽細胞における基質タンパクの発現に必要な転写因子である<sup>29)</sup>。実際に、COL1A1 や OCN の遺伝子プロモーター領域に RUNX2 の結合配列が存在することが知られており<sup>30, 31)</sup>、高濃度グルコースによって発現が増加した RUNX2 が間接的に COL1A1 や OCN の発現を促進させた可能性も考えられ、高濃度グルコースと骨芽細胞関連因子との関係について今後検討する必要がある。

ROS17/28 の培養系に高濃度グルコースを加えるタイミングの違いが、石灰化抑制にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、石灰化を強く抑制するには培養期間 7 日のうち 5 日目にグルコースが高濃度である必要があること、また 5 日目にグルコース濃度が通常濃度であれば、そ

れ以前に高濃度グルコースを加えても石灰化の抑制は軽度であることが確認できた。グルコースによる骨芽細胞の石灰化のタイミングを調べた研究は MC3T3-E1 を使用した報告以外に見当たらない<sup>19)</sup>。MC3T3-E1 では、培養初期に高濃度グルコースに保たれていれば石灰化は促進するが、培養後期ではグルコースを加えるタイミングを変えても石灰化の促進効果は認められない<sup>19)</sup>。一方、MC3T3-E1 の 12 日間の培養系にリン酸カルシウムと親和性をもつ合成ペプチド (VYKHLNQLSQSY) を加えた場合、6 日以前に添加するよりも、全期間あるいは 7 日目以降に添加することで強い石灰化の抑制効果が認められている<sup>32)</sup>。ROS17/28 と MC3T3-E1 はそもそも細胞特性が大きく異なり、両者を比較することはできないが、一般的に骨芽細胞から最終分化を遂げた成熟骨芽細胞は、細胞増殖が終了してから石灰化基質を産生する<sup>33)</sup>。したがって、高濃度グルコースをはじめとする石灰化抑制因子は石灰化基質を産生する培養後期に作用させた方が、強い効果が維持できると考える。

成熟骨芽細胞による石灰化は、その成熟過程で細胞外に分泌した基質小胞中にカルシウムイオンや細胞外 Pi が取り込まれ、リン酸カルシウム結晶が形成されることで始まる<sup>34)</sup>。結晶形成に必要な Pi は、ALP が細胞内・外の PPi を分解することで供給され、リン酸カルシウムの結晶形成を促進する<sup>35, 36)</sup>。今回、高濃度グルコースによる ALP 活性の低下は明らかにできなかったが、高濃度グルコースによって細胞外 PPi が増加したこと、また 5.5 mM グルコースを加えた培養系へ PPNa を加えると石灰化が顕著に抑制されたことから、細胞外 PPi 濃度の上昇が高濃度のグルコースによる石灰化抑制の直接的な原因の一つであることが強く示唆された。細胞外 PPi は主に細胞内・外の ATP が分解されることによって供給される<sup>35, 36)</sup>。しかし、22 mM グルコースは細胞内 ATP を軽度増加させたが、11 mM グルコースでは対照群と比較して有意な差は認められなかった。11 mM と 22 mM グルコースは細胞内 ATP を減少させたことから考えると、ATP 以外の因子が細胞外 PPi 濃度を増加させた可能性がある。実際に高濃度グルコースの培養系で ROS17/28 が合成する細胞内・外 ATP 濃度の計測値は、20~100 pmol/ $\mu$ gDNA と非常に低く、細胞内・外 PPi の計測値 (10~20 nmol/ $\mu$ gDNA) から考えると ATP が PPi の直接的な供給源となることは極めて少ない。今後は、脂肪酸など PPi の供給源について検討する必要がある。

## 結 論

高濃度グルコースによる ROS17/28 の石灰化抑制メカニズムを検討し、以下の結論を得た。

1. 11 mM と 22 mM の高濃度グルコースは ROS17/28 の石灰化を抑制した。
2. 高濃度グルコースは細胞の生存レベルと骨芽細胞関連

因子の RUNX2, COL1A1, OCN および OPN の遺伝子発現を増加させた。

3. 7 日間の培養期間中、5 日目に高濃度グルコースにすることで、石灰化を抑制した。
4. 高濃度グルコースは細胞外 PPi 濃度の上昇と、細胞内・外 Pi の濃度の低下を誘導した。
5. PPNa は 5.5 mM グルコースで培養した細胞の石灰化を抑制した。
6. 高濃度グルコースは細胞内 ATP の濃度を軽度増加させ、細胞外 ATP を減少させた。

以上のことから、高濃度グルコースを加えて培養した ROS17/28 にみられた石灰化の抑制は、細胞外 PPi 濃度の上昇に起因することが示唆された。

本研究遂行にあたり、格別なるご指導とご鞭撻を賜りました本吉満教授、藤原恭子准教授ならびに日本大学歯学部歯科矯正学講座、解剖学第 I 講座の皆様へ深く感謝致します。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL (2017) Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol* 13, 208-219.
- 2) Christodoulou C, Cooper C (2003) What is osteoporosis? *Postgrad Med J* 79, 133-138.
- 3) Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB (2007) Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 166, 495-505.
- 4) Vestergaard P (2007) Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18, 427-444.
- 5) Hamann C, Kirschner S, Günther KP, Hofbauer LC (2012) Bone, sweet bone—osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 8, 297-305.
- 6) Manolagas SC (2010) From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 31, 266-300.
- 7) Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K (2006) Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 17, 1514-1523.
- 8) Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, Otani S (1998) Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 22, 17-23.
- 9) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM (2001) Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol* 38, 113-122.
- 10) Zoch ML, Abou DS, Clemens TL, Thorek DLJ, Riddle RC (2016) *In vivo* radiometric analysis of glucose uptake and distribution in mouse bone. *Bone Res* 4, 16004.
- 11) Guntur AR, Le PT, Farber CR, Rosen CJ (2014) Bioenergetics during calvarial osteoblast differentiation reflect strain differences in bone mass. *Endocrinology* 155, 1589-1595.



- 12) Shum LC, White NS, Mills BN, De Mesy Bentley KL, Eliseev RA (2016) Energy metabolism in mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Stem Cells Dev* 25, 114-122.
- 13) Yang J, Ueharu H, Mishina Y (2020) Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone* 138, 115467.
- 14) Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, Maurizi A, Kajimura D, Zong H, Takarada T, Lezaki T, Pessin JE, Hinoi E, Karsenty G (2015) Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 161, 1576-1591.
- 15) Liu J, Yang J (2016) Uncarboxylated osteocalcin inhibits high glucose-induced ROS production and stimulates osteoblastic differentiation by preventing the activation of PI3K/Akt in MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med* 37, 173-181.
- 16) Dong K, Hao P, Xu S, Liu S, Zhou W, Yue X, Rausch-Fan X, Liu Z (2017) Alpha-lipoic acid alleviates high-glucose suppressed osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via antioxidant effect and PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 42, 1897-1906.
- 17) Wang R, Gao D, Zhou Y, Chen L, Luo B, Yu Y, Li H, Hu J, Huang Q, He M, Peng W, Luo D (2017) High glucose impaired estrogen receptor alpha signaling via  $\beta$ -catenin in osteoblastic MC3T3-E1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 174, 276-283.
- 18) Liu Z, Jiang H, Dong K, Liu S, Zhou W, Zhang J, Meng L, Rausch-Fan X, Xu X (2015) Different concentrations of glucose regulate proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts via the PI3 kinase/Akt pathway. *Implant Dent* 24, 83-91.
- 19) Takeno A, Kanazawa I, Tanaka K, Notsu M, Kanasaki K, Oono T, Ogawa Y, Sugimoto T (2020) High glucose promotes mineralization via bone morphogenetic protein 4-Smad signals in early stage of osteoblast differentiation. *Diabetol Int* 12, 171-180.
- 20) Manolagas SC, Spiess YH, Burton DW, Deftos LJ (1983) Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced stimulation of alkaline phosphatase in cultured osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 33, 27-36.
- 21) Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Li Z, Simon BJ, Sylvia VL, Dean DD, Bonewald LF, Donahue HJ, Boyan BD (2003) Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 21, 326-334.
- 22) 富士フイルム和光純薬株式会社. MEM  $\alpha$  (L-グルタミン、フェノールレッド含有) 組成表. [https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product\\_data/docs/00063419\\_doc01.pdf](https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product_data/docs/00063419_doc01.pdf) (2023年1月5日アクセス)
- 23) 日本糖尿病学会 (2019) 糖尿病診療ガイドライン2019. 南江堂, 東京, 5-19.
- 24) Havlin CE, Cryer PE (1987) Nocturnal hypoglycemia does not commonly result in major morning hyperglycemia in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 10, 141-147.
- 25) Bonucci E (2012) Bone mineralization. *Front Biosci* 17, 100-128.
- 26) Ando K, Nishimura R, Tsujino D, Seo C, Utsunomiya K (2013) 24-hour glycemic variations in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a continuous glucose monitoring (CGM)-based study. *PLoS One* 8, e71102.
- 27) Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM (2002) Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 196, 1047-1055.
- 28) Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78-81.
- 29) Komori T (2002) Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem* 87, 1-8.
- 30) Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999) Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 274, 6972-6978.
- 31) Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G (2001) Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 276, 7101-7107.
- 32) Ramaswamy J, Nam HK, Ramaraju H, Hatch NE, Kohn DH (2015) Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide. *Biomaterials* 73, 120-130.
- 33) Rutkovskiy A, Stenslökken KO, Vaage IJ (2016) Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res* 22, 95-106.
- 34) Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, StevensMM (2012) The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14170-14175.
- 35) Terkeltaub R, Rosenbach M, Fong F, Goding J (1994) Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1. Relevance to calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. *Arthritis Rheum* 37, 934-941.
- 36) Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG (2016) Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol* 28, 57-68.

# ヒト線維芽細胞 HeLa における interleukin-1 receptor type 2 の decoy receptor としての機能

花山 真知子

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻応用口腔科学分野

日本大学歯学部病理学講座

(指導: 浅野正岳 教授, 角田麻里子 助教)

## 要旨

**【目的】** Interleukin (IL)-1 receptor (R) type 2 (IL-1R2) は、リガンドである IL-1 $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の結合シグナルを伝達できない decoy receptor であるとされている。本研究では、IL-1R2 がヒト子宮頸癌由来線維芽細胞である HeLa において、decoy receptor として機能するかについて検討した。

**【方法】** HeLa または HeLa の IL-1R1 を欠失した CR-R1-4 に、IL-1R1、IL-1R2 または precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) を transfection により強制的に発現させた。こうして作製した transfectant をヒトリコンビナント IL-1 $\alpha$  ないし IL-1 $\beta$  で刺激し、IL-8 分泌増加の有無を ELISA によって確認した。また、HeLa における IL-1R2 の強制発現による pIL-1 $\alpha$  の分泌抑制についても ELISA により確認した。

**【結果】** HeLa に pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 を co-transfection したところ、pIL-1 $\alpha$  の分泌は抑制された。HeLa への IL-1R2 の transfection は、ヒトリコンビナント IL-1 $\alpha$  ないし IL-1 $\beta$  刺激による IL-8 分泌増加を抑制しなかった。CR-R1-4 に IL-1R1 と IL-1R2 を co-transfection しても、ヒトリコンビナント IL-1 $\beta$  刺激による IL-8 分泌増加は抑制されなかった。

**【結論】** 線維芽細胞に強制発現させた IL-1R2 は、細胞内においてのみ decoy receptor としての機能を発揮した。

**キーワード:** IL-1R2, IL-1R1, IL-1 $\alpha$ , alarmin, IL-8

## The decoy receptor function of interleukin-1 receptor type 2 in human fibroblastic cell line HeLa

Machiko Hanayama

Nihon University Graduate School of Dentistry

Major in Pathology

Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Masatake Asano, Assist. Prof. Mariko Tsunoda)

## Abstract

**【Purpose】** Interleukin (IL)-1 receptor (R) type 2 (IL-1R2) is known as a decoy receptor and it can not transduce the IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  binding signal. In the present study, IL-1R2 was introduced to HeLa by transfection and tested whether it can function as a decoy receptor.

**【Methods】** HeLa-based IL-1R1 knockout cell line, CR-R1-4, was established. IL-1R1, IL-1R2 or precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) was forced expressed in HeLa or CR-R1-4 by transfection. Based on the fact that HeLa can augment IL-8 secretion with IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulation, the cells were stimulated with recombinant human (rh) IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . The responsiveness was evaluated by measuring the production of IL-8 by ELISA. The inhibitory effect of IL-1R2 on pIL-1 $\alpha$  secretion was also evaluated with ELISA.

**【Results】** Co-transfection of both pIL-1 $\alpha$  and IL-1R2 to HeLa resulted in the reduction of pIL-1 $\alpha$  secretion. The forced expression of IL-1R2 in HeLa did not lose the responsiveness to rhIL-1 $\beta$ . Co-transfection of both IL-1R1 and IL-1R2 to CR-R1-4 still maintained the reactivity against rhIL-1 $\beta$ .

**【Conclusion】** In fibroblasts, forced expression of IL-1R2 exerts only intracellularly its function as a decoy receptor.

**Keywords:** IL-1R2, IL-1R1, IL-1 $\alpha$ , alarmin, IL-8

(受付: 令和 5 年 1 月 27 日)

責任著者連絡先: 花山真知子

日本大学歯学部病理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8124

FAX: 03-3219-8340

E-mail: hanayama.machiko@nihon-u.ac.jp

## 緒 言

Interleukin (IL)-1 $\alpha$ の cDNA クローニングがなされて以来<sup>1)</sup>, IL-1 family に属する分子の同定が進み, 現在では11種類により構成されている<sup>2)</sup>。類縁分子である IL-1 $\beta$ と IL-1 $\alpha$ との相同性は, アミノ酸レベルで僅かに27%である<sup>3)</sup>。しかし両者は, ①共通のレセプターを介してシグナル伝達を行い, ②細胞内で前駆体として産生されたのち, 酵素的な処理を受けて成熟型分子として細胞外に分泌され, ③ leader peptide を持たないため小胞体-ゴルジ装置を経由せずに分泌されるなどの共通点を有している<sup>4,5)</sup>。IL-1 $\alpha$ は細胞が障害を受けた際に分泌される分子で, これらは alarmin と総称され<sup>6)</sup>, 周囲の細胞・組織に, 自身の置かれた危機的状况を知らしめる分子とされている。

precursor IL-1 $\alpha$  (pIL-1 $\alpha$ ) は質量約31 kDaで, Ca<sup>2+</sup> 依存性タンパク質分解酵素であるカルパインなどにより分子のほぼ中央部分を切断され, N 末端側の propiece IL-1 $\alpha$  (ppIL-1 $\alpha$ ) と C 末端側の mature IL-1 $\alpha$  (mIL-1 $\alpha$ ) に分離する<sup>7,8)</sup>。こうして産生された ppIL-1 $\alpha$  と pIL-1 $\alpha$  は分子内に nuclear localizing sequence を有しており, 核内に認められる<sup>4)</sup>。一方, 細胞外に分泌された mIL-1 $\alpha$  と pIL-1 $\alpha$  は, 特異的なレセプターである IL-1 receptor (R) type I (IL-1R1) に結合し, さらに IL-1R3 と呼ばれるアクセサリー受容体との複合体を形成する<sup>2)</sup>。IL-1R1 と IL-1R3 はシグナル伝達に必要な toll-IL-1 receptor (TIR) ドメインを細胞質内に有しており, これによってシグナルを伝達する。これに対して IL-1R2 は TIR ドメインを欠いており, シグナルを伝達できないことから decoy receptor と呼ばれている<sup>9)</sup>。本論文の著者は, これまでにヒト子宮頸癌由来線維芽細胞 (HeLa) の IL-1R1 を欠失した細胞である CR-R1-4 の樹立に成功しており, この細胞が IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  のシグナルを伝達しないことを報告した<sup>10)</sup>。そこで本研究では, HeLa における IL-1R2 の強制発現, または CR-R1-4 における IL-1R1 と IL-1R2 の強制発現が, IL-1R1 へのリガンド結合後のシグナルを遮断し得るかという点について検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養と試薬

本研究には, ヒト子宮頸癌由来線維芽細胞 HeLa (ヒューマンサイエンス研究資源バンク, 大阪) および HeLa の IL-1R1 を欠失した細胞である CR-R1-4 を用いた<sup>10)</sup>。培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Waltham, MA, USA) に10% ウシ胎児血清 (FCS) および1% ペニシリン - ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加したものをを用いて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で行った。それぞれの細胞を24-well plate (イワキ, 榛原) に5 × 10<sup>4</sup> cells/well となるよう播種し, transfection 実験に用いた。ヒト口腔扁平上皮

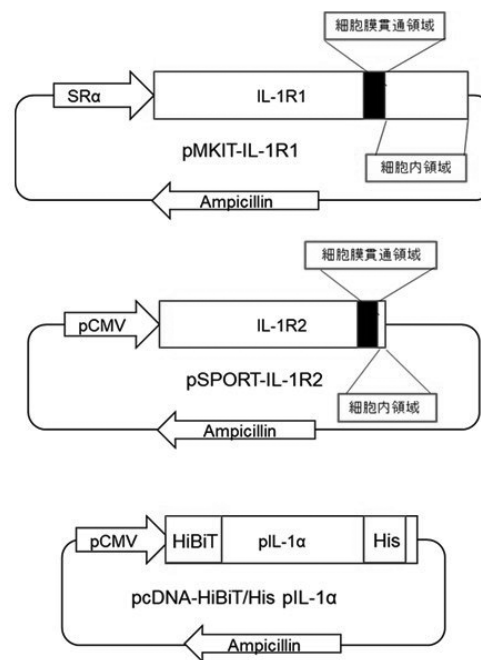


図1 実験に用いた発現プラスミドの構造

癌細胞 HSC3 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) は, 10% FCS-Rosewell Park Memorial Institute (Gibco) 培地により培養した。細胞の刺激に用いたヒトリコンビナント IL-1 $\alpha$  (rhIL-1 $\alpha$ ) およびヒトリコンビナント IL-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) は, Pepro Tech (Cranbury, NJ, USA) から購入した。

### 2. 発現 plasmid の構築と transfection

IL-1R1 または IL-1R2 の full length cDNA を含有するベクターである pDNR-Dual-IL-1R1 と pSPORT-IL-1R2 は, 理化学研究所バイオリソース研究センター (つくば) より購入した。このうち, IL-1R1 については発現ベクター pMKIT-neo vector の EcoRI site に Gibson assembly kit (New England BioLabs, Hitchin, UK) を用いて subcloning した (図1)。N 末端に HiBiT-tag, C 末端に histidine-tag を付与した pIL-1 $\alpha$  (HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$ ) は Sata ら<sup>11)</sup> によって作製されたベクターを鋳型として Quick-change site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により作製した (図1)。

Transfection は, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて行った。Plasmid を OPTI-MEM (25  $\mu$ l) に溶解し, 3000 Reagent (0.75  $\mu$ l) と混和した。一方, Lipofectamine 3000 (0.75  $\mu$ l) を OPTI-MEM (25  $\mu$ l) に溶解した。両溶液を混合し, 室温で15分間反応させて培養液に添加し, 細胞と共に18時間培養した。このようにして作製した細胞を transfectant とした。

### 3. ELISA による IL-1 $\alpha$ および IL-8 の定量

Transfectant への rhIL-1 $\alpha$  または rhIL-1 $\beta$  による刺激は,

表 1 各 Transfectant の培養と ELISA による分泌タンパクの測定の手順

<p>図 3 B CR-R1-4 に 18 時間 transfection (pcDNA または IL-1R2) ↓ rhIL-1<math>\beta</math> (10, 100, 1,000 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養 ↓ 培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定</p>
<p>図 4 HeLa に 18 時間 transfection (HiBiT / His-pIL-1<math>\alpha</math> と pcDNA または IL-1R2) ↓ 培養液交換後さらに 18 時間培養 ↓ 培養液中の pIL-1<math>\alpha</math> を ELISA により測定</p>
<p>図 5 HeLa に 18 時間 transfection (pcDNA または IL-1R2) ↓ rhIL-1<math>\alpha</math> または rhIL-1<math>\beta</math> (それぞれ 100 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養 ↓ 培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定</p>
<p>図 6 CR-R1-4 に 18 時間 transfection (IL-1R1 単独, IL-1R2 単独 または IL-1R1 と IL-1R2 を共に) ↓ rhIL-1<math>\beta</math> (100 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養 ↓ 培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定</p>

