Tokyo Medical and Dental University
Global Center of Excellence (GCOE) Program
International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

東京医科歯科大学　グローバルCOEプログラム

歯と骨の分子疾患科学
国際教育研究拠点

平成22年度 実績報告書

東京医科歯科大学

ご挨拶

東京医科歯科大学は、大山喬史学長のリーダーシップのもと、グローバルCOEプログラムとして「歯と骨の分子疾患科学の国際研究教育拠点」の活動を推進し、平成20年度より22年度までの3年間の教育研究活動を展開して参りました。平成22年度は中間点にあたり、文部科学省により平成20年度採択のグローバルCOEプログラムの中間評価が行われました。その結果、本拠点は、医学系の拠点の中で評価段階の最高レベルである「現行の努力を継続することによって、当初目的を達成することが可能と判断される」の12拠点となり、さらにその中でも優れた拠点として選ばれた2件のうちの一つとして、文部科学省のHP等に紹介されました。その活動の中核として、国際的に優れた、若手研究者として選抜した国際PIシャペロンの育成と共に、特にトップ20%レベルの大学院生をAISSとして、複数の教授による英語のインタビューの基に競争的に選抜し、毎年、評価ならびにアドバイスを行うシステムによる育成及び、毎週行われる事業推進担当者の教授の世界最先端のサイエンスについての教育を行う国際総合プレゼンテーション等により、持続的かつ発展的に大学院教育研究を推進しております。選抜大学院生（AISS）に対しては海外のトップ拠点校における教育を行うシステムを機能させており、更には、歯と骨に関わる臨床及び基礎の海外の著名研究者による講演会とこれらの研究者による大学院生への直接的国際教育等（3年間に47回）や国際シンポジウム（3年間に7回）が行われています。また、国際総合プレゼンテーション（3年間に73回、参加者総数4800人）を含め、学部や研究所の枠を超えた融合的な環境において、国際的に発展する若手を育成する活動が展開されております。特に、大学院学生が教授等に対する評価を毎週行うことや、英語に基づくレクチャーとその後に行われる活発な討論により相方向の活動がなされています。さらには、競争的な研究費の申請による若手研究者の訓練を行い、既に複数の本グローバルCOEの若手研究者（国際PIシャペロン）が、“さきがけ”の研究費を獲得し、大学院生も多数の国際的な受賞を得て発展しております。ハーバード大学歯学部、カリフォルニア大学サンフランシスコ校歯学部、医学部、トロント大学歯学部との連携に基づく海外の大学における先端的な大学院生の発表会への参加を行うと共に現地の国際的にトップの立場にある研究者が本グローバルCOEのチューターとして本学大学院生に対する教育研究に参加し、また新たにヨーロッパのエコールノルマル等を含む研究者との相互交流にも発展しつつあります。

このような、今日までのグローバルCOEの活動は大山喬史学長のリーダーシップの基に、教育研究の国際的活動ならびに本グローバルCOEにおける若手育成をそれぞれ担当される事業推進担当者の熱意とご尽力の賜であり、本プログラムの更なる発展に期待しております。

野田　政樹
Masaki Noda

東京医科歯科大学

平成22年度

グローバルCOEプログラム実績報告書

歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

専攻等名

医歯学総合研究科器官システム制御学系専攻・口腔機能再構築学系専攻・生体支持組織学系専攻
顎顔面頸部機能再建学系専攻・先端医療開発学系専攻・生体環境応答学系専攻・疾病生命科学研究部
生体材料工学研究所・難治疾患研究所

野 田　政 樹 Masaki Noda
拠点リーダー/医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻・教授
分子薬理学/医学博士・歯学博士

拠点形成統括および先端硬組織分子再建科学の研究

田 上　順 次 Junji Tagami
医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻・教授
齲蝕制御学/歯学博士

先端硬組織分子再建科学

高 柳　広 Hiroshi Takayanagi
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授
分子情報伝達学/医学博士

硬組織分子喪失病態学

森 田　育 男 Ikuo Morita
医歯学総合研究科・顎顔面頸部機能再建学系専攻・教授
分子細胞機能学/薬学博士

先端硬組織分子再建科学

小 村　健 Ken Omura
医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻・教授
口腔機能再建学/医学博士