表 1 に示す条件で行った。IL-1 $\alpha$  および IL-8 の測定は、培養後、培養上清を回収し、遠心分離後 (16,900  $\times$  g, 1 分間)、上清を新しいチューブに回収し、これをサンプルとして ELISA kit (Quantikine, R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA) を用いて行った。

#### 4. Western blot (WB) 法

HSC3 および CR-R1-4 を phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) によって処理し、遠心後サンプルを回収した。総タンパク質量を測定し、WB を行った。すなわち、両サンプル共に SDS sample buffer に溶解し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ、10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動した。泳動後 Immobilon Transfer Membrane (Merck, Darmstadt, Germany) に転写し、1% BSA-PBS でブロッキングした。1 次抗体としては、マウス抗ヒト IL-1R2 抗体 ( $\times$  1,000; Santa Cruz, Dallas, TX, USA) およびマウス抗ヒト GAPDH 抗体 ( $\times$  10,000, Santa Cruz) を、2 次抗体としては、horseradish peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 ( $\times$  5,000, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) を用いた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Marlborough, MA, USA) によって化学発光させて検出したバンドを、iBright 1500 (Thermo Fisher Scientific) を用いて画像として取り込んだ。

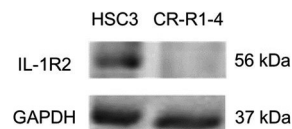


図 2 HSC3 および CR-R1-4 における IL-1R2 の発現  
HSC3 および CR-R1-4 の細胞溶解液中の IL-1R2 (56 kDa) の発現を WB で確認した。内部コントロールとして GAPDH (37 kDa) の検出を行った。

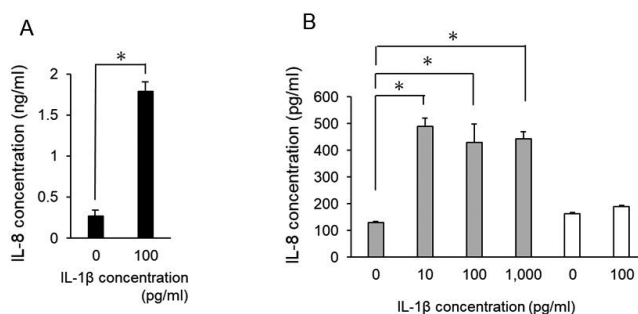


図 3 HeLa と IL-1R1 を強制発現させた CR-R1-4 の rhIL-1 $\beta$  に対する反応性

- A. HeLa を rhIL-1 $\beta$  (100 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養後、培養上清中の IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 7, \*  $p$  < 0.05
- B. CR-R1-4 に IL-1R1 (灰色バー) またはコントロールとして pcDNA (白色バー) を transfection した。その後、培養液を交換し、transfectant を rhIL-1 $\beta$  (10, 100, 1,000 pg/ml) 存在下または非存在下で 6 時間培養した。培養後の培養上清中への IL-8 分泌量を ELISA により測定した。n = 5, \*  $p$  < 0.05

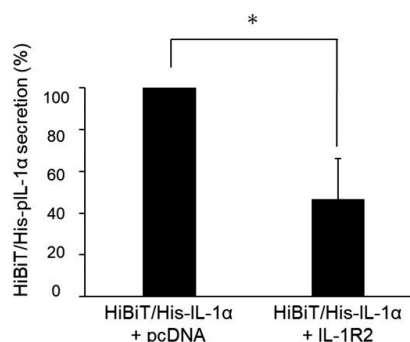


図 4 IL-1R2 による pIL-1 $\alpha$  の分泌抑制

HeLa に pcDNA または IL-1R2 を、HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  と共に co-transfection した。培養液を交換した後、それぞれの transfectant をさらに 18 時間培養した。培養後の上清中の HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  濃度を ELISA により測定した。n = 5, \*  $p$  < 0.05

#### 5. 統計学的解析

統計解析は、正規性を Shapiro-Wilk 検定、等分散性を Levene 検定で確認した。その後、図 4 および図 6 については Student's  $t$ -test を用い、図 3 および図 5 については、一元配置分散分析後の Tukey の多重比較を用いた。結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表した、0.05 未満の  $p$  値は統計的に有意であるとみなした。



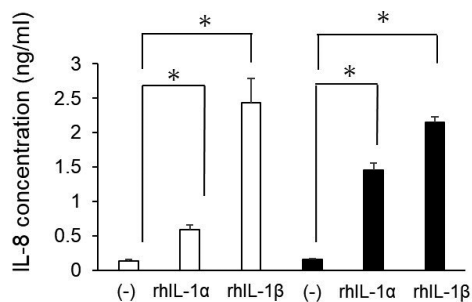


図5 IL-1R2を強制発現させたHeLaのrhIL-1αおよびrhIL-1βに対する反応性

HeLaにコントロールとしてpcDNA（白色バー）またはIL-1R2（黒色バー）をtransfectionした。それぞれのtransfectantは、rhIL-1α（100 pg/ml）、rhIL-1β（100 pg/ml）の存在下または非存在下（-）で6時間培養した。刺激後の培養上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定した。n = 5, \*  $p < 0.05$

## 結 果

### 1. CR-R1-4におけるIL-1R2の発現

CR-R1-4におけるIL-1R2の発現についてWBによって検索した。その結果、図2に示したように、ポジティブコントロールとして用いたHSC3で確認された56 kDaのバンドは、CR-R1-4においては検出できなかった。

### 2. CR-R1-4のrhIL-1βに対する反応性

HeLaは、rhIL-1β刺激に反応してIL-8産生を増強することが明らかとなっている<sup>12)</sup>。図3Aに示した通り、HeLaにおいて100 pg/ml rhIL-1β存在下では $1.8 \pm 73.3$  ng/mlのIL-8分泌が認められ、rhIL-1β非存在下の $0.3 \pm 0.1$  ng/mlと比較して有意な分泌増加が確認された。そこで、CR-R1-4にIL-1R1発現ベクターをtransfectionした後、rhIL-1βに対する反応性の回復について検討した。IL-1R1 transfectantにおけるIL-8分泌量は、rhIL-1β非存在下では $129.2 \pm 5.3$  pg/mlであったが、10 pg/ml、100 pg/mlおよび1,000 pg/mlのrhIL-1β存在下では、それぞれ、 $490.0 \pm 31.5$  pg/ml、 $429.6 \pm 9.7$  pg/mlおよび $442.6 \pm 6.9$  pg/mlと有意に増加し、rhIL-1β刺激に対する反応性が認められた。また、コントロールとしてIL-1R1の配列を含有しないpcDNA vectorをtransfectionしたCR-R1-4では、rhIL-1β刺激に対する反応は認められなかった（図3B）。

### 3. HeLaにおけるIL-1R2の強制発現の効果

IL-1R2の細胞内でのdecoy receptorとしての機能を確認するため、HeLaにHiBiT/His-pIL-1αとIL-1R2を強制発現し、HiBiT/His-pIL-1αの細胞外への分泌に対する影響を確認した。その結果、図4に示す通り、HiBiT/His-pIL-1α単独のtransfectantから分泌されたHiBiT/His-pIL-1αを100%としたときに、HiBiT/His-pIL-1αとIL-1R2のco-transfectantでは $53.3 \pm 19.6\%$ と有意に分泌が低下した。

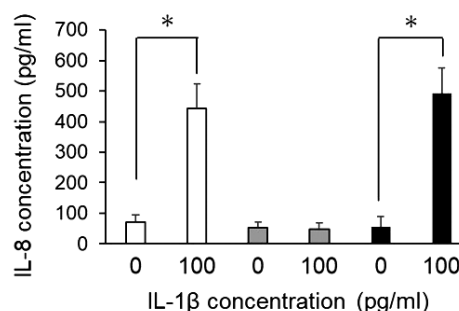


図6 IL-1R1またはIL-1R2を強制発現させたCR-R1-4のrhIL-1βに対する反応性

CR-R1-4にIL-1R1単独（白色バー）、IL-1R2単独（灰色バー）またはIL-1R1とIL-1R2の両者（黒色バー）をtransfectionした。その後、培養液を交換し、100 pg/ml rhIL-1β存在下または非存在下で6時間培養した。培養後の上清中のIL-8分泌量をELISAにより測定した。n = 5, \*  $p < 0.05$

この結果から、IL-1R2はHiBiT/His-pIL-1αの分泌に対して抑制的に作用することが明らかとなった。そこで、IL-1R2を強制発現したHeLaにおけるrhIL-1αまたはrhIL-1βの刺激に対する反応性を確認した。その結果、IL-1R2 transfectantにおけるIL-8の分泌量は、100 pg/ml rhIL-1α存在下では $1.4 \pm 0.1$  ng/ml、100 pg/ml rhIL-1β存在下では $2.1 \pm 0.1$  ng/mlであり、pcDNA transfectantと同様にIL-8の分泌が増強された（図5）。

### 4. IL-1R2によるrhIL-1β反応性の阻害

CR-R1-4ではIL-1R2が発現していなかった（図2）。一方、CR-R1-4へのIL-1R1の強制発現は、rhIL-1βに対する反応性を回復したことから（図3）、CR-R1-4におけるIL-1R1およびIL-1R2の共発現が、IL-1βに対する反応性に対してどのような影響を及ぼすか検討した。その結果、IL-1R1単独のtransfectionではrhIL-1β非存在下に比べて100 pg/ml rhIL-1β存在下で $443.8 \pm 80.8$  pg/mlと有意にIL-8の分泌が増強された。一方、IL-1R2単独のtransfectionでは、rhIL-1β刺激に対して全く反応を示さなかった。さらに、両分子の共発現では100 pg/ml rhIL-1β存在下で $492.3 \pm 82.8$  pg/mlと、非存在下に比べて有意にIL-8分泌が増強され、これはIL-1R1単独のtransfectionと同程度の増強であった（図6）。

## 考 察

IL-1αは、生体内でubiquitousに発現しているとされるが、細胞死などに際して初めて細胞外に分泌される<sup>5)</sup>。このメカニズムについては以下の様に考えられている。すなわち、IL-1R2がpIL-1αと細胞内で複合体を形成しており、グラム陰性菌の菌体外成分であるリポポリサッカライドなどの刺激により細胞内のcaspaseが活性化されると、IL-1R2が分解される。その結果、この複合体が解消され、pIL-1αが細胞外に分泌されるというものである<sup>13)</sup>。そこで

本研究では、IL-1R2を有しない HeLa に HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 を co-transfection したところ、HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  の分泌が抑制された。このことは、HeLa においても IL-1R2 がこれまで報告されてきた細胞内における機能を発揮していることを示すものであり<sup>13)</sup>、HeLa 内で HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  と IL-1R2 が結合した結果と考えられた。しかし、この結合によって HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  の分泌が抑制されるメカニズムは明らかになっていない。IL-1R2 は IL-1R1 に次ぐ第 2 のレセプターとして発見された分子であり<sup>14)</sup>、細胞外領域でリガンドと結合すると考えられている。しかし、細胞内での複合体形成によって HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  が細胞外に分泌されなくなるのであれば、細胞内領域または細胞膜貫通領域が HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  の分泌に対して抑制的な機能を有する可能性が考えられ、この点についてはさらなる検討が必要である。

一方、IL-1R2 の細胞外領域の細胞膜近傍は、matrix metalloproteinase である a disintegrin and metalloprotease domain 17 により切断され<sup>15)</sup>、細胞外領域のみが細胞外に移行することにより、炎症に際して分泌された mIL-1 $\alpha$  に結合し、その活性を低減させるとされている。本研究においても、HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$ -I と IL-1R2 の複合体が細胞外で形成され、ELISA による検出に影響した可能性が考えられることから、Hela の細胞外における両者の複合体の形成についてはさらに追究すべきものと考えている。

IL-1R2 は TIR-ドメインを欠く decoy receptor とされており、細胞質内領域はわずかに 29 アミノ酸により構成されている<sup>14)</sup>。TIR-ドメインとは、マクロファージや樹状細胞などの細胞表面に発現し、病原体関連分子パターンを認識する toll-like receptor (TLR) と IL-1R1 の細胞質内に共通して見られる配列である<sup>16)</sup>。TIR-ドメインを有するレセプター同士が会合することによって、myeloid differentiation factor 88 や Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  などのアダプターを誘導し、これによって転写因子である nuclear factor  $\kappa$ B、interferon regulatory factor などを活性化させシグナルを伝達する<sup>16)</sup>。

IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の IL-1R1 への結合は、IL-1R3 を IL-1R1 近傍に誘導し、両者の TIR ドメインが上記のメカニズムでシグナルを伝達する。HeLa に IL-1 $\beta$  を作用させると IL-8 産生が増強されることが明らかとなっており<sup>12)</sup>、このことは HeLa に IL-1R3 が存在することを意味している。そこで、HeLa に IL-1R2 を強制発現させることにより、rhIL-1 $\alpha$  または rhIL-1 $\beta$  刺激に対する反応性が低減するのではないかと考えた。しかし、IL-1R2 を発現させた transfectant においては、rhIL-1 $\alpha$  および rhIL-1 $\beta$  依存性の IL-8 分泌増強には何ら抑制的な効果を認めなかった。さらに、CR-R1-4 における IL-1R1 の強制発現が、rhIL-1 $\alpha$  および rhIL-1 $\beta$  に対する反応性を回復させた<sup>10)</sup> ことから、この細胞における IL-1R1 および IL-1R2 の co-transfectant を作製し、rhIL-1 $\beta$

で刺激した。結果は、HeLa と同様で、IL-1R2 による IL-8 の分泌抑制効果は全く見られなかった。Shimizu ら<sup>17)</sup> は、コラーゲン誘導性関節炎を発症させた IL-1R2 knockout mouse においては、IL-1 に対する反応性の増強がマクロファージにのみに認められたことから、IL-1R2 の decoy receptor としての機能は、細胞種特異的であると結論している。線維芽細胞において IL-1R2 がシグナル伝達を抑制するという報告<sup>18)</sup> もあるが、ヒトの細胞においてはこの現象は確認されていない。本研究では、HeLa における IL-1R2 の強制発現は、rhIL-1 $\alpha$  および rhIL-1 $\beta$  に対する反応性を抑制することは無かったが、HiBiT/His-pIL-1 $\alpha$  の分泌は抑制した。このことは、HeLa において IL-1R2 は、細胞質内での機能は維持しているものの、細胞膜上での機能は失われていることを示すものであった。HeLa における IL-1R2 の部分的な機能喪失がいかなる機序によるのかという点については極めて重要であり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

## 結 論

本研究では、IL-1R2 の decoy receptor としての機能が、HeLa と HeLa の IL-1R1 を欠失させた CR-R1-4 においても維持されているかという点について検討した。その結果、以下の結論を得た。

1. CR-R1-4 においては、IL-1R2 発現は確認できなかった。
2. CR-R1-4 においては、rhIL-1 $\beta$  に対する反応性は消失していた。
3. HeLa における IL-1R2 強制発現は、pIL-1 $\alpha$  の分泌を阻害した。
4. HeLa における IL-1R2 の強制発現は、rhIL-1 $\alpha$  と rhIL-1 $\beta$  に対する反応性を阻害しなかった。
5. CR-R1-4 における IL-1R1 の強制発現は、rhIL-1 $\beta$  に対する反応性を回復した。
6. CR-R1-4 における IL-1R1 と IL-1R2 の強制発現は、rhIL-1 $\beta$  に対する反応性を阻害しなかった。

以上の結果から、HeLa および CR-R1-4 に強制発現させた IL-1R2 は、細胞内においてのみ decoy receptor として機能することが明らかとなった。

本研究の推進にあたり、病理学講座 浅野正岳教授、角田麻里子助教および講座員の皆様にご指導頂いた。ここに深甚なる感謝の意を表す。本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolf SM, Dinarello CA (1984) Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 81, 7907-7911.
- 2) Boraschi D (2022) What is IL-1 for? The functions of interleukin-1 across evolution. Front Immunol 13, 872155.

- 3) March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, Conlon PJ, Hopp TP, Cosman D (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.
- 4) Monteleone M, Stow JL, Schroder K (2015) Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74, 213-218.
- 5) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1a and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 6) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 7) Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB (1991) Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *J Biol Chem* 266, 12162-12167.
- 8) Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ (2011) Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1a. *Mol Cell* 44, 265-278.
- 9) Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018) The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281, 197-232.
- 10) Hanayama M, Ishiyama Y, Sadamura M, Moriyama A, Imaoka S, Tsunoda M, Asano M (2022) Establishment of interleukin-1 receptor type I knockout HeLa strain by CRISP/Cas9 system. *J Biomed Sci Res* 4, 1-5.
- 11) Sata E, Takada L, Kaetsu R, Fukasawa M, Ohtsu M, Motoyoshi M, Asano M (2020) A new enzyme-linked immunosorbent assay system against the N-terminal propiece of interleukin-1a. *J Oral Sci* 62, 340-343.
- 12) Yang HT, Cohen P, Rousseau S (2008) IL-1 $\beta$ -stimulated activation of ERK1/2 and p38 $\alpha$  MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- $\alpha$  in HeLa cells. *Cell Signal* 20, 375-380.
- 13) Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC (2013) Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1a, controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 38, 285-295.
- 14) McMahan CJ, Slack CJ, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, Copeland NG, Huebner K, Croce CM, Cannizzaro LA, Benjamin D, Dower SK, Spriggs MK, Sims JE (1991) A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 10, 2821-2832.
- 15) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K (2015) ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine* 71, 238-245.
- 16) O'Neill LAJ, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7, 353-364.
- 17) Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, Horai R, Kakuta S, Watanabe T, Iwakura Y (2015) IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. *J Immunol* 194, 3156-3168.
- 18) Re F, Sironi M, Muzio M, Matteucci C, Introna M, Orlando S, Penton-Rol G, Dower SK, Sims JE, Colotta F, Mantovani A (1996) Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. *J Exp Med* 183, 1841-1850.

# MeCP2変異ヒト歯髄細胞および MeCP2欠損マウス 迷走神経背側運動核ニューロンについての免疫組織化学的研究

星 まなみ

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野

日本大学歯学部小児歯科学講座

(指導: 白川哲夫 教授, 菊入 崇 准教授)

## 要旨

**【目的】**メチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の変異は、重度の発達異常を呈するレット症候群 (RTT) を引き起こす。本研究では *MECP2* の 1 塩基変異により発症した RTT 女児の永久歯から幹細胞を分離し特性の解析を試みた。また、MeCP2欠損が延髄の機能にどのような影響を及ぼしているかを検討するために、*Mecp2*欠損 (*Mecp2*<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、迷走神経背側運動核 (DMV) におけるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 免疫陽性 (IR) ニューロンの数と分布を調べた。

**【方法】**10代の RTT 女児および健常女児の抜去歯から歯髄組織を採取し実験に供した。歯髄細胞での未分化マーカーの発現について RT-PCR にて確認するとともに、MeCP2および幹細胞マーカーの発現と細胞内の局在を免疫蛍光染色で調べた。続いて、*Mecp2*<sup>-/-</sup> および野生型 (Wt) マウスの DMV での TH-IR および ChAT-IR ニューロンの分布を DAB 染色あるいは免疫蛍光二重染色で検討した。

**【結果】**健常女児由来細胞 (CONT) では MeCP2が核内に局在していたのに対し、RTT 女児由来細胞 (RETT) では核とともに細胞質にも局在を認めた。Ki-67発現はともに核内に限局していたが、陽性率は CONT に比べ RETT で低かった。STRO-1, SSEA3の発現は両細胞で差異はなかった。DMV における TH-IR ニューロン数は Wt マウスに比べ *Mecp2*<sup>-/-</sup> マウスで有意に多かったが、ChAT-IR ニューロン数には違いがなかった。また *Mecp2*<sup>-/-</sup> マウスについて TH および ChAT が共発現するニューロンが多く観察された。

**【結論】**RETT では変異 *MECP2* の転写が活性化している細胞が一定の割合で含まれていると考えられ、Ki-67の陽性率が CONT より有意に低かったことから *MECP2* の変異が RETT の増殖能を低下させている可能性が考えられた。また DMV における TH-IR ニューロン数、ならびに TH と ChAT の共発現に *Mecp2*<sup>-/-</sup> と Wt マウスで違いがみられたことから、MeCP2の欠損が DMV ニューロンの活動を変化させ、消化管運動を調節している副交感神経の働きに影響を及ぼしていることが示唆された。

**キーワード:**メチル化 CpG 結合タンパク質 2, レット症候群, 歯髄幹細胞, 迷走神経背側運動核

## Immunohistochemical studies of MeCP2-mutated human dental pulp cells and the dorsal motor nucleus of the vagus neurons in *Mecp2*-deficient mice

Manami Hoshi

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Health Sciences

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry

(Directors : Prof. Tetsuo Shirakawa, Assoc. Prof. Takashi Kikuri)

## Abstract

**【Purpose】**Mutations in *MECP2*, the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), cause Rett syndrome (RTT) that presents severe developmental abnormalities. This study attempted to isolate and characterize dental pulp stem cells from a RTT girl affected with a single-nucleotide mutation in *MECP2*. In addition, to investigate how MeCP2 deficiency affects visceral motor functions, the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive (IR) neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) was examined in *Mecp2*-deficient (*Mecp2*<sup>-/-</sup>) mice.