硬組織疾患ゲノム科学

春 日 井　昇 平 Shohei Kasugai
医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻・教授
摂食機能制御学／歯学博士

先端硬組織分子再建科学

須 田　英 明 Hideaki Suda
医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻・教授
歯髄生物学／歯学博士

先端硬組織分子再建科学

和泉　雄一 Yuichi　Izumi
医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻・教授
歯周病学／歯学博士

硬組織分子喪失病態学

柳 下　正 樹 Masaki Yanagisita
医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻・教授
硬組織病態制御学 ／医学士

先端硬組織分子再建科学

山 口　朗 Akira Yamaguchi
医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻・教授
口腔病理学／医学博士

先端硬組織分子再建科学

森 山　啓 司 Keiji Moriyama
医歯学総合研究科・顎顔面頚部機能再構築学系専攻・教授
顎顔面矯正学／医学博士

硬組織分子喪失病態学

四 宮　謙 一 Kenichi Shinomiya
医歯学総合研究科・先端医療開発学系専攻・教授
脊椎・脊髄神経外科学／医学博士

先端硬組織分子再建科学

宮 坂　信 之 Nobuyuki Miyasaka
医歯学総合研究科・生体環境応答学系専攻・教授
臨床免疫学／医学博士

硬組織分子喪失病態学

宗 田　大 Takeshi Muneta
医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻・教授
運動機能再建学／医学博士

先端硬組織分子再建科学

秋 吉　一 成 Kazunari Akiyoshi
生体材料工学研究所・素材研究部門・教授
有機材料学／工学博士

先端硬組織分子再建科学

稲 澤　譲 治 Johji Inazawa
難治疾患研究所・遺伝疾患研究部門・教授
分子細胞遺伝学／医学博士

硬組織疾患ゲノム科学

三 木　義 男 Yoshio Miki
難治疾患研究所・遺伝疾患研究部門・教授
遺伝子応用医学／医学博士

硬組織疾患ゲノム科学

石 野　史 敏 Fumitoshi Ishino
教授
分子生物学／理学博士

硬組織疾患ゲノム科学

澁 谷　浩 司 Hiroshi Shibuya
医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻・教授
細胞機能調節学／理学博士

硬組織基礎生命科学

小 川　佳 宏 Yoshihiro Ogawa
医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻・教授
内分泌学／医学博士

硬組織基礎生命科学

萩 原　正 敏 Masatoshi Hagiwara
疾患生命科学研究部・高次生命制御研究部門・教授
形質発現制御学／医学博士

硬組織基礎生命科学

水島　昇 Noboru　Mizushima
医歯学総合研究科・教授
細胞生理学／医学博士

細胞生理学分野

中川 一路 Ichiro　Nakagawa
医歯学総合研究科・教授
細菌感染制御学

細菌感染制御学分野

国際PIシャペロン、AISS・QAISS

Takuya Notomi, Ph.D.
（納富拓也）
Research Assistant Professor
Department of Molecular Pharmacology

Alireza Sadr, D.D.S., Ph.D.
Research Assistant Professor
Department of Cariology and Operative Dentistry

Masatsugu Oh-hora, M.D., Ph.D.
（大洞将嗣）
Research Associate Professor
Department ofCell Signaling

Hiroyuki Nakamura, D.D.S., Ph.D.
（中村博幸）
Research Assistant Professor
Department of Hard Tissue Engineering Biochemistry

Iimura Tadahiro, D.D.S., Ph.D.
（飯村忠浩）
Research Associate Professor
Department of Oral Pathology

Naoto Haruyama, D.D.S., Ph.D.
（春山　直人）
Research Associate Professor
Department of Maxillofacial Orthognathics

Hideyuki Iwai, M.D., Ph.D.
（岩井秀之）
Research Assistant Professor
Department of Medicine & Rheumatology

Kunikazu Tsuji, M.D., Ph.D.
（辻邦和）
Research Assistant Professor
Department of Orthopedic Surgery

Lee Jiyoung, Ph.D.
（李知英）
Research Assistant Professor
Department of Epigenetics

Naoki Sawada, M.D., Ph.D.
（澤田直樹）
Research Assistant Professor
Department of Molecular Medicine and Metabolism

Patricia Makishi
Dept. of Cariology and Operative Dentistry
「レジンセメントと象牙質界面における
ナノリーケージについて」

許　ジン
（Xu Jing）
歯髄生物学
視床下部性神経ペプチドによる
中枢性骨代謝制御機構の解明
Uncovering the molecular mechanism of central control of bone remodeling by hypothalamic neuropeptides

Reena Rodriguez
Dept. of Oral Impltantology & Regenerative Dental Medicine
「Epigallocatechin-3-gallate 含有Gelatin Hydrogelを
用いた骨再生に関する研究」

則武　加奈子
Kanako Noritake
Dept. of Oral Impltantology & Regenerative Dental Medicine
「スーパーGBR膜「ハイドロゲルシート」の開発」

郝　佳
（Hao Jia）
インプラント・口腔再生医学　hydeoxyapatiteコーティングインプラント埋入時にZoledronic Acidを局所投与した際の骨形成に与える影響と細菌接着について
Bacterial adhesion and bone formation effect of Zoledronic Acid immobilized hydroxyaptite implants

Paksinee Kamolratanakul
Dept. of Molecular Pharmacology
「ナノゲルscaffoldを用いたEP4アゴニストとBMPの
骨再生能に関する研究」

中川　朋美
Tomomi Nakagawa
Dept. of Molecular Pharmacology
「悪性黒色腫の骨の転移における転写因子Cizの
役割の解明」

鈴木　尋之
Hiroyuki suzuki
Dept. of Maxillofacial Orthognathics
「可溶型fibroblast growth factor receptor2（FGFR2）の
頭蓋冠縫合部早期癒合症に対する治療効果」

Erik Idrus
Dept. of Cell Signaling
「RANKL刺激によるNFATc1制御遺伝子と
microRNAの同定」

Gamaralalage Amodini Rajakaruna
Dept. of Periodontology
「歯周病とバージャー病の関連の解明」

藤田　浩二
Koji Fujita
Dept. of Orthopaedic and Spinal Surgery
「Vitamin Eの骨代謝に対する影響について」

木原　翼
Tasuku Kihara
Oral pathology
骨芽細胞分化と骨再生におけるCCN3の役割
The role of CCN3 in osteoblast differentiation and bone regeneration

古田　繭子
Mayuko Furuta
分子細胞遺伝学（Molecular Cytogenetics）
新たなRNA創薬に寄与する癌制御性microRNAの機能的スクリーニング
Exploration of novel tumor-suppresive microRNAs using functional genomics-assisted approach

安藤　彰子
Akiko Ando
バイオイメージングを用いた歯周組織幹細胞の同定
Identification of periodontal stem cells by bio-imaging approaches

Bharti Pariksha
歯周病学
歯周治療が全身の炎症に与える影響
Effect of Periodontal Treatment on systemic inflammation.

辻　香織
Kaori Tsuji
顎顔面矯正学
Zinc finger 型転写因子POKEMONの破骨細胞における役割の解明
Investigation of the role of zinc finger transcription factor, POKEMON in osteoclasts

許　レン
XU Ren
整形外科（Orthopaedic and Spinal Surgery）
視床下部性神経ペプチドによる中枢性骨代謝制御機構の解明
Uncovering the molecular mechanism of central control of bone remodeling by hypothalamic neuropeptides

周　夢宇
Zhou Mengyu
歯髄生物学（Pulp Biology and Endodontics）
歯根形成のメカニズム-SCAP（根尖部幹細胞）からの象牙芽細胞およびセメント芽細胞分化に関与する因子の解明
The mechanisms of root formation- Elucidation of the signaling molecules on odontoblast and cementoblast differentiation from SCAP

Smriti Aryal A. C
分子薬理学（Molecular Pharmacology）
細胞骨格による骨代謝制御の分子機構 -Nckの骨の細胞機能調節に於ける役割の解明-
Molecular Mechanisms Underlying Cytoskeletal Regulation of Bone Metabolim-Role of Nck Proteins in Bone Cell Function-