**【Methods】**Pulp cells were obtained from extracted permanent teeth of a RTT girl and a healthy girl. The expression of undifferentiated cell markers was examined by RT-PCR, and the expression and localization of MeCP2 and stem cell markers were investigated by immunofluorescence staining. Subsequently, the number and

(受付: 令和5年1月30日)

責任著者連絡先: 星 まなみ

日本大学歯学部小児歯科学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8106

FAX: 03-3219-8353

E-mail: dema19026@gnihon-u.ac.jp



distribution of TH-IR and ChAT-IR neurons were examined in DMV of *Mecp2*<sup>-y</sup> and wild-type (Wt) mice by DAB staining and immunofluorescence double staining.

**[Results]** In the pulp cells derived from the healthy girl (CONT), MeCP2 was localized in the nucleus. However, MeCP2 was localized in both nucleus and cytoplasm of the pulp cells derived from the RTT girl (RETT). Ki-67 was expressed in the nucleus in both CONT and RETT, but the positive rate of Ki-67 was significantly lower in RETT. No difference was seen in the expression of STRO-1 and SSEA3 between CONT and RETT. The number of TH-IR neurons in DMV was significantly larger in *Mecp2*<sup>-y</sup> mice than that in Wt mice, while no difference was seen in the number of ChAT-IR neurons between *Mecp2*<sup>-y</sup> and Wt mice. In addition, neurons co-expressing TH and ChAT were observed abundantly in *Mecp2*<sup>-y</sup> mice but not in Wt mice.

**[Conclusion]** In RETT, mutated *MECP2* was transcriptionally activated at a certain rate, which might have lowered the positive rate of Ki-67 and reduced proliferation ability of the cells. The increase in the number of TH-IR neurons and co-expression of TH and ChAT in DMV of *Mecp2*<sup>-y</sup> suggest that MeCP2 deficiency may alter neuronal activities in DMV and affect the parasympathetic control of visceral functions.

**Keywords:** methyl-CpG-binding protein 2, Rett syndrome, dental pulp stem cells, dorsal motor nucleus of the vagus

## 緒 言

X染色体上にあってメチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の変異は、重度の発達異常を呈するレット症候群 (RTT) を引き起こすことが知られている<sup>1,2)</sup>。RTT は約 1 万人に 1 人の割合で主に女兒に発症し、1 歳 6 か月以降で精神発達遅滞<sup>3)</sup>のほか様々な全身的症状が発現する。RTT の主要な診断基準として、合目的な手の機能の喪失、音声言語コミュニケーションの喪失、失調性歩行、手の常同運動が挙げられており<sup>4)</sup>、そのほか消化管運動異常や便秘<sup>5)</sup>、歯科領域では咀嚼機能の低下および歯列不正が高率で認められる<sup>4)</sup>。また著明なブラキシズムを示す場合もある<sup>4)</sup>。さらに MeCP2 の異常は RTT 以外の中枢神経系の疾患においても認められることがあり、MeCP2 の異常が複数の疾患の発症に重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>3)</sup>。

RTT 患者から試料を採取して実施する研究では、人を対象とする医学系研究に必要な倫理的要件を満たすことが必須であり、また試料採取に伴う被験者への侵襲を最小限に留める必要がある。歯科領域において日常的な医療行為として抜歯処置が行われているが、医療上の必要性に基づき抜去された歯を試料とする研究は、今日では国内外で広く行われている。特に歯髓組織については、幹細胞を含む多種の細胞が存在することから研究材料として有用性が高い<sup>6,7)</sup>。抜去歯から得られた歯髓の細胞を活用する研究は、RTT の病態を細胞レベルで解明するうえでも大きな意義があるが、現在のところ、RTT 患者の永久歯の歯髓を用いた研究は見当たらない。そこで本研究では、実験 I として、*MECP2* の 1 塩基変異により発症した RTT 女兒の永久歯から幹細胞を分離し、特性の解析を試みた。

RTT の主要な原因遺伝子が *MECP2* であることが報告された後、MeCP2 をコードする遺伝子 *Mecp2* を欠失させたモデルマウスが作られ、ヒトと同様にモデルマウスにおいても神経発達障害が引き起こされることが報告されている<sup>8,9)</sup>。特に MeCP2 を完全に欠損している雄モデルマウ

スは、生後早期に RTT 患者に類似した神経症状を呈し、野生型マウスに比べて著しく寿命が短く、生後 8 ~ 12 週で死亡する<sup>8,9)</sup>。MeCP2 は脳由来神経栄養因子 (BDNF) や  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) など様々な遺伝子の転写を調節しており、*Mecp2* の欠損によりそれらの発現が変化することから<sup>10,11)</sup>、*Mecp2* が欠損した雄モデルマウス (*Mecp2*<sup>-y</sup>) は RTT にみられる病態の原因を探索するうえで有用である。

*Mecp2*<sup>-y</sup> の脳幹では、孤束核ならびに青斑核でのノルアドレナリン神経伝達の異常が報告されている<sup>12,13)</sup>。しかし、MeCP2 の欠損が副交感神経を經由して内臓の運動を制御している迷走神経背側運動核 (DMV) でのアセチルコリン神経系<sup>14)</sup>にどのように影響を与えているのかは明らかにされていない。そこで本研究では、RTT 女兒歯髓由来細胞の解析に加え、実験 II として、8 週齢の *Mecp2*<sup>-y</sup> マウスについて、DMV でのチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫陽性 (IR) ニューロンおよびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 免疫陽性 (IR) ニューロンの数と分布を調べ、野生型マウスと *Mecp2*<sup>-y</sup> マウスで比較した。また DMV ニューロンでの TH と ChAT の共存の有無についても調べた。

## 材料および方法

### 1. 実験 I

#### 1) 対象者

ヒト歯髓由来細胞を用いる実験は、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した (倫許 EP18D011)。歯髓組織の供与について同意の得られた 10 代の RTT 女兒 1 名、および同年代の健常女兒 1 名より抜去された永久歯計 2 歯を実験に用いた。

#### 2) 歯髓採取

対象歯を通常に従って抜去した後、根尖部を滅菌バーで 1 ~ 2 mm 削合し、根管治療用ファイルを歯髓腔に挿入して歯髓組織を採取した。滅菌シャーレ上で歯髓組織をメス

にて3mm程に細切り、組織片を培養皿に静置し培養を行った。

### 3) 細胞培養

RTT 女児由来歯髄組織について、20% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% penicillin streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を含む $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, 富士フィルム和光純薬, 大阪) を用いて培養を行い、37°C, 5% CO<sub>2</sub>にてインキュベーター内で静置培養し、歯髄組織片から細胞をアウトグロースさせた。アウトグロースした細胞を Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium (タカラバイオ, 滋賀) にて培養し、実験に供した。健常女児由来歯髄組織については、RTT 女児由来歯髄組織と同様の手順で、Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium または 20% fetal bovine serum を含む $\alpha$ -MEM (富士フィルム和光純薬) を用いて培養を行った。

### 4) 歯髄細胞での未分化マーカーの発現

健常女児歯髄由来細胞 (CONT) および RTT 女児歯髄由来細胞 (RETT) から RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて全 RNA を精製し、Recombinant RNase Inhibitor (タカラバイオ), 5×PrimeScript Buffer (タカラバイオ), PrimeScript Reverse Transcriptase (タカラバイオ), dNTP Mixture (タカラバイオ), ならびに Random Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と反応させることにより cDNA 合成を行った。ThermalCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、表 1 に示す未分化マーカーに対するプライマーを使用して RT-PCR を行った。増幅した PCR 産物について 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、バンドを確認した。 $\beta$ -actin を RT-PCR 解析の内在性コントロールとして使用した。

### 5) 歯髄細胞での MeCP2 ならびに幹細胞マーカーの発現

歯髄細胞での MeCP2 の発現と細胞内局在、および幹細胞マーカーの発現を調べる目的で免疫組織化学染色を行った。CONT および RETT を 8 well Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 上で  $1.0 \times 10^4$  個/well で播種して 24 時間培養後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、1% TritonX-100 にて透過処理を室温で 10 分間行い、1% BSA - PBS で室温にて 30 分間ブロッキングを行った。続いて、表 2 に示す一次抗体を含む溶液中で 4°C にて一晩反応させた。その後 PBS で洗浄し、蛍光標識ヤギ二次抗体 (抗マウス Alexa Fluor 488, 抗ウサギ Alexa Fluor 594) を含む溶液中で、室温、遮光下で 1 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、DAPI を含む封入材 (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI;

表 1 RT-PCR で用いたプライマーおよび増幅産物のサイズ

Primers	Sequences	Product size (bp)
c-Myc	F 5'-TCC TGG GAA GGG AGA TCC G-3' R 5'-ACG TTG AGG GGC ATC GTC-3'	328
Sox2	F 5'-GGA AAT GGG AGG GGT GCA AA-3' R 5'-TTG CGT GAG TGT GGA TGG G-3'	150
Nanog	F 5'-TTG GAA GCT GCT GGG GAA G-3' R 5'-GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA-3'	193
Oct4	F 5'-GGA GGG GAG GAG CTA GGG-3' R 5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CC-3'	137
Klf4	F 5'-ATC GTG GCC CCG GAA AAG-3' R 5'-TGT AGT GCT TTC TGG CTG GG-3'	390
$\beta$ -actin	F 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3' R 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA A-3'	186

表 2 免疫組織化学染色に用いた抗体

抗体	免疫種	メーカー名	*希釈率
MeCP2	Rabbit	Novus Biological	1:200
Ki-67	Rabbit	Abcam	1:200
SSEA3	Mouse	IBL	1:100
STRO-1	Mouse	Novus Biological	1:100
TH	Rabbit	Protos Biotech	1:100 1:1000 (DAB 染色)
ChAT	Rabbit	Millipore	1:1000 (DAB 染色)
ChAT	Goat	Millipore	1:100
VMAT2	Rabbit	Phoenix pharmaceuticals	1:100 1:1000 (DAB 染色)
Alexa Fluor 594	Rabbit	Abcam	1:500
Alexa Fluor 488	Mouse	Abcam	1:500
Alexa Fluor 546	Goat	Invitrogen	1:1000
Alexa Fluor 488	Rabbit	Invitrogen	1:1000

\* DAB 染色以外は免疫蛍光染色での希釈率を記載

ImmunoBioScience, Mukilteo, WA, USA) にて封入した。作製した標本について、20×対物レンズと CCD カメラを備えた蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, ニコン, 東京) を使用して画像化した。

### 6) 免疫陽性歯髄細胞数の計測

MeCP2 と Ki-67 の陽性細胞に関しては、蛍光光源の励起強度を常に一定にして組織像をカラー画像として保存した後、陽性細胞数を計測した。画像は、CONT と RETT について、MeCP2 と Ki-67 の陽性細胞を各々 6 ウェルずつ撮影した。

## 2. 実験 II

### 1) 実験動物および飼育条件

ヘテロ接合型の *Mecp2* 欠損雌マウス (B6.129P2 (C) - *Mecp2*<sup>tm1.1Bird</sup>/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)<sup>8, 11)</sup> ならびに C57BL/6J 野生型雄マウス (三協ラボサービス, 東京) を購入後、本学動物実験施設にて飼育および交配を行い、生後 7 日目に *Mecp2* について遺伝子型の判定を行った。*Mecp2* 欠損がない野生型雄同腹仔

(Wt) を対照として使用した。マウスは、温度 ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )、湿度 ( $55 \pm 5\%$ ) で制御された飼育室にて、12 h : 12 h の明暗サイクル (07:00 に点灯) 下で、餌と水を自由に摂取させて飼育した。動物実験は全て日本大学遺伝子組換え実験安全委員会 (2020 歯 004-2) で承認され、日本大学動物実験委員会の指針にしたがって実施した (AP22DEN008-1, AP22DEN019-1)。

## 2) 脳切片の免疫組織化学染色

マウスを 5% イソフルラン吸入で深麻酔し、氷冷生理食塩水で経心的に灌流した後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。直ちに脳を摘出し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩固定後、30% スクロースに置換したのち  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。続いてクライオスタット (CM1850; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて連続冠状切片 (厚さ  $25 \mu\text{m}$ ) を作製し、浮遊法にて免疫組織化学染色を行った。切片を、表 2 に示すウサギ抗 TH ポリクローナル抗体、またはウサギ抗 ChAT ポリクローナル抗体を用いて  $4^\circ\text{C}$  で 24 時間反応させたのち、ヒストファインシンプルステイン MAX PO (R) (ニチレイ、東京) と室温で 60 分間反応させた。染色には Vectastain DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用し、硫酸ニッケル強化ジアミノベンチジン (DAB) にて切片を処理し発色させた。Mecp2-/y マウスおよび Wt マウスは各 4 頭使用した。

## 3) TH-IR および ChAT-IR ニューロン数の計測

DMV での TH-IR ニューロン数ならびに ChAT-IR ニューロン数の計測には、 $20\times$  対物レンズと CCD カメラを備えた光学顕微鏡 (ニコン) を使用し、照明強度を常に一定にして組織像をカラー画像として保存したのち、左右側の各ニューロン数を計測した。DMV の境界は、連続切片から別途作製したニッスル染色標本を用いて決定した。TH-IR および ChAT-IR ニューロン数は、吻尾側方向に  $100 \mu\text{m}$  間隔で計測した。Mecp2-/y マウスの脳の大きさが Wt マウスよりやや小さいことから<sup>15)</sup>、Mecp2-/y マウスと Wt マウスの脳部位の前後的位置の判定はニッスル染色標本と照合しながら行った。

## 4) ChAT と TH または小胞モノアミントランスポーター 2 の免疫蛍光二重染色

クライオスタットにて連続冠状切片 (厚さ  $25 \mu\text{m}$ ) を作製し、ChAT と TH または ChAT と小胞モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) の免疫蛍光二重染色を行った。浮遊切片を、表 2 に示すウサギ抗 TH 抗体およびヤギ抗 ChAT 抗体、またはウサギ抗 VMAT2 抗体およびヤギ抗 ChAT 抗体を含む溶液とともに  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。次に、切片を二次抗体とともに室温で 60 分間反応させ、スライドガラスに貼り付けた。二次抗体として Alexa Fluor

546 ロバ抗ヤギ IgG および Alexa Fluor 488 ロバ抗ウサギ IgG を使用した。封入には Fluoroshield (ImmunoBioScience) を用いた。染色した組織標本は  $60\times$  油浸対物レンズを備えたレーザー走査型共焦点顕微鏡 C1 (LSCM; ニコン、東京) で観察し、ChAT-IR ニューロンと TH-IR ニューロンあるいは VMAT2-IR 神経終末様構造の蛍光画像を取得した。

## 3. 統計解析

統計解析には、SPSS Statistics ver.22 (SPSS, Chicago, IL, USA) を用いた。値は平均値  $\pm$  標準誤差として表記した。統計的有意差は、すべての解析で  $P < 0.05$  に設定した。培養歯髄細胞における免疫陽性の比率についての 2 群間の比較は Mann-Whitney *U* test を用いた。TH-IR ニューロン数ならびに ChAT-IR ニューロン数の Mecp2-/y マウスと Wt マウス間の比較には二元配置分散分析を用い、両マウス間で有意差が認められた場合には、吻尾側的に同じ位置で計測した 2 群間の数値を *t* 検定を用いて比較した。

## 結 果

### 1. 実験 I

対象の RTT 女兒の *MECP2* の変異部位は、主治医らによって c. 473C > T, p. T158M であることが確認されており、本変異は *MECP2* のメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) 内に位置している。この MBD 内の変異により、MeCP2 のメチル化 CpG との結合が著しく低下することが明らかにされており<sup>16)</sup>、その下流に位置する遺伝子の発現調節に異常が生じると考えられている<sup>16)</sup>。本研究の実施にあたり、RETT ならびに CONT から抽出したゲノム DNA を試料として、変異部位を切断する制限酵素である Nla III を用いて RETT の変異部位を再確認したのち実験を行った。

### 1) 歯髄細胞における未分化マーカーの発現

RT-PCR の結果、CONT および RETT で、未分化マ-

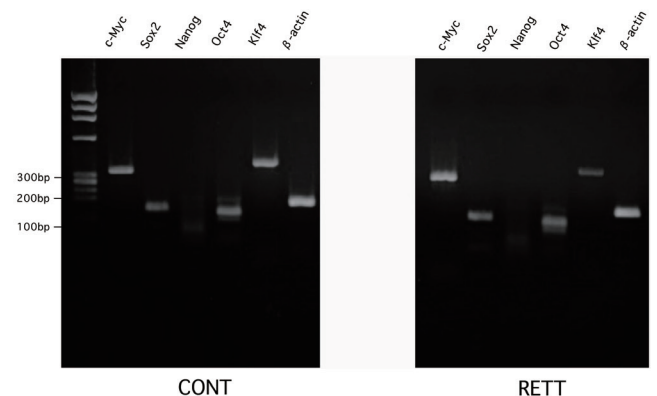


図 1 歯髄細胞における未分化マーカーの発現  
CONT および RETT ともに未分化マーカー c-Myc, Sox2, Oct4, Klf4 の発現を認めたが、両細胞とも Nanog の発現はみられなかった。



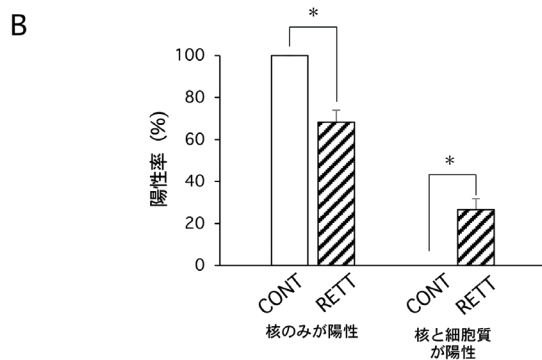
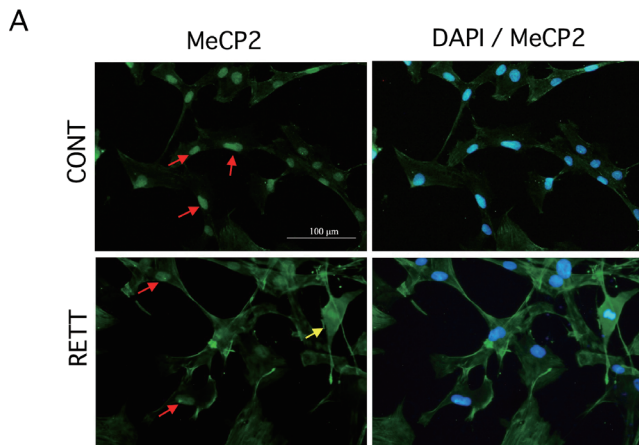


図2 MeCP2の免疫蛍光染色画像と陽性率

A: CONTでは、全細胞においてMeCP2陽性反応（緑）が主に核に局在していたのに対し、RETTではMeCP2が主に核に局在している細胞の他に、細胞質と核がほぼ同レベルで陽性反応を示した細胞が認められた。DAPIの蛍光シグナルを青で示す。赤矢印はMeCP2の核のみが陽性、黄矢印は核と細胞質が免疫陽性の細胞を示す。B: RETTでは、細胞質が核に近いレベルで免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められた。\*  $P < 0.01$

カーである c-Myc, Sox2, Oct4, Klf4 の遺伝子発現が認められたが、ともに Nanog の発現は認められなかった (図 1)。

## 2) 歯髄細胞における MeCP2 ならびに幹細胞マーカーの発現

CONT および RETT において MeCP2 の陽性率を調べたところ、CONT で 100%、RETT で 94.8% であった。それらのうち、CONT では全細胞で MeCP2 がほぼ核に局在していたのに対し、RETT では細胞質と核がほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が  $26.6 \pm 5.7\%$  認められ、CONT と RETT の比較で、核のみが免疫陽性の細胞の比率、ならびに核と細胞質ともに免疫陽性の細胞の比率について有意差が認められた ( $P < 0.01$ ) (図 2)。また増殖能のマーカーである Ki-67 についての免疫蛍光染色で、Ki-67 は核内に限局して陽性反応を示し、陽性率の平均は CONT で  $93.7 \pm 1.3\%$ 、RETT では  $82.3 \pm 1.3\%$  であり、CONT に