Chokechanachaisakul Uraiwan
歯髄生物学（Pulp Biology and Endodontics）
ラットを用いた歯髄生物学
Rat's pulp biology

Kunawarote Sitthikorn
う蝕制御学
う蝕象牙質に対する接着性能の改良
Improve Bond strength to Caries-affected dentin

Ilnaz Hariri
う蝕制御学
高度に石灰化した接着界面構造の作成と機械的性質の評価
Generation of hyper mineralized adhesive Interface and study on its mechanical properties

AL-BARI MD. ABDUL ALIM
分子情報伝達学（Cell Signaling）
破骨細胞分化を制御するphosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate結合タンパク質の同定と機能解析
Identification and analysis of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphatebinding proteins（PIP_3BPs）that regulate osteoclast differentiation

古市　祥子
Akiko Furuichi
インプラント・口腔再生医学
酸素ナノバブル水の骨組織における生体活性評価
Evaluation for the biologically activity of oxygen nano bubbles solution（OXNB）

Hamid Nurrohman
う蝕制御学（Cariology and Operative Dentistry）
人口口腔装置を用いたバイオフィルムによるう蝕形成後の”Super Dentin”のナノ構造解析
The effect of collagenolytic inhibitors on the quality of acid-base resistant zone in dentin

Chui Chanthoeun
歯周病学（Periodontology）
歯周組織の除菌のための新しい治療様式の開発:LEDと光感受性色素を用いた抗菌的光線力学療法の効果に関する基礎的研究
Development of a New Treatment Modality for Periodontal Disinfection: Basic Study on the Effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy using the Combination of an LED light Source and a Photosensitizing Dye

Samir Kumar Pal
口腔病理学（Oral Pathology）
口腔扁平上皮癌による骨破壊におけるThrombospondin-1の役割
The Role of Thrombospondin-1（TSP-1）in Bone Destruction by Oral Squamous Cell Carcinoma

Hoi　Chin　Hew
遺伝子応用医学
新規プロラインキナーゼC（PKC）アポトーシス標的分子Evi-1の同定
Identification of Evi − 1 as a novel PKC Apoptosis Regulatory Target

村松　智輝
Tomoki Muramatsu
分子細胞遺伝学（Molecular Cytogenetics）
食道扁平上皮癌の発生・進展におけるYAP増幅・発現亢進の分子病理学的意義
Significance of YAP amplification/overexpression in the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma

鈴木　允文
Suzuki Takafumi
歯周病学
骨吸収を引き起こす咬合性外傷の分子機構について解析する-TRPV4の役割-
Molecular mechanism underlying occlusal trauma, induced-bone loss Role of TRPV4

宮嶋　大輔
Daisuke Miyajima
顎顔面外科（分子薬理）
骨代謝における負のMCSFシグナルによる新制御機構の解析
-Dok　アダプター分子による破骨細胞制御と骨粗鬆症-
Novel Insights into Negative Molecular Regulation of MCSF Signaling in Bone Metabolism -Function of Dok Adaptor Molecules in Osteoclasts and Osteoporois -

Atukorallaya Devi Sewvandini Atukorala
硬組織構造生物学
咽頭鰓弓および咽頭鰓発生への外胚葉上皮の関わり
Tracing the fate of ectoderm during the pharyngeal arch development

Kandakar Abu Shameem Md. Saadat
分子発生学
RB/E2F経路の制御と骨肉腫形成過程におけるDRIL1の役割
The Role of DRIL1in the Regulation of RB/E2F Pathway and Tumorigesis of Osteosarcoma

関根　由莉奈
高次生命科学
ナノゲル　リポソーム複合体ハイブリッドゲルの設計と医療応用
Design and Application of Hydrid Hydrogels with Nanogel-coated Liposomes complex

馬　成山
（Ma Chengshan）
整形外科学
骨リモデリングにおける中枢神経制御の経路
A Novel Central-Control Pathway of Bone Remodeling

妻沼　有香
歯周病学
歯根膜細胞シートのインプラント両方への応用
Application of periodontal ligament cell sheet for implant therapy.