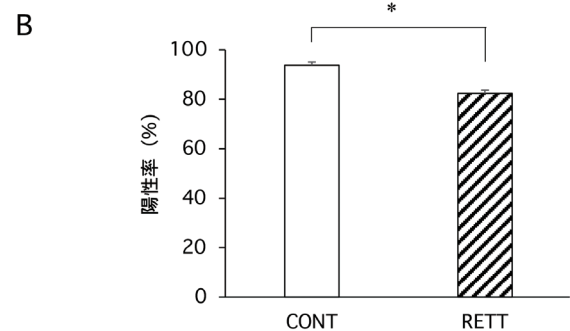
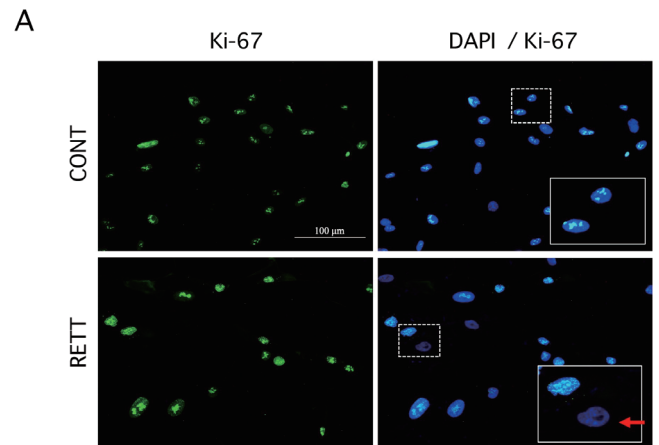


図3 Ki-67の免疫蛍光染色画像と陽性率

A: Ki-67陽性反応（緑）はCONTおよびRETTともに核内に限局していた。画像中の破線で囲む部分の拡大図を右下の四角内に示す。青はDAPIの蛍光シグナルで、赤矢印はKi-67の免疫反応が陰性の細胞を示す。B: 陽性率はCONTで93.7%であったのに対し、RETTでは82.3%と有意に低かった。\*  $P < 0.01$

比べ RETT で有意に低かった ( $P < 0.01$ ) (図 3)。多能性幹細胞マーカーである SSEA3 の発現は、CONT および RETT ともに弱く、主に核周囲及び細胞表面に局在しており、両細胞で違いはみられなかった (図 4 A)。間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 は、CONT および RETT ともほとんど発現がみられず、CONT において細胞膜の一部に弱い免疫陽性反応がみられたのみであった (図 4 B)。

## 2. 実験 II

### 1) マウスの DMV における TH-IR ニューロンの発現

TH-IR ニューロンの数は Wt マウスと比較して *Mecp2*/*y* マウスの方が多く、有意差が認められた ( $n = 8, P < 0.001$ ) (図 5)。*Mecp2*/*y* マウス、Wt マウスともに門から吻側に 100  $\mu\text{m}$  の位置で最も細胞数が多かった (図 5 A)。*Mecp2*/*y* マウスにおいて、TH-IR ニューロンはおもに DMV の中央から内側に分布していた (図 5 B)。



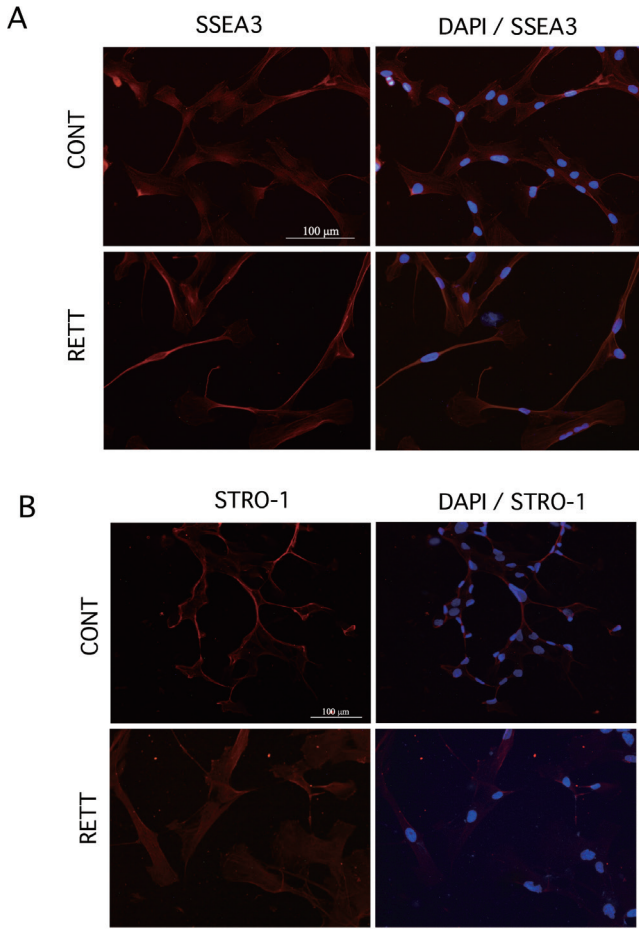


図4 SSEA3 (A) とSTRO1 (B) の免疫蛍光染色画像  
SSEA3およびSTRO-1の発現は、CONTとRETTで差異はみられなかった。

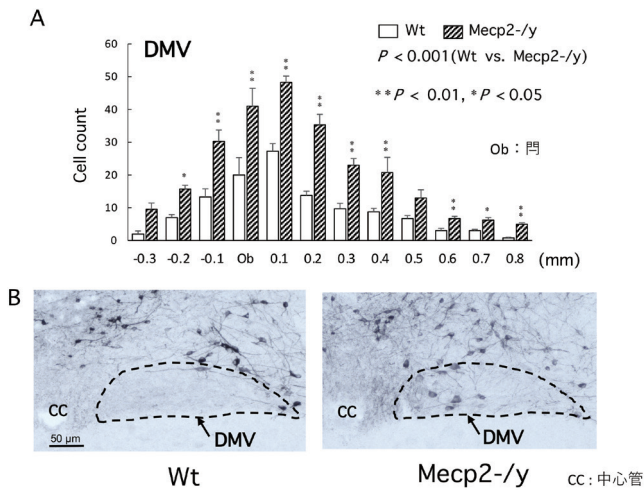


図5 DMVにおけるTH-IRニューロン  
A: TH-IRニューロンの数は、WtマウスよりもMecp2-/yマウスで有意に多かった。グラフの横軸は口からの距離を示し、尾側方向はマイナス (-) で示す。B: TH-IRニューロンの局在を示す。Mecp2-/yマウスではWtマウスに比べ、TH-IRニューロンが多く認められ、それらはDMVの中央から内側に位置していた。いずれも口から吻側200 μmの画像を示す。

2) マウスのDMVにおけるChAT-IRおよびTH-IRニューロンの局在

ChAT-IRニューロンはDMV全体に分布しており、Mecp2-/yマウスとWtマウスとの比較でChAT-IRニューロンの数に違いはみられなかった(図6)。免疫蛍光二重染色を行った切片について、ChATとTHの局在をLSCMにより調べたところ、Mecp2-/yマウスのDMVにおいて二重標識されたニューロンが多く確認され、それらはDMVの中央から内側に位置していた(図7)。一方、WtマウスではChATとTHが共存するニューロンはほとんど認められなかった(図7)。

3) DMVにおけるChAT-IRニューロンおよびVMAT2-IR神経終末様構造の局在

WtマウスのDMVでは、ChAT-IRニューロンの周囲にVMAT2-IR神経終末様構造が多数存在した(図8)。一方、Mecp2-/yマウスのDMVではVMAT2-IR神経終末様構造はわずかしき認められなかった(図8)。

### 考 察

CONTならびにRETTでは、いずれの細胞においても未分化マーカー遺伝子であるc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4の発現を認めた。また、Nanogについては両細胞ともに発現が認められなかった。佐藤ら<sup>7)</sup>による報告では、永久歯歯髄由来の間葉系幹細胞では、未分化マーカーのうちc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4が発現していたのに対し、乳歯歯髄由来の間葉系幹細胞ではc-Mycの発現が認められなかった。一方で、前者にはNanogが発現していなかった

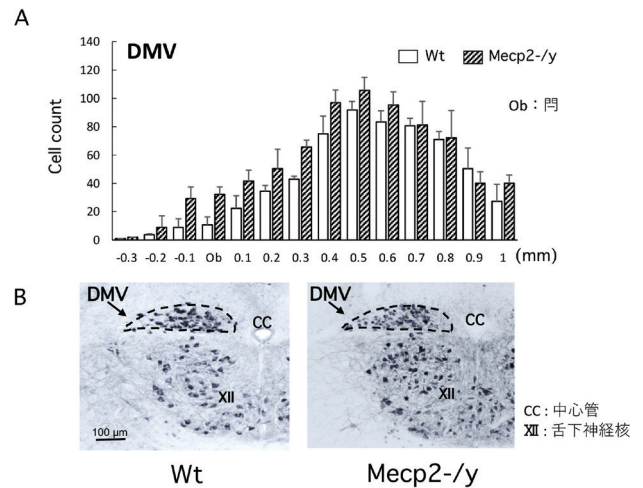


図6 DMVにおけるChAT-IRニューロン  
A: Mecp2-/yマウスおよびWtマウスのChAT-IRニューロンの数に差はみられなかった。B: 口から吻側200 μmの領域でのChAT-IRニューロンを示す。DMVと同様に舌下神経核にも多くのChAT-IRニューロンを認めた。

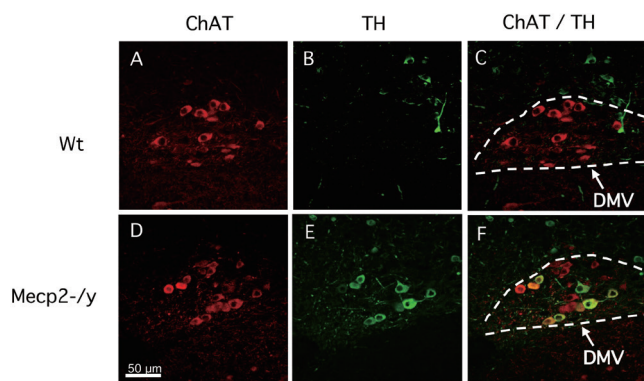


図7 DMVにおけるChAT-IRおよびTH-IRニューロンの発現  
A,D: ChAT-IRニューロン。B,E: TH-IRニューロン。C: Wtマウスにおいて、ChATおよびTHの共発現はみられなかった。F: Mecp2-/yマウスにおいて、複数のニューロンでChATおよびTHの共発現を認めた。門から吻側200 μmの画像を示す。

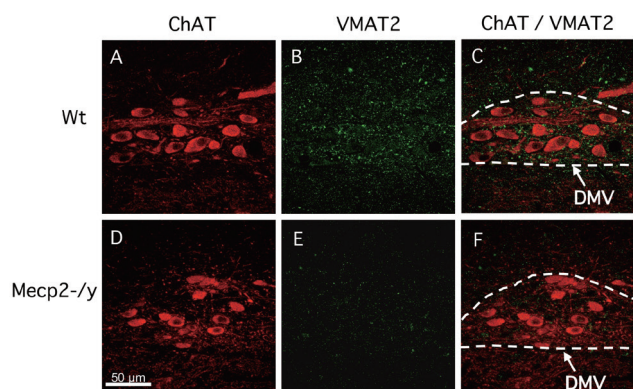


図8 DMVにおけるChAT-IRニューロンおよびVMAT2-IR神経終末様構造  
A,D: ChAT-IRニューロン。B,E: VMAT2-IR神経終末様構造。C,F: WtマウスではChAT-IRニューロンの周囲にVMAT2-IR神経終末様構造が多数認められたが、Mecp2-/yマウスではわずかしき認められなかった。門から吻側200 μmの画像を示す。

のに対し、後者では発現が確認されている。本研究結果は佐藤らの結果と一致しており、RETTは健常者の永久歯髄由来の間葉系細胞と同様に、幹細胞としての性質を有していることが強く示唆された。

RETTでは一対のX染色体の片方のMECP2に変異があり、変異MECP2が活性化している細胞において転写制御機構に異常をきたしていることが考えられる。RETTに生じたMECP2の変異は1塩基置換であり、MeCP2の三次構造にはわずかな変化しか生じないことから<sup>17)</sup>、RETTのMeCP2はCONTのMeCP2と同様に今回使用した抗体に対する抗原性を維持していた。本研究において、CONTの全細胞でMeCP2が核に局在していたのに対し、RETTでは細胞質と核がほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められ、CONTとRETTを比較した場合、核のみが免疫陽性の細胞の比率ならびに核と細胞質ともに免疫陽性の細胞の比率に有意差が認められた。今回観察さ

れた、細胞質にも明らかなMeCP2の免疫陽性反応を認めた細胞は、MECP2の変異アレルが活性化した細胞である可能性が高い。これらのRETTでは、MeCP2の核内でのDNA結合能が低下しているために核内に留まることができず細胞質に移行したものと推測される。理論的にはRETTのうちMECP2が変異した細胞の比率は50%であるが、継代培養によってその比率が変化した可能性は否定できない。Ki-67に対する免疫蛍光染色で、CONTに比べRETTでKi-67の陽性率が有意に低かったことは、RETTがCONTに比べ増殖能が低いことを示唆している。その違いが変異MeCP2の転写調節機能の低下によるKi-67発現への直接の影響なのか、それともMeCP2の変異による細胞増殖能全般への負の影響によるものなのかは今後検討する必要がある。

マウスを用いたこれまでの研究で、Mecp2-/yマウスではWtマウスに比べ、脳の複数の部位でノルアドレナリン量が低下していること<sup>18)</sup>、またTHを発現するA1/C1およびA2/C2細胞群のニューロン数が減少していることが報告されている<sup>12)</sup>。本研究では、Mecp2-/yマウスのDMVにおけるTH-IRニューロンならびにChAT-IRニューロンの数および分布について詳細に調べることとし、観察時に励起光源の安定性や蛍光強度変化の影響を受けやすい免疫蛍光染色ではなく、繰り返し安定した観察や計測が可能なDAB染色を採用した。Wtマウスとの比較で、Mecp2-/yマウスのDMVではTH-IRニューロンが多く認められた。また免疫蛍光二重染色でChATとの共存について検討したところ、Mecp2-/yマウスのDMVの多くのChAT-IRニューロンがTHを共発現していることを確認した。DMVでは孤束核と同様に、摂食行動後にFos免疫陽性細胞数が増加することが報告されている<sup>19)</sup>。これらの知見は、DMVにおいて副交感神経の制御に関与しているコリン作動性ニューロンが、Mecp2-/yマウスにおいてはTHの共発現によってカテコールアミン産生能を増強させていることを示しており、それにより胃などの消化管に分布する副交感神経の機能に変化が生じていることが示唆される。

現在のところ、Mecp2の欠損とDMVでのTH-IRニューロン数の増加あるいはコリン作動性ニューロンでのTHの共発現の増加が、Mecp2-/yマウスにおいてDMVの機能をどのように変化させるかについては不明である。これまでの研究で、延髄の神経細胞でのTHの発現に対する長期の低酸素暴露の影響が報告されている。低酸素暴露は、A2細胞群でのTH活性とmRNA発現を増加させ<sup>20, 21)</sup>、孤束核とDMVでのTH量の増加を誘発した<sup>21)</sup>と報告されている。成体期のMecp2-/yマウスは呼吸中枢の機能が著しく不安定化し、無呼吸が頻発するなどの重度の呼吸異常を示す。また本研究に用いた生後8週のMecp2-/yマウスでは慢性的なチアノーゼを呈する個体が認められた。以上の報告や所見から、成体期のMecp2-/yマウスにおける持



続的な低酸素状態が、DMV ニューロンの TH 合成経路を活性化している可能性が考えられる。さらに DMV での VMAT2-IR 神経終末様構造と ChAT-IR ニューロンとの関係について免疫蛍光二重染色により観察したところ、Wt マウスでは ChAT-IR ニューロンの周囲に多数の VMAT2-IR 神経終末様構造が観察されたのに対し、Mecp2-/y マウスでは VMAT2-IR 神経終末様構造はほとんど観察されなかった。VMAT2は、主にセロトニン、ドパミン、ノルアドレナリンあるいはアドレナリンなどのモノアミン作動性ニューロンに発現することから<sup>22)</sup>、Mecp2-/y マウスの DMV ではモノアミン作動性神経入力を介した機能調節に何らかの異常が生じていることが示唆される。

現在まで、MeCP2により転写が抑制または活性化されている遺伝子の探索が行われているが、実際にMeCP2の標的としてRTTの機能異常との関連が判明している遺伝子はBDNFなどに限られている<sup>10)</sup>。また、MeCP2の異常がどのような経路でモノアミン作動性ニューロンのシナプス形成を阻害しているのかは明らかではない。現在までRTTの病態を改善させる安全で効果的な治療法は開発されておらず、モデルマウスを用いる基礎研究は、候補となる治療用薬物を研究するうえでヒトの細胞を対象とする研究と同様に重要である。

DMVを含めて、RTT患者の脳幹におけるTHの発現やモノアミン作動性神経伝達を促進する薬物の開発、あるいは中枢神経系において変異MeCP2の機能を補完することが可能な治療法の開発は、RTT患者で観察される種々の病態の改善に役立つものと考えられた。

## 結 論

実験Iにて、継代培養したCONTおよびRETTについて特性を比較、解析するとともに、実験IIにて、Mecp2-/yマウスとWtマウスのDMVにおけるTH-IRおよびChAT-IRニューロンの発現を検討した結果、以下の結論を得た。

1. CONTおよびRETTでは、ともに未分化マーカー遺伝子のc-Myc, Sox2, Oct4, Klf4の発現を認めた。
2. CONTでは全細胞でMeCP2がほぼ核に局在していたのに対し、RETTでは核に加えて細胞質にも免疫陽性反応を示した細胞が26.6%認められた。またKi-67の陽性率はCONTに比べRETTで有意に低かった。
3. RETTでは変異MECP2が活性化した細胞が一定の割合で存在しており、MECP2の変異がMeCP2の細胞内局在に影響を及ぼすと同時に細胞の増殖能を低下させている可能性が示された。
4. Wtマウスとの比較で、Mecp2-/yマウスのDMVではChAT-IRニューロンの数に差はみられなかったがTH-IRニューロンの数が多く、またChATおよびTHを共発現するニューロンが多く認められた。

以上より、MECP2の変異がRETTの増殖能を低下させ

ていること、MeCP2の欠損がDMVニューロンの活動を変化させ、消化管運動を調節している副交感神経の働きに影響を及ぼしていることが示唆された。

本研究遂行にあたり、格別たるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部小児歯科学講座 白川 哲夫教授、菊入 崇准教授に謹んで深く感謝を申し上げます。また、本研究を通じ、多大なるご協力を賜りました日本大学歯学部小児歯科学講座の皆様にご感謝申し上げます。

なお、本研究では開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. Nat Genet 23, 185-188.
- 2) Neul JL, Zoghbi HY (2004) Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. Neuroscientist 10, 118-128.
- 3) Neul JL (2012) The relationship of Rett syndrome and MECP2 disorders to autism. Dialogues Clin Neurosci 14, 253-262.
- 4) 白川哲夫, 秋山茂久, 堤香奈子, 森崎市治郎, 田村文誉, 保母妃美子, 菊谷 武, 支 景華, 武井浩樹, 高森一乗 (2017) レット症候群患者の口腔機能障害の把握と歯科医療支援. 障害者歯38, 140-147.
- 5) 原 宗嗣 (2015) 便秘・消化管運動異常. レット症候群診療ガイドブック. 青天日信, 伊藤雅之, 大阪大学出版会, 大阪, 183-188.
- 6) Honda MJ, Watanabe E, Mikami Y, Saito Y, Toriumi T, Shirakawa T, Shimizu N, Watanabe N, Isokawa K (2013) Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. Int J Oral Maxillofac Implants 28, 451-460.
- 7) 佐藤桃子, 石田千晶, 岩佐聡子, 武井浩樹, 本田雅規, 白川哲夫 (2014) 乳歯および永久歯歯髓組織由来間葉系細胞の特性の比較. 小児歯誌 52, 417-424.
- 8) Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. Nat Genet 27, 322-326.
- 9) Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. Nat Genet 27, 327-331.
- 10) Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R (2006) The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. Neuron 49, 341-348.
- 11) Ishiyama M, Tamura S, Ito H, Takei H, Hoshi M, Asano M, Ito M, Shirakawa T (2019) Early postnatal treatment with valproate induces Gad1 promoter remodeling in the brain and reduces apnea episodes in Mecp2-null mice. Int J Mol Sci 20, 5177.
- 12) Viemari JC, Roux J, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Peña F, Zanella S, Bévengut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB, Moncla A, Mancini J, Ramirez JM, Villard L, Hilaire G (2005) Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. J Neurosci 25, 11521-11530.
- 13) Zhang X, Su J, Rojas A, Jiang C (2010) Pontine norepinephrine defects in Mecp2-null mice involve deficient expression of dopamine beta-hydroxylase but not a loss of catecholaminergic neurons. Biochem Biophys Res Commun

- 394, 285-290.
- 14) Guo JJ, Browning KN, Rogers RC, Travagli RA (2001) Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, 361-367.
  - 15) Belichenko NP, Belichenko PV, Li HH, Mobley WC, Francke U (2008) Comparative study of brain morphology in *Mecp2* mutant mouse models of Rett syndrome. *J Comp Neurol* 508, 184-195.
  - 16) Brown K, Selfridge J, Lagger S, Connelly J, De Sousa D, Kerr A, Webb S, Guy J, Merusi C, Koerner MV, Bird A (2016) The molecular basis of variable phenotypic severity among common missense mutations causing Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 25, 558-570.
  - 17) Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Nikitina T, Gierasch LM, Woodcock CL (2008) Rett syndrome-causing mutations in human MeCP2 result in diverse structural changes that impact folding and DNA interactions. *J Biol Chem* 283, 20523-20534.
  - 18) Ide S, Itoh M, Goto Y (2005) Defect in normal developmental increase of the brain biogenic amine concentrations in the *mecp2*-null mouse. *Neurosci Lett* 386, 14-17.
  - 19) Emond MH, Weingarten HP (1995) Fos-like immunoreactivity in vagal and hypoglossal nuclei in different feeding states: a quantitative study. *Physiol Behav* 58, 459-465.
  - 20) Soulier V, Dalmaz Y, Cottet-Emard JM, Kitahama K, Pequignot JM (1995) Delayed increase of tyrosine hydroxylation in the rat A2 medullary neurons upon long-term hypoxia. *Brain Res* 674, 188-195.
  - 21) Pépin JL, Lévy P, Garcin A, Feuerstein C, Savasta M (1996) Effects of long-term hypoxia on tyrosine hydroxylase protein content in catecholaminergic rat brainstem areas: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 733, 1-8.
  - 22) Eiden LE, Weihe E (2011) VMAT2: A dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1216, 86-98.



# 急性期病院における誤嚥性肺炎患者の生命予後に 関連する因子について

渡 邊 真 央

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野

日本大学歯学部摂食機能療法学講座

(指導: 植田耕一郎 教授, 中山湖利 准教授)

## 要旨

**【目的】** 誤嚥性肺炎は、近年の日本における死因の上位の疾患である。先行研究において、栄養状態が誤嚥性肺炎患者の入院中の生命予後に影響する可能性があることが報告されているが、誤嚥性肺炎発症後の転帰には他にも複数の要因が関係すると考えられる。本研究では、誤嚥性肺炎で入院した患者の入院時の栄養状態、日常生活動作 (ADL)、嚥下機能および口腔内環境と入院中の生命予後との関連性を調べることを目的とした。

**【方法】** 対象は急性期病院に2019年4月から2021年1月までの期間に誤嚥性肺炎が原因で入院した患者96名 (平均  $86.9 \pm 9.7$  歳, 男性57名, 女性39名) とした。調査項目は入院時の年齢, 性別, 基礎疾患, functional independence measure (FIM), 血清アルブミン値 (Alb), body mass index (BMI), Eichner 分類, 歯数, 口腔乾燥値, 口腔内細菌レベル, 兵頭スコアおよび藤島の摂食嚥下能力グレード (嚥下グレード) とした。生存退院群と死亡退院群の2群に分けて群間比較を行った後, 有意差のあった項目を説明変数, 入院中の死亡を従属変数としてロジスティック回帰分析を行った。

**【結果】** 生存退院群は70人 (平均  $87.2 \pm 9.2$  歳, 男性40名, 女性30名), 死亡退院群が26名 (平均  $86.2 \pm 11.2$  歳, 男性17名, 女性9名) であった。2群間の比較では, Alb, BMI, FIM, 口腔内細菌レベル, 兵頭スコア, 嚥下グレードに有意差を認めた。また, ロジスティック回帰分析の結果, 上記すべての項目に有意差を認め, 的中率は74.0%であった。

**【結論】** 誤嚥性肺炎で入院した患者のうち入院中に死亡した患者は, 入院時の栄養状態の不良, ADLと嚥下機能の低下, 口腔内細菌数の増加といった特徴があり, これらが生命予後に影響する可能性が示唆された。

**キーワード:** 誤嚥性肺炎, 栄養状態, ADL, 嚥下機能, 口腔内細菌数

## Factors associated with life prognosis in patients with aspiration pneumonia in an acute care hospital

Mao Watanabe

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Health Sciences

Department of Dysphagia Rehabilitation, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Professor Koichiro Ueda and Associate Professor Enri Nakayama)

## Abstract

**【Purpose】** Aspiration pneumonia has been one of the leading causes of death in Japan in recent years. Previous studies have reported that nutritional status may affect the survival prognosis of patients with aspiration pneumonia during hospitalization, but other factors may also be involved. Therefore, this study aimed to clarify the factors related to life prognosis during hospitalization among patients admitted with aspiration pneumonia.

**【Methods】** The study included 96 patients (average age  $86.9 \pm 9.7$  years; 57 males, 39 females), who were admitted to an acute care hospital due to aspiration pneumonia between April 2019 and January 2021. Survey items were age, gender, medical history, functional independence measure (FIM), serum albumin level (Alb), body mass index (BMI), Eichner index, number of teeth, degree of oral dryness, oral bacterial level, Hyodo score, and Fujishima's swallowing ability grade (swallowing grade). The patients were divided into two groups: the surviving discharge group and the death discharge group. After comparison between the groups, a logistic regression analysis was performed using items with significant differences as explanatory variables and death during hospitalization as a dependent variable.

**【Results】** The number of patients discharged alive was 70 (mean age  $87.2 \pm 9.2$  years; 40 males, 30 females) and the number of those discharged dead was 26 (mean age  $86.2 \pm 11.2$  years; 17 males, 9 females). A comparison between the groups showed significant differences in Alb, BMI, FIM score, oral bacterial level, Hyodo score, and swallowing grade. Logistic regression analysis showed significant differences in all above items, with a hit rate of 74.0%.

**【Conclusion】** Patients hospitalized for aspiration pneumonia who died during hospitalization were characterized by poor nutritional status on admission, poor activities of daily living, poor swallowing function, and increased oral bacterial counts, suggesting that these factors may affect life prognosis.

**Keywords:** aspiration pneumonia, nutritional status, ADL, swallowing function, oral bacterial count

(受付: 令和5年1月30日)

責任著者連絡先: 渡邊真央

日本大学歯学部 摂食機能療法学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8198

FAX: 03-3219-8203

E-mail: mao.w0907@gmail.com

## 緒 言

2021年の厚生労働省の統計によると、主な死因疾患のうち肺炎は5.1%の第5位であり、そのうち誤嚥性肺炎での死亡率は40.3%と高い割合を示している<sup>1)</sup>。また、70歳以上の肺炎のうち8割以上を誤嚥性肺炎が占めているとされており、今後も我が国では高齢化率の進展に伴い、誤嚥性肺炎の罹患率や死亡率の増加が予測されている<sup>2)</sup>。

誤嚥性肺炎に関連する因子については、これまで多くの研究が報告されており、加齢、免疫力の低下、脳血管障害や慢性呼吸器疾患等の基礎疾患、認知症、食道疾患、脱水・低栄養状態、口腔内の衛生状態の不良、多種類の内服薬による嚥下機能低下などがリスク因子にあげられる<sup>3-8)</sup>。しかし、誤嚥性肺炎患者の入院中の生命予後に影響する因子についての報告は少ない。

誤嚥性肺炎患者の生命予後について調べた研究では、禁食期間を設けた群で入院期間が延長したと報告されている<sup>9)</sup>。また、誤嚥性肺炎に罹患した高齢患者を准高齢群(65~74歳)、高齢群(75~89歳)、超高齢群(90歳以上)の3群に分けて生命予後を追跡調査した研究では、栄養状態の指標である血清アルブミン値、body mass index および mini nutritional assessment short-form がいずれの群でも生命予後に最も関連し、さらに年代別の比較では、超高齢群において入院日数が有意に短かったと報告している<sup>10)</sup>。しかし、誤嚥性肺炎患者の生命予後には、栄養状態の他にも複数の因子が関連すると考えられる。本研究では、栄養状態に加えて日常生活動作(ADL)、嚥下機能および口腔内環境に着目し、誤嚥性肺炎で入院した患者の入院中の生命予後との関連性を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 対象

対象者は、2019年4月から2021年1月の間に彦根市立病院に入院し、歯科口腔外科に嚥下機能評価依頼があった患者のうち、主疾患が誤嚥性肺炎であった患者96名(平均 $86.9 \pm 9.7$ 歳、男性57名、女性39名)とした(図1)。

調査を行った病院では、誤嚥性肺炎患者のうち摂食嚥下機能の低下が疑われる患者に対して、主治医が歯科口腔外科に嚥下機能評価を依頼している。歯科口腔外科初診日に口腔内診査、嚥下スクリーニング検査、嚥下機能評価が行われる。急性期患者は検査室への搬送が難しいため、ベッドサイドにて嚥下内視鏡検査(videoendoscopic examination of swallowing: VE)による嚥下機能評価が行われる。VE後に歯科医、主治医および言語聴覚士(speech therapist: ST)らで治療方針について協議して、歯科医が口腔ケアや義歯調整等を行い、STが摂食嚥下リハビリテーションを実施する。本調査対象者は全員、経験年数10年以上の歯科医がVEを行い、治療およびリハビリテーションが実施

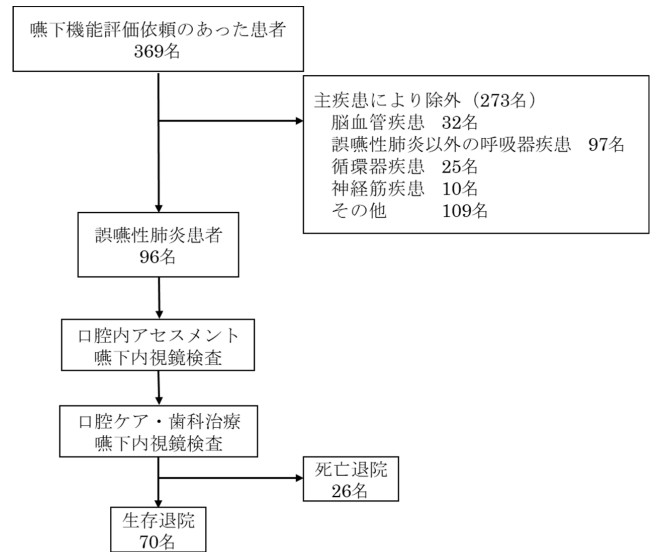


図1 調査対象者の選定から評価の流れ



図2 口腔水分計ムーカス



図3 口腔内細菌カウンタ NP・BCM01-A

された。

### 2. 調査項目および評価方法

診療記録から、対象者の年齢、性別、基礎疾患、入院時の functional independence measure (FIM)<sup>11)</sup>、入院日から歯科口腔外科初診日までの期間、入院時の血清アルブミン値 (Alb) および body mass index (BMI) を収集した。さらに、歯科口腔外科医による初回嚥下評価時に咬合支持域 (Eichner 分類)<sup>12)</sup>、歯数、口腔水分計 (口腔水分計ムーカス第4世代、ライフ、埼玉) (図2) を用いた口腔乾燥値<sup>13)</sup>、微生物定量分析装置 (口腔内細菌カウンタ NP-BCM01-A、パナソニック、東京) (図3) による口腔内

表1 細菌カウントによるレベル分類<sup>14)</sup>

良好群	レベル1	10万個未満
	レベル2	10万個～100万個未満
	レベル3	100万個～316万個未満
	レベル4	316万個～1000万個未満
やや不良	レベル5	1000万個～3160万個未満
不良群	レベル6	3160万個～1億個未満
	レベル7	1億個以上

表2 兵頭スコア<sup>15)</sup>

① 喉頭蓋谷や梨状陥凹の唾液貯留
0: 唾液貯留がない 1: 軽度唾液貯留あり 2: 中等度の唾液貯留があるが、喉頭腔への流入はない 3: 唾液貯留が高度で、吸気時に喉頭腔へ流入する
② 声門閉鎖反射や咳反射の惹起性
0: 喉頭蓋や披裂部に少し触れるだけで容易に反射が惹起される 1: 反射は惹起されるが弱い 2: 反射が惹起されないことがある 3: 反射の惹起が極めて不良
③ 嚥下反射の惹起性
0: 着色水の咽頭流入がわずかに観察できるのみ 1: 着色水が喉頭蓋谷に達するのが観察できる 2: 着色水が梨状陥凹に達するのが観察できる 3: 着色水が梨状陥凹に達してもしばらくは嚥下反射が起きない
④ 着色水嚥下による咽頭クリアランス
0: 嚥下後に着色水残留なし 1: 着色水残留が軽度あるが、2～3回の空嚥下でwash outされる 2: 着色水残留があり、複数回嚥下を行ってもwash outされない 3: 着色水残留が高度で、喉頭腔に流入する
総計の点数 (①+②+③+④) =

細菌レベル<sup>14)</sup>(表1)を調べた。Eichner分類は、使用可能な義歯を所持していた場合は義歯を含めて評価を行った。口腔乾燥値は、舌背部の先端から10 mm後方の部位で一定の測定圧(200 g以上)で口腔水分計を2秒間圧接した値を3回測定し、その平均値を算出した<sup>13)</sup>。口腔内細菌レベルは、舌背中央部を滅菌綿棒を用いて擦過圧20 gfにて1 cm間隔を3往復、擦過後、細菌カウントに擦過後の綿棒をセットして細菌数を3回計測し、その平均値を算出した<sup>14)</sup>。口腔乾燥値、口腔細菌レベルともに、朝食後に行われる病棟看護師による口腔ケア後、2時間経過した口腔内の舌背で測定した。さらに、初回嚥下評価時のVEの結果から、兵頭スコア<sup>15)</sup>と藤島の摂食嚥下能力グレード(嚥下グレード)<sup>16)</sup>を収集した。兵頭スコアはVEの評価法の1つであり、安静時の咽頭内の唾液の貯留量、喉頭蓋の感覚、嚥下反射の惹起のタイミング、咽頭クリアランスの4項目を0点から3点の4段階で評価し、各項目の合計点(合計スコア)で経口摂取の可否を判断する方法であり、合計スコアが8点以上であれば経口摂取困難と判定される(表2)。一方、嚥下グレードは、VE所見に加え意識レベ

表3 藤島の摂食嚥下能力グレード<sup>16)</sup>

Ⅰ重症 経口不可	1	嚥下困難または不能、嚥下訓練適応なし
	2	基礎的嚥下訓練のみ適応あり
	3	条件を整えば誤嚥は減り、摂食訓練が可能
Ⅱ中等症 経口と補助栄養	4	楽しみとしての摂取は可能
	5	一部(1～2食)経口摂取可能
	6	3食経口摂取プラス補助栄養
Ⅲ軽症 経口のみ	7	嚥下食で、3食とも摂取可能
	8	特別に嚥下しにくい食品を除き、3食経口摂取
	9	常食の経口摂取可能、臨床的観察と指導を要する
Ⅳ正常	10	正常の摂食嚥下能力

表4 対象者の基本属性

	生存退院群(n=70)	死亡退院群(n=26)	p値
年齢(平均±SD歳)	87.2 ± 9.2	86.2 ± 11.2	0.732
性別(n(%), 男/女)	40(57.1)/30(42.9)	17(65.4)/9(34.6)	0.312
歯科初診までの期間(平均±SD日)	4.79 ± 4.80	5.46 ± 4.54	0.352
基礎疾患(n(%))			0.278
脳血管疾患	4 (5.7)	3 (11.5)	
呼吸器疾患	15 (21.4)	6 (23.0)	
神経筋疾患	5 (7.1)	0 (0)	
循環器疾患	16 (22.9)	8 (30.8)	
その他	40 (57.1)	9 (34.6)	

ルや耐久性を考慮した上で、対象患者の食事摂取の実行状態に応じて10段階で評価し、経口摂取不可がGr.1～3、経口摂取と代替栄養がGr.4～6、経口摂取のみがGr.7～9、正常がGr.10と判定する(表3)。

### 3. 統計学的分析

対象者を生存退院群と死亡退院群に分け、各変数の正規性を確認した後に間隔尺度はt検定、順序尺度はMann-WhitneyのU検定、名義尺度はカイ二乗検定を使用して2群比較を行った。また、死亡退院のリスク因子の検討はロジスティック回帰分析を用いた。有意水準は5%とし、統計処理は統計ソフト(IBM SPSS Statistics Ver.26, 日本アイ・ビー・エム, 東京)を使用した。

### 4. 倫理的配慮

対象者に対し、研究内容の説明を書面にて行い、本人および家族の同意書を得た後に実施した。なお、本研究は日本大学歯学部倫理委員会の承認(許可番号EP19D002)、彦根市立病院倫理委員会の承認(承認番号2109-02)を得て実施された。

## 結 果

### 1. 対象者の基本属性

生存退院群は70名(平均87.2 ± 9.2歳, 男性40名, 女性30名)であり平均入院日数は37.1日, 死亡退院群は26名(平均86.2 ± 11.2歳, 男性17名, 女性9名)で, 平均入院日数は34.7日であった。年齢, 性別, 入院日から歯科口腔



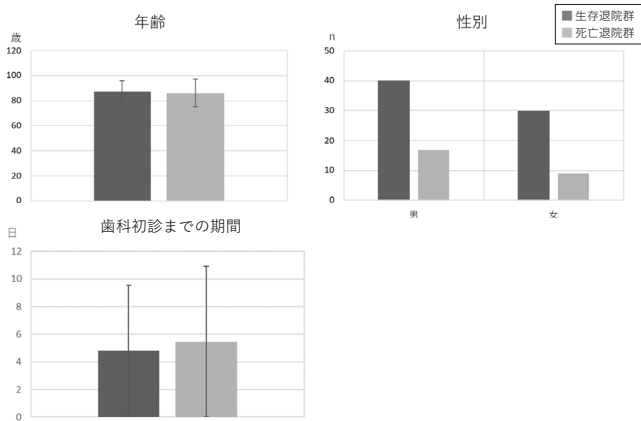


図4 年齢、性別、歯科初診までの期間における生存退院群と死亡退院群との比較  
年齢、性別：カイ二乗検定  
初診までの期間：t検定

外科初診日までの期間および対象者の基礎疾患の保有割合に有意差は認められなかった (表 4, 図 4)。

2. 栄養状態, ADL, 口腔内環境および嚥下機能

生存退院群と死亡退院群の栄養状態, ADL, 口腔環境および嚥下機能に関する各評価指標の比較を表 5 ならびに図 5 に示す。Alb と BMI はそれぞれ死亡退院群が生存退院群に比べて有意に低かった。FIM については、運動項目と認知項目のいずれも死亡退院群が生存退院群に比べて有意に低かった。歯数、Eichner 分類および口腔乾燥値に有意差はなかったが、口腔内細菌レベルについては、死亡退院群が生存退院群より有意に高かった。また兵頭スコアは死亡退院群が生存退院群に比べて有意に高く、嚥下グレードは死亡退院群が生存退院群より有意に低かった。

さらに、2 群比較で有意差のあった Alb, BMI, FIM, 口腔内細菌レベル, 兵頭スコア, 嚥下グレードを説明変数とし、死亡退院を従属変数としてロジスティック解析を行った結果を表 6 に示す。モデル 1 は診療記録から得られた情報のみを用いたモデルで、BMI, Alb, FIM のいずれも有意な関連性を認め、判別の中率は 25.0% であった。モデル 2 は歯科口腔外科初診時に得た情報を加えたモデルで、いずれも有意な関連性を認め、判別の中率は 74.0% であった。歯科初診時に得られた情報を含めることで判別の中率の大幅な向上が認められた。