Bhargava Suhas Srilatha
インプラント・口腔再生医学
Y-TZPジルコニアの表面処理が骨芽細胞と線維芽細胞に及ぼす影響
Surface modified Y-TZP Zirconia: its effect on osteoblasts and fibroblasts in vitro

MD ABDULLA AL MASUD KHAN
硬組織薬理学
TNFαとRANKLアンタゴニストであるW9ペプチドの骨形成における役割
A Role of TNF- α and RANKL antagonist peptide W9 on osteogenesis

滝沢　文彦
発生発達病態学
マクロファージToll-like receptor 4シグナルにおける細胞内カルシウムおよびTransient Receptor potential Vanilloid 2の役割の解析
Role of intracellular calcium and Transient Receptor potential Vanilloid 2 in macrophage Toll-like receptor 4 signaling

白　樺
Bai Hua
Dept. of Moleclurar Cytogenetics
「ヒト癌におけるオートファジー関連遺伝子LC3Av1遺伝子の機能解析」

Bakhsh, Turki Abdulsalam A.
う蝕制御学
コンポジットレジン接着界面の長期的な挙動について、SS-OCTを用いた定量的評価
SS-OCT as a new tool for long term quantitative evaluation on the resin-dentin interface in a bonded restoration

Warunee Pluemsakunthai
インプラント・口腔再生医学
ウサギ頭蓋骨欠損モデルにおける改良PRF含有αTCPの骨再生における有用性の検討
The effect of platelet rich fibrin（PRF）preparation with Alpha-tricalcium phosphate（α -TCP）enhance bone regeneration in rabbit calvarium

森田　淳平
顎顔面矯正学
可溶型線維芽細胞成長因子受容体2を用いたアペール症候群の新規治療方法の開発 - アペール症候群表現型の救済 -
The development of novel treatment for Apert syndrome by a soluble form of FGFR2-Rescue of Apert phenotypes

Bijaya Baobam
細菌感染制御学
オートファジーおよび免疫応答におけるA群レンサ球菌認識機構の解析
Molecular analysis of recognition mechanisms of Group A Streptococcus in autophagic degradation system and immune responses

山田　梓
歯周病学
ヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞/セメント芽細胞分化を誘導する因子の探索
The search of factoers inducing osteoblastic/cementoblastic differentiation in human Periodontal Ligament Stem Cells

南原　弘美
歯周病学
歯周病原細菌によるWnt5a遺伝子発現機構の解析
The modulation of Wnt5a expression by periodontopathic bacteria

中根　綾子
小児歯科学
慨定量的in situ　蛍光イメージングによる骨細胞の概日リズムの可視化と、成長発達過程におけるその機能解析
Quantitative in situ fluorescent imaging approach for functional dynamics of osteocytes through circadian oscillation during growth and development

Nurmaa Dashzeveg
バイオ情報学
骨肉腫におけるP53によって誘導されるアポトーシス関連遺伝子の解析
Discovery of pro-apoptotic genes induced by p53 3 in osteosarcoma

荻田　真弓
歯周病学
ヒト歯根膜細胞におけるレーザー照射およびサイトカイン刺激によるhuman-beta-defensin（HBDs）発現の探査
The expression of HBDs by laser irradiation, various cytokines and bacterial components in human PDL cells

山口　佑季
バイオ情報学
哺乳類の特徴的形質における哺乳類特異的遺伝子群の役割
The role of mammalian specific genes in mammalian characteristics

大上　えりか
顎顔面外科学
口腔扁平上皮癌が生産する破骨細胞性骨吸収制御因子の同定
Identification of osteoclastic bone resorption regulatory factors produced by oral squamous cell carcinoma

湯浅　将人
整形外科学
デキサメタゾン併用によるBone morphogenetic proteinによる骨形成に対する有効性の検討
The efficiency of bone formation by BMP with dexamethasone