考 察

誤嚥性肺炎患者の中長期的生命予後について調査した先行研究では、誤嚥性肺炎患者の半数以上が 1 年以内に死亡し、生命予後を悪化させるリスク因子として高齢、男性、嚥下機能低下、BMI 低下を挙げている<sup>17)</sup>。本研究では、生存退院群と死亡退院群の比較において年齢と性別に有意差は認められなかった。これは本調査が急性期病院に入院

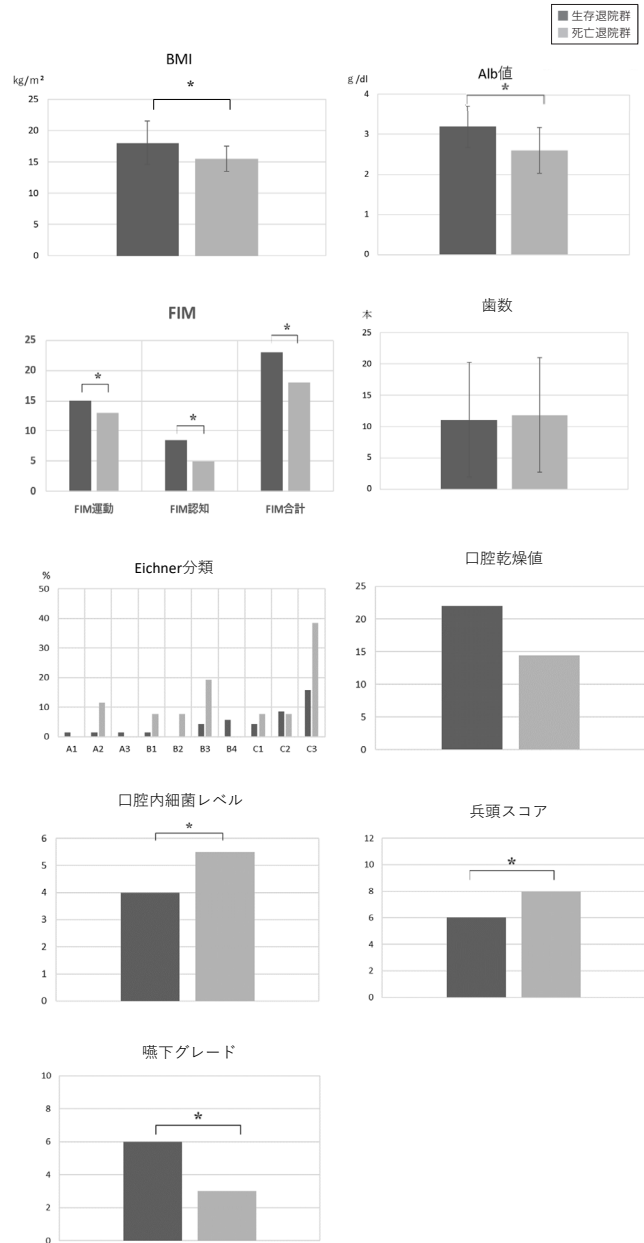


図5 栄養状態、日常生活動作、口腔内の状態および嚥下機能に関する各指標における生存退院群と死亡退院群との比較  
BMI, Alb 値, 口腔内細菌数レベル, 歯数：t検定  
Eichner 分類, 兵頭スコア, 嚥下グレード：Mann-Whitney の U検定  
BMI：body mass index, Alb：血清アルブミン, FIM：functional independence measure  
\*p < 0.001

した患者に限定していたことに加えて、対象者のほとんどが後期高齢者であり、年齢層が狭かったことが関係していると考えられる。本調査は対象を高齢者に限定したわけではないが、誤嚥性肺炎が高齢者に多い疾患であるとともに、本調査を行った病院が高齢者の多い地域であったことも対象者の年齢層に影響したと考えられる。

入院患者に対して歯科介入および摂食嚥下リハビリテーションを早期に開始することで、誤嚥性肺炎のリスクの低



表5 生存退院群と死亡退院群との比較

	生存退院群 (n = 70)	死亡退院群 (n = 26)	p値
BMI (平均 ± SD kg/m <sup>2</sup> )	18.51 ± 3.50	15.68 ± 2.00	<0.001*
Alb値 (平均 ± SD g/dl)	3.00 ± 0.53	2.59 ± 0.57	<0.001*
FIM合計 (中央値, [四分位範囲])	23 [18 - 33]	18 [18 - 18]	<0.001*
FIM運動 (中央値, [四分位範囲])	15 [13 - 21.5]	13 [13 - 13]	<0.001*
FIM認知 (中央値, [四分位範囲])	8.5 [5 - 17]	5 [5 - 13]	<0.001*
歯数 (平均 ± SD 本)	11.1 ± 9.2	11.88 ± 9.3	0.854
Eichner分類 (%, A1/A2/A3/B1/B2/B3/B4/C1/C2/C3)	1.4/ 1.4 / 1.4 / 1.4 / 0 / 4.3 / 5.7 / 4.3 / 8.6 / 15.7	0 / 11.5 / 0 / 7.7 / 7.7 / 19.2 / 0 / 7.7 / 7.7 / 38.5	0.453
口腔乾燥値 (中央値, [四分位範囲])	22.0 [12.6 - 27.9]	14.4 [5.0 - 27.8]	0.286
口腔内細菌数レベル (中央値, [四分位範囲])	4 [3 - 5]	5 [4 - 6]	<0.001*
兵頭スコア (中央値, [四分位範囲])	6 [5 - 8]	8 [7 - 9]	<0.001*
嚥下グレード (中央値, [四分位範囲])	6 [4 - 7]	3 [2 - 3]	<0.001*

BMI : body mass index, Alb : 血清アルブミン, FIM : functional independence measure

\*p < 0.01

表6 死亡退院を従属変数としたロジスティック回帰分析

説明変数	偏回帰係数	p値	オッズ比	95%の信頼区間	
				下限	上限
モデル1					
BMI	0.036	0.007*	0.270	1.168	1.807
Alb	0.194	0.012*	0.246	1.671	9.620
FIM	0.008	0.041*	0.203	1.049	1.574
モデル2					
BMI	0.373	<0.001*	1.453	1.168	1.807
Alb	1.389	0.002*	4.010	1.671	9.620
FIM	0.251	0.016*	1.285	1.049	1.574
口腔内細菌数	-0.913	<0.001*	0.401	0.256	0.629
兵頭スコア	-0.565	<0.001*	0.568	0.422	0.764
嚥下グレード	0.963	<0.001*	2.620	1.737	3.951

BMI : body mass index, Alb : 血清アルブミン, FIM : functional independence measure

\*p < 0.05

減と在宅復帰率の向上が認められる<sup>18)</sup>。本研究では、生存退院群と死亡退院群との比較において歯科介入までの期間に有意差は見られなかった。これは、本調査の対象者に介入開始が遅れた例がほとんどなかったことを示すと考えられる。

歯数については、長期的には歯数が多い方の生命予後が良いことが報告されている<sup>19)</sup>。欠損歯数が多くなることで、食物繊維やタンパク質、ビタミンおよびミネラルの摂取量が減少し<sup>20-23)</sup>、栄養状態が不良になることでサルコペニアあるいはフレイルに移行しやすくなるといわれている<sup>24)</sup>。ただし、本研究では調査期間が短期間であったことに加え、栄養不足は経管または輸液で補える環境にあったため、歯数の影響は少なかったと考えられる。

口腔乾燥は、緩和ケア受療がん患者の生命予後との関連性について報告されているが<sup>25)</sup>、今回の研究では有意差を認めなかった。これは対象者の主疾患の違いによるものと考えられる。ただし、口腔乾燥は日内変動があるうえに、対象者の精神状態の影響も受けるため<sup>26)</sup>、今後さまざまな測定条件のもとで検討することが必要である。

嚥下機能の低下については、本研究ではVEを用いて兵

頭スコアと嚥下グレードを用いた。兵頭スコアはVE所見から咽頭期を中心とした嚥下機能における感覚入力や嚥下中枢、運動出力の各機能を包括的に評価したスケールである。一方で、嚥下グレードは、評価時点の摂食嚥下障害患者の栄養摂取方法を評価するため、患者の嚥下機能のみならず認知機能や意識状態、耐久性等も評価に影響する。実際に今回の対象者の中には、経口摂取可能な摂食嚥下機能を有していたが、全身状態を考慮して経口摂取が見送られたことで評点が低くなったケースもあった。誤嚥性肺炎患者の中長期的な生命予後に関係する因子を調べた先行研究では、摂食嚥下機能の評価スケールの一つである摂食嚥下障害臨床的重症度分類のみを用いて評価されている<sup>17)</sup>。今回の調査で兵頭スコアと嚥下グレードのいずれも生命予後と関連性を認めたことから、全身状態も含めた複合的な経口摂取能力の低下が誤嚥性肺炎患者の生命予後に悪影響を及ぼすことが示唆された。

摂食嚥下障害を有する高齢患者の生死に関連する因子を調査した研究において、入院時に低栄養がある場合、予後不良となる可能性が高いことが報告されている<sup>10)</sup>。さらに、別の調査では高齢者の肺炎の重症化に関わるリスク因子と

して、栄養摂取不良と免疫能の低下が報告されている<sup>27)</sup>。本研究では栄養状態の指標として BMI と Alb を測定した。Alb の基準値は 3.9 g/dL 以上とされており、3.5 g/dL 以下は低栄養の疑いがある。本研究において、BMI と Alb のいずれも死亡退院患者は生存退院患者に比べて低値であったことから、栄養状態の不良が誤嚥性肺炎による入院患者の短期的な生命予後に影響を及ぼすことが示唆された。

さらに本調査では、死亡退院群において入院時の FIM の低値が認められ、ADL が生命予後と関連していることが示唆された。先行研究でも、急性期病院に誤嚥性肺炎で入院した患者の退院時転帰に、入院時の ADL が関連することが報告されている<sup>28)</sup>。また、ADL と摂食嚥下機能の低下は、誤嚥性肺炎の発症に影響する因子とされている<sup>29)</sup>。ADL は摂食嚥下機能に影響を及ぼし、とくに座位能力の獲得は、体幹と頭頸部を安定させ、摂食嚥下運動に有利に働くと考えられている<sup>30)</sup>。本調査において、死亡退院患者の入院時の FIM は有意に低く、摂食嚥下機能に悪影響を与えた可能性が考えられる。そのため、誤嚥性肺炎患者に対しては、摂食嚥下リハビリテーションに加えて、早期から ADL の改善のために理学療法および作業療法も行う必要があると考えられる。

本研究で行ったロジスティック回帰分析の結果では、栄養状態、ADL、経口摂取能力を調整しても口腔内細菌レベルに有意な関連性が認められた。そのため、口腔内細菌数が死亡退院のリスク因子となることが示唆された。過去に Yoneyama ら<sup>31)</sup>が行った高齢者施設での介入研究において、専門的口腔ケアを行った群で発熱や肺炎発症率が有意に減少したことが報告された。それ以降、我が国では専門的な口腔ケアを行うことが肺炎予防に効果的であることが一般的に知られるようになった。その後、要介護者の口腔内ブランクの 66% に肺炎起因菌が検出されたという報告や肺炎により禁食対応となった患者の口腔内からは肺炎起因菌の *Pseudomonas aeruginosa* が高い頻度で検出されたことが報告された<sup>32, 33)</sup>。さらに、歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella intermedia* の産生したタンパク質分解酵素が咽頭粘膜のウイルスレセプターを露出させることで、呼吸器感染症を引き起こす可能性があることが報告されており<sup>34)</sup>、近年では口腔内細菌が肺炎の原因になると考えられている。板橋<sup>35)</sup>は、誤嚥性肺炎を発症した高齢者には嚥下機能の低下が根底にあり、肺炎発症後も微量の誤嚥 (microaspiration) を繰り返す症例で予後不良になりやすいと述べている。また、Kikuchi ら<sup>36)</sup>は、肺炎に罹患した高齢者の 71% が睡眠中に不顕性誤嚥を繰り返していたことを報告している。本研究において、入院中に死亡した患者は嚥下機能の低下に加えて口腔内細菌が多いという特徴があったことから、口腔内細菌の microaspiration を繰り返したことで生命予後に影響した

可能性が考えられる。調査を行った病院では、経口摂取の有無や全身状態にかかわらず、自力清掃困難な患者に対して看護師が 1 日 3 回の口腔ケアを行っているが、生存退院群と死亡退院群で口腔内細菌レベルに有意な差が認められた。これまでに、ADL や嚥下機能が低下している患者では、口腔清掃状態が不良になりやすいことが報告されている<sup>37)</sup>。また、誤嚥性肺炎患者の口腔内細菌と栄養状態との間に有意な関連性があることが報告されている<sup>38)</sup>。つまり、ADL や嚥下機能が低下した患者や栄養状態が不良な患者では、口腔衛生状態も不良になりやすいと考えられる。本研究で用いた細菌カウントは、ベッドサイドで簡便かつ迅速に検査が行えるため、口腔衛生状態を把握するのに有用である。そのため、細菌カウントを活用して定期的に口腔内細菌レベルを評価し、リスクの高い患者には歯科衛生士による専門的口腔ケアを徹底して行うことが必要と考えられる。地域包括ケアを推進する急性期病院の歯科は、誤嚥性肺炎患者の口腔内環境を改善する役割を担うとともに、入院初期から多職種と連携して栄養状態や ADL の維持・回復に注力し、嚥下機能評価のもとリハビリテーションに積極的に介入していくことが重要である。ただし、本調査は急性期病院入院期間内での検討であり、退院後の死亡リスク因子について検討できていない。そのため、誤嚥性肺炎で入院した患者が、転院もしくは退院後にどのような経過をたどるかについては、今後の検討が必要である。

## 結 論

誤嚥性肺炎患者の生命予後に影響する因子を明らかにする目的で、誤嚥性肺炎が原因で入院した患者を生存退院群と死亡退院群に分け、年齢、性別、入院時の FIM、入院日から歯科口腔外科初診日までの期間、入院時の Alb 値と BMI、咬合支持域、口腔乾燥値、口腔内細菌レベル、兵頭スコア、および嚥下グレードを比較した。その結果、以下の結論を得た。

1. Alb と BMI は、死亡退院群は生存退院群に比べて有意に低かった。
2. FIM は、運動項目と認知項目のいずれも死亡退院群は生存退院群に比べて有意に低かった。
3. 口腔内細菌レベルは、生存退院群に比べて死亡退院群が有意に高かった。
4. 嚥下機能を評価した兵頭スコアは、死亡退院群は生存退院群に比べて有意に高く、嚥下グレードは、生存退院群に比べて死亡退院群が有意に低かった。
5. 年齢、性別、基礎疾患の保有割合、入院日から歯科口腔外科初診日までの期間、歯数、咬合支持域、口腔乾燥値には有意差は認められなかった。

以上のことから、誤嚥性肺炎で入院した患者のうち、入院中に亡くなった患者は入院時の栄養状態の不良、ADL の低下、歯科初診時の嚥下機能の低下、口腔内細菌数の増

加といった特徴があり、これらが生命予後に影響する可能性があることが示された。

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始懇篤なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部摂食機能療法学講座の植田耕一郎教授および中山測利准教授に深く感謝の意を表します。あわせて日頃ご助言ご鞭撻頂きました本学部摂食機能療法学講座員各位に深く感謝致します。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

- 厚生労働省. 令和3年(2021)人口動態統計月報年計(概数)の概況. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai21/dl/gaikyouR3.pdf> (2022年11月30日アクセス)
- Teramoto S, Fukuchi Y, Sasaki H, Sato K, Sekizawa K, Matsuse T; Japanese Study Group on Aspiration Pulmonary Disease (2008) High incidence of aspiration pneumonia in community- and hospital-acquired pneumonia in hospitalized patients. A multicenter, prospective study in Japan. *J Am Geriatr Soc* 56, 577-579.
- 藤島一郎, 清水一男 (2002) 口から食べる嚥下障害 Q&A. 第3版, 中央法規出版, 東京, 52-61.
- 藤島一郎, 柴本 勇 (2004) 摂食・嚥下リハビリテーション. 中山書店, 東京, 10-21.
- 聖隷三方原病院嚥下チーム (2001) 嚥下障害ポケットマニュアル. 医歯薬出版, 東京, 25-122.
- 小山珠美 (2005) 経口摂取標準化ガイド. 日総研出版, 名古屋, 127-305.
- 勝田美紗, 平岡 崇, 椿原彰夫 (2008) 摂食・嚥下障害と誤嚥性肺炎. *歯臨研* 5, 29-37.
- 才藤栄一, 植田耕一郎, 出江紳一, 鎌倉やよい, 熊倉勇美, 弘中祥司, 藤島一郎, 松尾浩一郎, 山田好秋 (2016) 摂食嚥下リハビリテーション. 第3版, 医歯薬出版, 東京, 252-256.
- Maeda K, Koga T, Akagi J (2016) Tentative nil per os leads to poor outcomes in older adults with aspiration pneumonia. *Clin Nutr* 35, 1147-1152.
- 坂口紅美子, 原 修一 (2018) 高齢な誤嚥性肺炎患者の生命予後に関連する因子. *日摂食嚥下リハ会誌* 22, 136-144.
- Koyama T, Matsumoto K, Okuno T, Domen K (2005) A new method for predicting functional recovery of stroke patients with hemiplegia; logarithmic modelling. *Clin Rehabil* 19, 779-789.
- 鳥巢哲朗 (2017) 菌の喪失ならびに口腔機能低下が高齢者の健康状態に及ぼす影響. *日補綴歯会誌* 9, 285-290.
- 齊藤美香, 小野由起子, 北村信隆, 山口雅庸, 齊藤 力 (2008) 高齢者の口腔粘膜水分量に関する研究 第1報 口腔水分計の測定精度の評価. *老年歯医* 23, 90-96.
- 大口景子, 大下尚克, 岸本崇史, 金田桂典, 富士谷盛興, 千田 彰 (2013) 歯垢内細菌数測定器の臨床的有用性—口腔の清潔程度の評価—. *日歯保存誌* 56, 588-599.
- 兵頭政光, 西窪加緒里, 弘瀬かほり (2010) 嚥下内視鏡検査におけるスコア評価基準(試案)の作成とその臨床的意義. *日耳鼻* 113, 670-678.
- 藤島一郎, 谷口 洋 (2017) 脳卒中中の摂食・嚥下障害. 第3版, 歯薬出版, 東京, 72.
- 塚谷才明, 小林沙織, 金原寛子, 山本美穂, 長東菜穂, 酒井尚美, 中村さおり, 小林孝行, 兼田美紗子, 牧野桜子, 赤田拓子, 岡部克彦, 小森 岳, 高塚茂行 (2020) 誤嚥性肺炎患者の中長期的生命予後と予後因子. *日摂食嚥下リハ会誌* 24, 247-257.
- 稲次基希, 戸原 玄, 古屋純一, 沼沢祥行, 三木一徳, 泉山肇, 水口俊介, 前原健寿 (2018) 脳卒中急性期から慢性期までの一貫した歯科介入体制構築の試み. *Neurosurg Emerg* 23, 10-16.
- Watanabe Y, Okada K, Kondo M, Matsushita T, Nakazawa S, Yamazaki Y (2020) Oral health for achieving longevity. *Geriatr Gerontol Int* 20, 526-538.
- Nowjack-Raymer RE, Sheiham A (2003) Association of edentulism and diet and nutrition in US adults. *J Dent Res* 82, 123-126.
- Nowjack-Raymer RE, Sheiham A (2007) Numbers of natural teeth, diet, and nutritional status in US adults. *J Dent Res* 86, 1171-1175.
- Sahyoun NR, Lin CL, Krall E (2003) Nutritional status of the older adult is associated with dentition status. *J Am Diet Assoc* 103, 61-66.
- Ervin RB, Dye BA (2009) The effect of functional dentition on Healthy Eating Index scores and nutrient intakes in a nationally representative sample of older adults. *J Public Health Dent* 69, 207-216.
- Senoo S, Iwasaki M, Kimura Y, Kakuta S, Masaki C, Wada T, Sakamoto R, Ishimoto Y, Fujisawa M, Okumiya K, Ansai T, Matsubayashi K, Hosokawa R (2020) Combined effect of poor appetite and low masticatory function on sarcopenia in community-dwelling Japanese adults aged  $\geq 75$  years: A 3-year cohort study. *J Oral Rehabil* 47, 643-650.
- 寺田 泉, 松山美和, 山田博英, 大野友久 (2020) 緩和ケア受療がん患者の生命予後予測と口腔内状況. *老年歯医* 35, 75-82.
- 福島洋介, 依田哲也, 荒木隆一郎, 堀 直子, 古株彰一郎, 坂田康彰, 小林明男 (2009) 健常者における口腔粘膜湿潤度の時間的変動に関する実験的検討. *日口腔粘膜会誌* 15, 15-21.
- 本田一陽, 桜井 誠, 千田圭二, 阿部憲男, 清水 博 (2002) 高齢者肺炎の重症化・難治化に関わる臨床要因. *医療* 56, 200-204.
- 千葉佐保子, 小磯秀夫, 三ツ村隆弘, 石渡康夫 (2020) 高齢者における肺炎の予後に対する誤嚥リスクと誤嚥性肺炎治療後の自宅退院不能例に関する因子の検討. *日呼吸ケアリハ会誌* 29, 341-345.
- 三谷有司, 沖 侑大郎, 藤本由香里, 山口卓巳, 山田洋二, 山田亮爾, 岩田優助, 石川 朗 (2019) 医療介護関連肺炎における発症要因と時間解析の検討. *日呼吸ケアリハ会誌* 28, 108-112.
- 若尾 勝, 福光英彦, 田中勇治, 徳村拓哉, 星 虎男 (2014) 座位能力, 摂食嚥下機能および尿失禁の関連性についての検討. *理療科* 29, 377-381.
- Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H (1999) Oral care and pneumonia. *Oral Care Working Group. Lancet* 354, 515.
- 角 保徳, 譽田英喜, 道脇幸博, 砂川光宏, 佐々木俊明 (2003) 要介護高齢者のブランク内の肺炎起炎菌. *老年歯医* 17, 337-341.
- 前田恵利, 中本幸子, 池田 匠, 西村直子, 芦立典子, 平松喜美子 (2011) 高齢在宅療養者の口腔内微生物—経口摂取群と非経口摂取群における検討—. *日看科誌* 31, 34-41.
- 奥田克爾 (2006) *Porphyromonas gingivalis* 感染と歯周病および全身疾患の発症. *化療の領域* 22, 585-596.
- 板橋 繁 (2006) 高齢者の誤嚥性肺炎とその対策. *日摂食嚥下リハ会誌* 10, 193-206.

- 36) Kikuchi R, Watabe N, Konno T, Mishina N, Sekizawa K, Sasaki H (1994) High incidence of silent aspiration in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 251-253.
- 37) Nakayama E, Tohara H, Sato M, Abe K, Kimura M, Watanabe M, Iida M, Ueda K (2020) Relationship between oral intake level and oral health assessment tool scores in the convalescent ward. *J Oral Sci* 63, 79-82.
- 38) 篠原治征, 杉浦 正, 笹谷賀子, 大澤幸治, 堀川直樹 (2017) 急性期病院における誤嚥性肺炎患者の口腔内細菌叢と栄養状態に関する研究. *日静脈経腸栄養会誌* 32, 1334-1339.



## 日本大学歯学会会則

(名称)

第 1 条 本学会の名称は、日本大学歯学会 (Nihon University Society of Dentistry) とし、その事務局を日本大学歯学部に置く。

(目的)

第 2 条 本学会は、歯科医学及びこれに関連する学術領域の進歩を図り、もって国民の健康に寄与することを目的とする。

(事業)

第 3 条 本学会は、次の事業を行う。

- ① 会員の研究成果を発表するため、学術大会を原則として年 1 回開催する
- ② 会員の研究成果を公表するため、機関誌「日大歯学」を発行し、会員に配布する
- ③ 本学会の対象とする学術領域における研究業績に対し表彰を行う。ただし、表彰規定は別に定める
- ④ その他、本学会の目的を達成するために必要な事業を行う

(会員の構成)

第 4 条 本学会は、次の会員で構成する。

- ① 正会員 第 2 条の目的に賛同する個人で、理事会において承認された者（日本大学歯学部の教員、研究講座員、研究生、研究員ならびにポスト・ドクトラル・フェロー等）
- ② 学生会員 第 2 条の目的に賛同する学生で、理事会において承認された者。  
ただし、学生会員に関わる必要事項は別に定める
- ③ 法人会員 第 2 条の目的に賛同し、理事会において承認された法人または団体
- ④ 名誉会員 本学会の活動に特に功労があった理事経験者で、常任理事会で推薦され、理事会において承認された者

(入会の手続き)

第 5 条 本学会に入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、本学会事務局に申し込むものとする。

(退会等の手続き)

第 6 条 会員が退会を希望する場合または会員の姓名、連絡先等の届出事項に変更が生じた場合は、すみやかに本学会事務局に届けるものとする。

2 日本大学大学院歯学研究科の大学院生の在学中の退会は認めない。

3 退会者には、納入済の当該年度会費を返還しない。

(会員資格の喪失)

第 7 条 正会員、学生会員及び法人会員は、次の各号のいずれかに該当する場合は、理事会で審議の上、その資格を取り消すことができる。

- ① 退会届を提出し、受理された場合
- ② 1 年間以上会費を未納した場合
- ③ 第 2 条の本学会の目的に反する行為を行い、本学会の名誉を傷つけた場合

(役員構成)

第 8 条 本学会の運営を円滑にするため、次の役員を置く。

- ① 会長 1 名
- ② 副会長 1 名
- ③ 常任理事 若干名
- ④ 理事 若干名
- ⑤ 監事 若干名
- ⑥ 評議員 若干名
- ⑦ 幹事 若干名

(役員職務)

第 9 条 役員職務は以下の各項による。

- 2 会長は、本学会を代表し、会務を統括する。
- 3 副会長は、会長を補佐し、会長に事故あるときは、その職務を代行する。
- 4 常任理事は、総務、集会、会計、編集の各会務を担当する。
  - ① 総務担当常任理事は、会員の入退会に関する事項、総会ならびに役員会に関する事項、その他、本学会の運営全般に関わる会務を担当する
  - ② 集会担当常任理事は、総会ならびに学術大会の運営に関する会務を担当する
  - ③ 会計担当常任理事は、本学会の予算・決算に関する会務を担当する
  - ④ 編集担当常任理事は、編集委員会を招集し、機関誌「日大歯学」の編集・刊行に関する事項を担当する
- 5 理事は、本学会の会務に関する重要事項を審議する。
- 6 監事は、本学会の各事業および会計を監査する。
- 7 評議員は、理事会から提案された案件について、評議、決定する。
- 8 幹事は、常任理事の担当する会務を補佐する。

(役員の委嘱)

第10条 役員の委嘱は次のとおりとする。

- ① 会長は、歯学部長がこれに当たる
- ② 副会長は、会長が委嘱し、総会において承認する
- ③ 常任理事は、会長が委嘱し、総会において承認する
- ④ 理事は、会長が専任教授に委嘱し、総会において承認する
- ⑤ 監事は、会長が専任教授に委嘱し、総会において承認する
- ⑥ 評議員は、会長が専任教授及び専任准教授、若しくは当該講座の代表1名に委嘱し、総会において承認する
- ⑦ 幹事は会長が委嘱する

(役員任期)

第11条 役員任期は、次のとおりとする。

- ① 会長の任期は、学部長在任期間と同一とする。
- ② 常任理事および監事の任期は1年とする。ただし、副会長、編集担当常任理事および監事については再任を妨げない。
- ③ 会計・集会・総務担当常任理事については、この順序で同一の理事が1年ずつ続けて担当する。任期は最長で計3年とする。
- ④ 理事、評議員、および監事の任期は1年とする。ただし、再任を妨げない。

(会議)

第12条 本学会は第2条の目的を達成するため、次の会議を開催する。

- ① 総会
- ② 役員会
- ③ 編集委員会

(総会・学術大会)

第13条 総会・学術大会は、会長の招集により、年1回5月に開催する。ただし、会長が必要と認めるときは、臨時総会を開催することができる。

(役員会)

第14条 役員会は、常任理事会、理事会及び評議員会とし、第8条に定める役員をもって構成する。

2 常任理事会、理事会及び評議員会は、会長が随時招集し、総務担当常任理事がその議長を務める。

(編集委員会)

第15条 編集委員会は、投稿原稿の査読、雑誌の編集および刊行、投稿規定の作成、その他の機関誌編集に関する業務を担当する。

2 編集委員会は、常設委員会とし、その委員は編集担当常任理事が推薦し、会長が委嘱する。

(経費)

第16条 本学会の経費は、会費、寄付金およびその他の帰属収入をもって支弁する。

(会費)

第17条 会費は、正会員 年額5,000円、学生会員 年額2,000円とし、年度当初に納入する。ただし、研究講座員については入室時に一括して100,000円を納入する。なお、名誉会員の会費は免除する。

2 日本大学口腔科学会の会員は当日会費3,000円をもって、本学会において発表することができる。

(会計)

第18条 本学会の予算・決算は、理事会及び評議員会の議決を経て、総会の承認を得なければならない。

2 本学会の会計年度は、毎年4月1日から翌年3月31日までとする。

(会則の変更)

第19条 この会則を改正する場合は、理事会及び評議員会の議を経て、総会の承認を得なければならない。

附則

改正年月日

昭和32年4月1日	制定	(昭和32年4月1日施行)
平成6年5月22日	一部改正	(平成7年1月1日施行)
平成8年5月26日	改正	(平成8年4月1日施行)
平成13年11月25日	改正	(平成13年11月25日施行)
平成14年5月18日	改正	(平成14年5月18日施行)
平成15年5月18日	改正	(平成15年5月18日施行)
平成16年5月22日	改正	(平成16年5月22日施行)
平成18年5月20日	改正	(平成18年5月20日施行)
平成19年5月19日	改正	(平成19年5月19日施行)
平成22年5月15日	改正	(平成22年5月15日施行)
令和5年5月21日	改正	(令和5年5月21日施行)

# 日本大学歯学会表彰規定

平成 8 年 5 月 26 日制定

令和 4 年 6 月 20 日改正

## 第 1 章 総則

第 1 条 日本大学歯学会会則第 3 条第 3 項に基づく、学術領域における研究業績に対する表彰または奨励（以下選奨という）に関する事項は、この定めによる。

第 2 条 選奨は次のとおりとする。

日本大学歯学会奨励賞（以下奨励賞という）

第 3 条 前条の選奨の候補者を選考するため、選考委員会を置く。

第 4 条 選奨の受賞者は選考委員会の議を経て、理事会において決定する。また、受賞者の所属、氏名、演題名を翌年の総会で公表する。

第 5 条 選奨は副賞を総会その他の適当な機会において贈呈する。

## 第 2 章 日本大学歯学会奨励賞

第 6 条 奨励賞は、優れた若手研究者を育成する目的で、本学会総会・学術大会において優秀な発表を行い、かつ、次の各号に該当する者に授与する。

- ① 選考の時期に本学会員である者
- ② 講演の時期において 35 歳以下の者
- ③ 過去に奨励賞を受賞していない者

第 7 条 奨励賞の受賞者は原則 5 名以内とする。ただし、理事会の議決により受賞者数を変更することができる。

第 8 条 選考の対象となる演題は、表彰の時期の前年の本学会総会・学術大会において発表されたものに限る。

第 9 条 奨励賞は副賞として 20,000 円を贈呈する。

## 第 3 章 選考委員会

第 10 条 第 3 条による選考委員会は、奨励賞選考委員会とする。

第 11 条 奨励賞選考委員会の委員は、会長が理事の中から若干名を指名した後、理事会の承認により決定する。

第 12 条 奨励賞選考委員会は、理事会において選奨の受賞者が決定したときをもって解散する。

## 第 4 章 規定の改正

第 13 条 この規定を改定する場合は、理事会において決定し、総会に報告することとする。

## 附則

この規定は、令和 4 年 4 月 1 日から施行する。

平成 8 年 5 月 26 日制定 平成 8 年 4 月 1 日施行

平成 19 年 5 月 19 日改正 平成 19 年 5 月 19 日施行

平成 22 年 5 月 15 日改正 平成 22 年 5 月 15 日施行

令和 2 年 5 月 7 日改正 令和 2 年 4 月 1 日施行

令和 4 年 6 月 20 日改正 令和 4 年 4 月 1 日施行



# 「日大歯学」投稿の手引き

2022年（令和4年）4月

日 本 大 学 歯 学 会

日大歯学編集委員会

## 「日大歯学」投稿の手引き

日大歯学への投稿にあたっては本誌の投稿規定ならびにこの手引きに従う。

### 1. 論文の形式

- 1) 原著論文は原則として和文と英文の表紙、和文と英文の要旨、本文（緒言、材料および方法、結果あるいは成績、考察、結論）、文献、図（写真）・表の説明文の順とし、表紙から通しページ番号をつける。原著論文以外の総説、症例報告なども、原則としてこれに準ずる。
- 2) 原稿は A4 判用紙を用い、1 頁当たり 40 字×20 行、12 ポイントの文字で印字する。余白は天地左右 25 mm 程度とする。
- 3) 論文の形式は最新号の雑誌を参照すること。

### 2. 倫理規定

- 1) 人（資料・情報を含む）を対象とする臨床研究、疫学研究に関しては「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従ったものでなければならない。研究対象者および患者からインフォームドコンセントを得ていること、また所属機関の倫理委員会の承認を得ていること（承認年月日、承認番号を含む）を明記しなければならない。また、発表資料等から研究対象者が特定されることがないように、匿名化されている情報（特定の個人を識別することができないものであって、対応表が作成されていないものに限る）にするなど、個人情報の保護を徹底すること。
- 2) ヒトゲノムあるいは遺伝子解析に関する研究の場合には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に従ったものでなければならない。研究対象者および患者からインフォームドコンセントを得ていること、また所属機関の倫理委員会の承認を得ていることを明記しなければならない。投稿にあたり被験者全員の同意文書を添付する。また、発表資料等から研究対象者が特定されることがないように、匿名化されている情報（特定の個人を識別することができないものであって、対応表が作成されていないものに限る）にするなど、個人情報の保護を徹底すること。
- 3) 動物を対象とする研究の場合には、「動物の愛護及び管理に関する法律」等を遵守した上で、各研究機関が定めるガイドラインに従って、動物実験等を適正に実施しなければならない。本文中に所属機関および実施機関の動物実験委員会等の承認を得ていること（承認年月日、承認番号を含む）を明記しなければならない。

### 3. 表紙

- 1) 和文表紙には、中央上段から表題、著者氏名、所属機関名、責任著者連絡先、40字以内のランニングタイトルを記載する。
- 2) 英文表紙には、中央上段から表題、著者氏名、所属機関名、責任著者連絡先、10 words以内のランニングタイトルを記載する。
- 3) 表題は、研究の主題を具体的かつ簡潔に表現する。また、論文を数報に分けて発表するときは、その研究の主題の次に内容を具体的に表す副題を付ける。英単語は固有名詞・略語等を除き、小文字で表記する。
- 4) 英文表題は冠詞、前置詞、接続詞などの付属語ならびに慣用の特殊語を除き、単語の先頭文字を大文字、以下を小文字で記す。また、ハイフンでつながる複合語の場合、ハイフンの後は小文字で記す。
- 5) 著者名の表記（旧字、異体字）は著者自身が指定する。また、著者の所属機関が異なる場合は氏名の右肩に数字を付け、所属の左肩にも数字を付ける。指導者が共著者に含まれない場合は（指導： ）として別に表記することができる。英文では（Director(s): ）とする。
- 6) 責任著者連絡先は、和文・英文とも著者1名の氏名、所属機関、住所、TEL、FAX、e-mail を記載する。

### 4. 要旨およびキーワード

- 1) 和文の要旨は、1,000 字以内とし、目的、方法、結果（成績）および結論に分け、各見出しを付ける。最後に、研究の主題を的確に表現するキーワードを5個以内を記載する。
- 2) 英文の Abstract は 400 words 以内とし、Purpose, Methods, Results, Conclusion に分け、各見出しを付ける。最後に Key words 5つ以内を記載する。
- 3) Abstract は投稿者が十分に吟味し、必要に応じて英文校正者（歯科医学の専門知識を有することが望ましい）によるネイティブチェックを受けてから投稿すること。

### 5. 本文

#### 1) 構成

- (1) 本文：原則として緒言、材料および方法、結果、考察、結論の順に記述し、付番はしない。症例報告は原則として緒言、症例の概要、治療内容と経過、考察の順に記述する。各項目の中で付番する場合は 1・2・3……、1)・2)・3) ……、(1)・(2)・(3) ……、①・②・③……、a・b・c……、の順とする
- (2) 緒言：研究の背景や新規性、目的および研究の意義を簡潔に記述する。
- (3) 材料および方法は研究に用いた材料、方法、手順を、同一の方法で追試が行えるように詳細に記述する。製品名、製造者名を原語で示す必要があれば、単語の先頭文字を大文字、以下を小文字とする。原則として、和文による論文では「一般名（製品名、会社名、海外製品は国名）」、英文による論文では「一般名（製品名、会社名）」とする。

名, 都市名, (米国は州名,) 国名)」のように記載する。なお, ®や™などの商標登録表示は不要。

- (4) 結果 (成績) : 客観的事実のみを記述し, 著者の主観を交えたような表現を避ける。図表を含めてわかりやすく示し, 使用する図表は必要最小限にとどめる。
- (5) 考察 : 研究から得られた結果を検討し, 新知見, 問題点, 今後への展開などを明解に述べる。緒言との重複や結果の繰り返しの記載は避ける。
- (6) 結論 : 得られた結論のみを正確かつ簡潔に記述する。

## 2) 表記

- (1) 本文はひらがなまじりの口語文章体 (いわゆる「である体」) とし, 常用漢字, 現代仮名遣いを用いる。代名詞, 接続詞, 副詞, 助動詞などは仮名書きとする。
- (2) 和文では, 句読点にはカンマ (,) とマル (。) を使用する。英文では, カンマ (,) とピリオド (.) を使用する。

## 3) 用語・単位等

- (1) 学術用語は「文部省 学術用語集 歯学編 (増訂版)」および各学会制定の用語を使用する。数字はアラビア数字 (算用数字) を用いる。ただし, 数字を含む名詞などは漢字とする。  
例) 十二指腸, 二次元, 第一大臼歯
- (2) 単位は原則として国際単位系 (SI) を使用する。
- (3) 外国語の人名は, 姓のみを記す。
- (4) 国名および地名は本文中では原則としてカタカナ, 文献欄では原綴のままとする。外国語の書名は日本語に訳さず, 原綴のままとする。
- (5) 学名二名法の場合は, 属名の単語の先頭文字を大文字, 以下を小文字とし, イタリックで記す。たびたび使用する場合は, 2 回目以後では属名を省略し, 単語の先頭文字で表してさしつかえない。  
例) *Streptococcus mutans* → *S. mutans*

## 4) 謝辞, その他の特記事項および利益相反

- (1) 研究補助金についての記載, 謝辞およびその他の特記事項は結論の末尾に付記する。
- (2) 利益相反 (COI) 状態が存在する場合, 文献の前に利益相反と項目立てその旨を記載する。COIがない場合も「本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。」などと記載する。

## 5) 英文による論文

英文による論文には, 英文校正者 (歯科医学の専門知識を有することが望ましい) によるネイティブチェックを受けたことを示す英文校正証明書を添付する (書式は問わない)。

## 6. 文献

- 1) 文献は本文中の引用箇所にも右肩上付きで引用番号を付け, 引用順に本文末尾に所定の形式で記載する。
- 2) 複数の文献をまとめて同一箇所に引用する場合は, 年代の古い順に記載する。
- 3) やむを得ず, 学会発表の抄録などを引用する場合は末尾に (抄録), 発行前の雑誌論文を引用する場合は (印刷中), また英文の場合には (in press) と明記する。
- 4) 本文中の文献呼び出しは, 片括弧で, 文の右肩に付す。2 つ引用する場合は 「,」 で, 3 つ以上の場合には 「-」 でつなぐ。  
例 : 「著者ら<sup>3)</sup> は」 「～ことが報告されている<sup>7,8)</sup>」 「過去の研究<sup>10-15)</sup> では」

<雑誌> 著者 (発行年) 表題. 掲載誌巻, ページ.