宮部　斉重
膠原病・リウマチ内科学
関節リウマチ病態形成におけるLPA/LPA受容体、ATXの関与
Pathogenic roles of LPA/LPA receptors and ATX on the rheumatoid arthritis

山田　剛史
整形外科学
骨髄由来間葉系細胞（MSC）の質 - 骨形成抑制因子の同定 -
The significance of the quality of the human bone marrow mesenchymal cells（hBMMCs）in the bone formation

Rojbani Hisham Khalifa
インプラント・口腔再生医学
ブラッククミン（Nigella　Sativa）の骨再生における効果の検討
Effect of Nigella Sativa on Bone Formation

チェン康
（Chang Kang）
インプラント・口腔再生医学　歯科用インプラント周囲骨における直流電流装置を用いた骨形成促進作用に関する研究
A direct current device for accelerating bone formation in tissues surrounding a dental implant.

Osama Zakaria
インプラント・口腔再生医学
異なる表面性状を有する歯科用インプラント周囲骨における電気的刺激を用いた骨形成促進作用に関する研究
Electrical stimulation for acceleratioing Peri-implant bone formation of different implant surfaces

岩崎　陽平
分子薬理学
骨に対するPTH作用におけるCB2の調節作用の解析 -
骨細胞集団および中枢神経系の骨量調節における連関の解明 -
Analysis of regulatory effect of CB2 to thePTH effect to Bone.-Relevance of Bone Cell Assembly（BCA）and Central Nervous System（CNS）in the maintenance of bone-

長谷川　久紀

膠原病・リウマチ内科学
関節リウマチ（RA）の新規治療標的となるmicroRNAの探究
Identification of microRNA as a new therapeutic target for rheumatoid arthritis.

福田　真

膠原病・リウマチ内科学
関節リウマチ病態形成におけるFROUNTの関与
Pathogenic roles of FROUNT on Rheumatoid Arthritis

佐藤　潔
顎口腔外科学
口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤における癌関連線維芽細胞の役割
Roles of carcinoma-associated fibroblasts in bone invasion by oral squamous cell carcinoma

Marwa Madi
インプラント・口腔再生医学
インプラント周囲炎を誘発させた状態における、HA薄膜スパッタリングインプラントと、他の表面性状インプラントの比較
Experimental periimplantitis at HA sputtered coated implants in comparison to other surface treatments

渡辺　千穂
顎顔面矯正学
骨代謝におけるRNA stabitlityの機能解析
Functional analysis of RNA stability in bone metabolism

細矢　匡

膠原病・リウマチ内科学
TEAM1-TREM1-Ligand 相互作用修飾による自己免疫疾患の新規治療法の開発
Development of new treatment of autoimmune diseases by modifying interaction between TREM1 and TREM-Logand

徐　成
（Cheng Xu）
整形外科学
骨形成におけるmicroRNAの役割
Role of microRNA in bone formation

木村　直樹

膠原病・リウマチ内科学
腫瘍による筋炎発症のメカニズムの解析
Analysis of cancer-associated autoimmune myosis

Prasansuttiporn Taweesak

う蝕制御学
次亜塩素酸ナトリウム処置後象牙質に対するrosmarinic acidの接着強さ及び耐久性への影響
Effect of rosmarinic acid on bond strength and bond longevity to NaOCL-treated dentin.

Adorno Quevedo Carlos Gabriel
歯髄生物学
ラット歯髄の慢性炎症後にみられるリンパ管新生
Lymphangiogenesis in the rat dental pulp following induced chronic inflammation

安岡　潤一
高次生命科学
カチオン性ナノゲルによる新規核酸デリバリーシステム
Novel nucleic acid Delivery Systems by Cationic Nanogel

鈴木　晶子

膠原病・リウマチ内科学
マウス膠原病モデルの病態における体液調整因子の働きを明らかにする。
The role of circulating plasma volume regulation factors in murine arthritis and myositis model

土戸　優志

高次生命科学
新規ナノゲルによるタンパク質デリバリー
Protein Delivery by Novel Nanogel

宮原　宇将

インプラント・口腔再生医学
ナノゲルを用いた骨再生に関する研究
A research on bone regeneration by using Nanogel

Thitthaweerat Suppason
う蝕制御学
次亜塩素酸ナトリウムとロスマリン酸の失活歯への接着強さと長期接着耐久性に及ぼす影響
Influence of NaOCIand rosmarinic acid on bond strength and long-term bond durability in endodontically treated tooth