- 1) 小川麻衣, 高橋康代, 伏木怜奈, 堀貫恵利, 馬谷原琴枝, 清水典佳 (2016) 日本大学附属歯科病院歯科矯正科における実態調査 - 来院患者数およびその分布について -. 日大歯学90, 53-60.
- 2) Kurokawa H, Takamizawa T, Rikuta A, Tsubota K, Miyazaki M (2015) Three-year clinical evaluation of posterior composite restorations placed with a single-step self-etch adhesive. J Oral Sci 57, 101-108.

<単行本>

著者 (発行年) 書名. 巻, 版, 出版社, 出版地, ページ.

分担執筆者 (発行年) 分担執筆表題, 書名, 巻, 版, 編者または監修者, 出版社, 出版地, ページ.

- 1) 矢田純一 (1997) 医系免疫学. 改訂5 版, 中外医学社, 東京, 236-263.
- 2) 宮崎真至 (2015) MIの理念と接着. 接着歯学. 2版, 日本接着歯学会編, 医歯薬出版, 東京, 4-5.
- 3) Clark WG, Brater DC, Johnson AR (1992) Goth's medical pharmacology. 13th ed, Mosby, St Louis, 584-591.
- 4) Kaugars G (1991) Benign fibro-osseous lesions. In Oral & Maxillofacial Radiology. Miles DA, Kaugars GE, Van Dis M, Lovas JGL eds, Saunders, Philadelphia, 125-153.

<翻訳書>

原著者 (原綴りで) (原書の出版年) 原書名巻, 原書の版, 原書の出版社, 原書の出版地 : 翻訳者名  
訳 (出版年) 翻訳書名翻訳書の巻または版, 翻訳書の出版社, 出版地, ページ.

- 1) White GE (1993) Osseointegrated dental technology. Quintessence, London: 前田芳信訳 (1995) ホワイトのインプラント上部構造. クインテッセンス出版, 東京, 47-60.

その他の記述形式

<電子ジャーナル>

原則として通常の雑誌論文と同様とするが、通巻ページが不明な場合はDOIなどを明記する。

- 1) Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Watanabe H, Johnson WW, Latta MA, Miyazaki M (2016) Influence of duration of phosphoric acid pre-etching on bond durability of universal adhesives and surface free-energy characteristics of enamel. Eur J Oral Sci, doi: 10.1111/eos.12284.

<インターネットウェブサイト>

発行元, 記事名, ウェブサイトアドレス (アクセス日).

- 1) 厚生労働省. 平成23年歯科疾患実態調査現在歯数および1人平均値歯種・年齢別 (5歳以上・永久歯). <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-17c23-1.pdf> (2012年12月20日アクセス)

## 7. 図 (写真) および表

- 1) 図 (写真) および表は本文と別にし、図の場合は下方に、表の場合は上方にそれぞれ図表番号 (例: 図1, Fig. 表1, Table 1) と表題を付記し、別に説明文 (英文でも可) を作成する。
- 2) 図 (写真) および表はそのまま製版できるように鮮明なものを用意し、縮小率を指定する。図をカラー印刷希望の場合にはカラーデータを、モノクロ印刷希望の場合にはモノクロデータを添付する。また、データ形式は可能な限りjpgとし、画像サイズはレイアウトに対応する大きさとする。画面解像度については写真の場合 300 dpi 以上、線画の場合1,200 dpi 以上にする。
- 3) 図中に挿入する文字などは縮刷後も判読できる大きさと記入し、判読できるよう注意する。
- 4) 顕微鏡写真および被写体の大きさを明示する必要がある場合はスケールを写真に入れる。
- 5) 個人の顔写真を掲載する場合は「目隠し」を施すなど、その人物が特定できないよう配慮する。

## 8. ファイル作成上の注意

- 1) 英字・数字 (英文中の「,」「.」を含む) はすべて半角, 漢字・仮名・句読点は全角で入力する。
- 2) 本文中の数字と単位記号 (°C「%」は除く) の間は半角分のスペースを空ける。
- 3) 図表データを添付する場合は、作成に際して用いたソフト名およびバージョンを記載する。
- 4) ファイルを分割して作成した場合は原稿の記載順に、ファイル名に連番を付ける。

## 9. 投稿原稿の送付

### ・原稿と電子記録媒体による投稿の場合

- 1) 投稿原稿は投稿申込用紙等, 表紙, 要旨, 本文, 文献の順に重ね, 表紙から通しページ番号をつける。
- 2) 図および表は番号順に重ね, それぞれ別に綴じる。
- 3) 投稿論文はオリジナルを1部 (図, 表, 写真を含む) 送付する。写真については原図とする。
- 4) 送付にあたっては図, 表, 写真, F電子記録媒体を損傷しないように十分に注意する。
- 5) 投稿原稿は学会事務局へ提出あるいは郵送する。
- 6) 掲載された投稿原稿は返却しない。

### ・電子投稿 (e-mail) による場合

- 1) 原稿 (表紙, 要旨, 本文, 文献) は, Microsoft Office Word (以下 Word) 形式とする。
- 2) 図は, jpg または pdf 形式とする。
- 3) 表は, Microsoft Office Excelまたは Word 形式とする。
- 4) ファイル名は, 和文で「著者名」\_「講座名」\_「原稿・図・表・投稿申込用紙」\_そしてファイル種類を表す「拡張子」とする。例) 日大太郎\_歯科保存学I\_原稿.doc
- 5) e-mail の件名 (Subject) は, 日大歯学投稿論文とする。
- 6) pdf 形式にした投稿申込用紙, 確認書, チェックリスト, 承諾書, そして投稿原稿と図および表 (英文による論文では英文校正証明書) は日大歯学編集委員会の e-mail アドレス (de.shigakukai@nihon-u.ac.jp) に送付する。

### ・投稿申込用紙, 確認書, チェックリスト, 承諾書は, 日本大学歯学会のHP「日大歯学」からダウンロードしてください。



種類	○原著	・学位論文 <sup>1</sup> (主論文) ・「 (総括論文) ・副論文 ・上記以外	○総説 ○症例 ○その他
表題			
著者(共著者もすべて会員であること)			
所属			
投稿・校正責任者 〒	氏名	TEL ( ) FAX ( ) E-mail	印
請求書送付先 〒	氏名	TEL ( ) FAX ( ) E-mail	

**【提出物】**

本文	枚	図表のファイル形式(jpg)等	
図表(カラー)	枚	図表(白黒)	枚
確認書	枚	チェックリスト	枚

**【提出方法】**

原稿と電子記録媒体	
電子投稿(E-mail)	

**【掲載証明書】**

要 ・ 不要
--------

どちらかに○をつけてください

**【学位論文の場合】**

学位論文は予備審査終了後に受け付けます。また、研究科分科委員会の審査終了後、修正があれば直ちに再提出をお願いいたします。学位論文に係る以下の日付をご記入ください。

予備審査終了日 年 月 日  
 研究科分科委員会書類受理日 年 月 日  
 研究科分科委員会審査予定日 年 月 日

\*\*\* \*\* 以下は事務局で使用します \*\*\* \*\*

受付日	年 月 日	受付番号	N —	会費納入状況
掲載予定	巻 号	備考		

日大歯学編集委員会 御中

確 認 書

「日大歯学」への投稿に際して、以下の内容に関して間違いがないことを証明するとともに、申告内容に虚偽があった場合には、いかなる責任をも負うことを確認いたします。

1. 人を対象とする臨床研究，疫学研究に関しては「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に従ったものであること。研究対象者および患者からインフォームドコンセントを得ていること，また所属機関の倫理委員会の承認を得ていること（承認年月日，承認番号を含む）を明記すること。投稿にあたり被験者全員の同意文書を添付し，発表資料等から研究対象者が特定されないことがないように，特定の個人を識別することができないように個人情報的加工し，復元できないようにするなど，個人情報の保護を徹底すること。
2. ヒトゲノムあるいは遺伝子解析に関する研究の場合には，「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に従ったものであること。研究対象者および患者からインフォームドコンセントを得るとともに，所属機関の倫理委員会の承認を得ていることを明記すること。投稿にあたり被験者全員の同意文書を添付するとともに，発表資料等から研究対象者が特定されないことがないように，特定の個人を識別することができないように個人情報加工し，復元できないようにするなど，個人情報の保護を徹底していること。
3. 動物を対象とする研究の場合には，「動物の愛護及び管理に関する法律」等を遵守した上で，各研究機関が定めるガイドラインに従って，動物実験等を適正に実施していること。本文中に所属機関及び実施機関の動物実験委員会等の承認を得ていること（承認年月日，承認番号を含む）を明記すること。
4. 本論文はオリジナルであること，他の機関の著作権（著作財産権 copyright）も侵害しないこと，全著者が本投稿最終原稿を読み，投稿への承認を得ていること。
5. 利益相反の有無を本文の最後に明記すること。利益相反のある場合には，関係した企業・団体名と具体的内容も明記すること（筆頭著者・共著者，全員が対象）。

論 文 表 題：

年 月 日

筆頭著者氏名：

印

## チェックリスト

投稿原稿が投稿規定、投稿の手引きに沿ったものであるかを確認のうえ、左欄に「レ」印を入れて下さい。

### 投稿者チェック

- 著者はすべて本学会員で、年会費は納入していますか。
- 他誌に未発表・未掲載ですか。
- 表題、著者氏名、所属機関を記載していますか。
- ランニングタイトルを記載していますか（和文40字、英文10word以内）。
- 著者連絡先は明記されていますか。
- 和文要旨（1,000字以内）を添付していますか。
- 英文Abstract（400word以内）を添付していますか。
- キーワード（5個以内）を付記していますか。
- A4版用紙に1頁当たり40字×20行、12ポイントの文字で印刷されていますか。
- 原稿には表紙から通しでページ番号がはいっていますか。
- 図（写真）および表はA4用紙を用い、縮小率が指定されていますか。
- 図（写真）および表には、図の場合は下方に、表の場合は上方にそれぞれ図表番号（例：図1, Fig 1, 表1, Table 1）と表題を付記し、別に説明文をつけていますか。
- 文献の表記は規定に沿って、引用順に記載されていますか。

論文表題：

年 月 日

筆頭著者氏名：

印





## 掲載論文の複写複製および転載複製について

日本大学歯学会では、複写複製および転載複製に係る著作権を学術著作権協会に委託しています。

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、同協会より許諾を受けて複写して下さい。但し（社）日本複写権センター（同協会より権利を再委託）と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません。（社外頒布用の複写は許諾が必要です。）

権利委託先：（中法）学術著作権協会

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル

電話（03）3475-5618 FAX（03）3475-5619

E-mail：[info@jaacc.jp](mailto:info@jaacc.jp)

なお、著作物の転載・翻訳のような、複写以外の許諾は、学術著作権協会では扱っていませんので、直接発行団体へご連絡ください。

また、アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は、次の団体に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

TEL：1-978-750-8400 FAX：1-978-646-8600

以 上

Nihon University Dental Journal authorized Japan Academic Association For Copyright Clearance (JAC) to license our reproduction rights and reuse rights of copyrighted works. If you wish to obtain permissions of these rights in the countries or regions outside Japan, please refer to the homepage of JAC (<http://www.jaacc.org/en/>) and confirm appropriate organizations.

You may reuse a content for non-commercial use, however please contact us directly to obtain the permission for the reuse content in advance.

Japan Academic Association For Copyright Clearance (JAC)  
Nogizaka Bldg.2F 9-6-41, Akasaka, Minato-Ku, Tokyo 107-0052, Japan  
TEL : 81-3-3475-5618 FAX : 81-3-3475-5619  
E-mail : [info@jaacc.jp](mailto:info@jaacc.jp)

Please note that JAC does not deal with licenses other than copying and re-using, such as translations of copyrighted works. Please contact the issuing organization directly.

If you would like a copy of this journal in the United States, please contact the following organizations.

Copyright Clearance Center, Inc.  
222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA  
TEL : 1-978-750-8400 FAX : 1-978-646-8600

## 日大歯学編集委員会

委員長	宮崎真至	
副委員長	高橋富久	
委員	米山隆之	鈴木直人
	本吉 満	武市 収
	今井健一	池田貴之
	近藤真啓	
幹事	佐藤安希	

日大歯学 第 97 卷 第 1 号

令和 5 年 6 月 30 日 発行

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/nusdj/>

編集兼発行人 本田 和也  
発行所 日本大学歯学会  
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13  
日本大学歯学部内  
事務所 日本大学歯学部研究事務課  
電話 03 (3219) 8060  
印刷所 ヨシダ印刷株式会社  
〒130-0014 東京都墨田区亀沢 3-20-14  
電話 03 (3626) 1301



NEO DENTAL CHEMICAL  
PRODUCTS CO., LTD.



カタログ PDF



添付文書 PDF

**NEW**

覆髄+裏層 2in1

素材の品質も  
性能の一部です。

1本で覆髄から裏層まで！

DirectCapping+BaseLiner CAVIOS with MTA

- 1本で直接覆髄から裏層まで
- デンティンブリッジ形成促進
- ALP活性に最適なpH
- HAPによるマイクロシール効果
- ネオホワイトピュア® 配合

ALP：アルカリフォスファターゼ  
HAP：ハイドロキシアパタイト



高い操作性を有するキャビオスがMTA系製材として生まれかわりました。スムーズで切れが良く、歯質へのなじみが高いペーストに、MTA系成分「ネオホワイトピュア®」を配合。MTAの効果発現を促す新処方により光重合裏層材としての工学的性質に加え、直接覆髄材としての性能を獲得しました。1本で覆髄にも裏層にも使える2in1製材です。

MTA系覆髄+裏層材

**D-Cavios® MTA**

ネオホワイトピュア® 配合

1.5g入シリンジ 1本  
先端チップ 15本  
標準価格 6,500円

**D-キャビオス®MTA**

医療機器認証番号 304ADBZX00054000  
歯科用覆髄材料(歯科裏層用高分子系材料)  
管理医療機器

製造販売業者



ネオ製薬工業株式会社

〒150-0012 東京都渋谷区広尾3丁目1番3号  
Tel. 03-3400-3768(代) Fax. 03-3499-0613

「ネオホワイトピュア」は太平洋セメント株式会社の登録商標第 6125963 号です。





# 松風歯科クラブ Dentist Circle

デンティストサークル

# 2023年度 会員募集

会期 2023.4/1~2024.3/31

年会費 8,000円(税別) 提供製品代 6,500円分含む



## デンティストサークル会員特典



### セミナーの受講料優待

セミナー + 入会  
同時申込で、受講料が  
会員優待価格に!



お申込みはこちらから

1. セミナーを検索
2. 「申込」を選択
3. 「歯科クラブに入会してセミナーを申込み」を選択

- タイムリーに情報をお届けし、特典のバックナンバーも活用できる

### 会員専用アプリ & サイト

- 無料または会員優待価格で受講できるセミナー
- いつでも見られるオンデマンド配信
- 製品を特別優待価格でお買い求めいただける特別優待券
- 臨床に役立つ製品やグッズのお届け

- 臨床術式や技工テクニックをわかりやすく解説した「Dental echo」
- 会員様インタビューや製品情報満載の情報誌「ha・ha・ha」
- 注目分野をオールカラーで展開する書籍「COLOR ATLAS」
- 松風がオリジナルで企画・制作するお役立ちツール
- 2024年版卓上カレンダー
- 松風総合カタログ(2023-2024版)

会員特典の一部を「スペシャルサイト」でご覧いただけます。



見て、  
読んで、  
使って、  
納得!



ここから  
今すぐCheck!



世界の歯科医療に貢献する

株式会社 松風

●本社:〒605-0983京都市東山区福福上高松町11 お客様サポート窓口(075)778-5482 受付時間8:30~12:00 12:45~17:00(土日祝除く) [www.shofu.co.jp](http://www.shofu.co.jp)  
●支社:東京(03)3832-4366 ●営業所:札幌(011)232-1114/仙台(022)713-9301/名古屋(052)709-7688/京都(075)757-6968/大阪(06)6330-4182/福岡(092)472-7595

EOM

和  
なごみ

GC



歯科診療に、  
目に見える安心を。

EOM のさらなる進化  
イオム 和 専用サイト



発売元 株式会社 ジーシー / 製造販売元 株式会社 ジーシー  
東京都文京区本郷3丁目2番14号 東京都板橋区蓮沼町76番1号

歯科用ユニット イオム ナゴミ 管理医療機器 特定保守管理医療機器 304AKBZX00059000

カスタマーサービスセンター お客様窓口 ☎ 0120-416480 受付時間 9:00a.m.~5:00p.m. (土曜日、日曜日、祝日を除く) <https://www.gc.dental/japan/>  
支店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333 営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)207-3370 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286  
※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。

※掲載の情報は2022年4月現在のものです。※製品の仕様および外観は、改良のため予告なく変更することがありますので、予めご了承ください。※写真には一部オプションを含む場合があります。詳しくは装備一覧表をご覧ください。

# 日大歯学投稿規定

平成26年12月24日制定

令和5年4月14日施行

## 1. 本誌

本誌は、研究成果の論文発表による発信を通して、歯科医学の発展に寄与することを目的として、日本大学歯学会が発行する学術雑誌である。

## 2. 投稿資格

本誌へ投稿する著者（共著者も含む）は、原則として日本大学歯学会の会員に限る。ただし、日大歯学編集委員会（以下、編集委員会という）が特に認めたものはこの限りではない。

## 3. 投稿論文の種類

原著論文、総説、症例・臨床報告およびその他とし、過去に他誌に掲載のもの、あるいは投稿予定の無いものに限る。ただし、編集委員会が認めた場合はこの限りではない。編集委員会は総説論文等（総説、報告、研究紹介、学会報告、招待論文、特許、社会活動、臨床ノート、フォーラム）の投稿を依頼することができる。

## 4. 倫理的配慮

投稿論文は、ヒトを対象とする場合はヘルシンキ宣言（以後の改定、補足事項を含む）およびその他の倫理規定を遵守し、動物実験は関係法令や基本指針等を踏まえ、動物実験等の具体的な実施方法を定めた研究機関内規定に基づいて倫理的に行われたものでなければならない。

## 5. 利益相反

論文の内容に関する利益相反をすべて申告すること。

## 6. 投稿論文の採否

投稿論文の査読後、その採否および掲載順序を編集委員会が決定する。なお、編集委員会は文意に変化を来さない範囲において字句の改訂を行うことができる。

## 7. 投稿論文の形式

投稿論文の作成にあたっては、「投稿の手引き」に従いA4判横書きで作成し、表紙から文献まで通しページをつける。原著論文の形式は、原則として要旨、緒言、材料および方法、結果あるいは成績、考察、結論、文献の順に記載する。原著論文以外の論文も、原則としてこれに準ずる。

## 8. 校正

著者による校正は、原則再校までとする。その際には、字句の著しい変更、追加あるいは削除などは認めない。

## 9. 著作権

本誌に掲載された論文、抄録などの著作権は日本大学歯学会に帰属する。

## 10. 掲載料

著者は掲載料を負担する。編集委員会から依頼する原稿についてはこれを除く。

## 11. 規定にない事項

この規定にない事項は、別に編集委員会で決定する。

## 12. 投稿論文の送付先

所定の投稿申込用紙に必要事項を記入のうえ、下記へ送付する。

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

日本大学歯学部研究事務課気付

日大歯学編集委員会

TEL：03-3219-8060, FAX：03-3219-8324

E-mail：[de.shigakukai@nihon-u.ac.jp](mailto:de.shigakukai@nihon-u.ac.jp)（日本大学歯学会専用のアドレス）



# Nihon University Dental Journal

Vol. 97 No. 1 June 2023

## 原 著

日本大学歯学部附属歯科病院における最近5年間の患者動向とアンカースクリュー使用状況について	増 山 萌 子ほか	1
Propiece IL-1 $\alpha$ の核内への輸送機構と核内機能	石 山 雄 一	7
IL-1 receptor type 2による細胞内pIL-1 $\alpha$ の細胞外分泌抑制	定 村 正 之	12
高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響	清 水 なつ生	18
ヒト線維芽細胞HeLa におけるinterleukin-1 receptor type 2のdecoy receptorとしての機能	花 山 真知子	27
MeCP2変異ヒト歯髄細胞およびMeCP2欠損マウス 迷走神経背側運動核ニューロンについての免疫組織化学的研究	星 ま な み	33
急性期病院における誤嚥性肺炎患者の生命予後に関連する因子について	渡 邊 真 央	42

日本大学歯学会会則

日本大学歯学会表彰規定

「日大歯学」投稿の手引き 一投稿申込用紙, 確認書, チェックリスト, 承諾書一



NIHON UNIVERSITY SOCIETY OF DENTISTRY

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/nusdj/zasshi/j-zas00.html>