Md.Sofiqul Islam

う蝕制御学
フラボノイドによる、象牙質コラーゲン保護と脱灰象牙質の再石灰効果 - 新しい根面蝕歯 -
治療アプローチ
Flavonoid Reserves Dentin Collagen and Promotes human Root Dentin Lesion Re-mineralization in vitro

Gerardo Jose Joves Mendez

う蝕制御学
塩化カルシウム・フッ素含有ボンディングシステムを用いた歯質接着界面の強化
Reinforcement of adhesive interface using a CaCl2/fluoride-incorporated bonding system

芦垣　紀彦

歯周病学
歯周病原細菌が慢性腎不全を悪化させる病因の解析
Periodontal bacteria aggravate chronic renal failure by subtotal nephrectomy in mice

Paveenarat Aukkarasongsup
顎顔面矯正学
低酸素状態下のマウス歯根膜細胞におけるペリオスチン遺伝子発現制御メカニズムの解析：低酸素応答領域の同定とHIF－1経路関わり
Analysis of periostion gene expression in mouse periodontal ligament cells under hypoxia: identification of HRE and HIF-1 pathway

渡辺　高

顎顔面外科学
in situ蛍光イメージング解析による、骨の分化・再生におけるRunk2タンパク細胞内動態の新規調節機構の解析
Investigation of novel subcelular bynamics of Runx2 during bone differentiation and regeneration by in situ fluorescent imaging analysis

坂野　若詠

う蝕制御学
新規象牙質接着システムの開発及び評価について
Developing resin composite restoration with adhesive system

Rumana Khanom

口腔病理学
シグナル分子としてのケラチン17が癌の骨浸潤に果たす役割の解析
The functional role of leratin 17 as a signaling molecule in bone invasion of oral cancer

Duarte Puerto Carolina Lizeth

顎顔面矯正学
磁気制御されたRelaxin と　BMP-2ナノ粒子を用いた骨縫合の拡大
Sutural Expansion Assisted With Magnetically Controlled Site Specific Relaxin and BMP-2 Nanoparticles

于　淼

（Yu Miao）
インプラント・口腔再生医学
尾部懸垂マウスを用いた、骨再生におけるメカニカルストレスの関与に関する研究
The role of mechanical stress in bone regeneration using tail suspension mice

上園　将慶

顎顔面矯正学 低浸襲かつ早期に骨接合する新規矯正用デバイスの開発
Development of minimally invasive and rapidly osseointegratable orthodontic devices

Amir Nazari

う蝕制御学
う蝕脱灰象牙質を高度石灰化組織へと変化させるための再石灰化技術の創造
Developing a Dentin Remineralising Method（DRM）to Transform Carious Demineralised Dentin into Hypermineralised Substrate

Gombo Bolortuya

Dept. of Pulp Biology and Endodontics
「インテグリン発現を評価することによる象牙芽細胞の成熟とシグナル伝達に対する低出力レーザー療法の効果」

伊達　佑生

Yuki Date
Dept. of Oral Impltantology & Regenerative Dental Medicine
「歯根発生に関する因子の同定」

大城　暁子

健康推進歯学
FDC-SPの口腔内組織での機能
The roles of FDC-SP in oral tissues

Aslam Al Mehdi

Dept. of Periodontology
「歯周疾患は動脈疾患の進行に重要なリスクファクターとなる」

松本　力

Tsutomu Matsumoto
口腔病理学
矯正的歯の移動における骨細胞の役割
The role of osteocyte in orthodontic tooth movement

Wayakanon Praween

分子細胞機能学（Cellular Physiological Chemistry）
アニュラーギャップジャンクションの形成機構
The Mechanisms of Annular Gap Junction Formation

青井　陽子

Yoko Aoi
Dept. of Cellular Physiological Chemistry
「低酸素下におけるサイトカイン産生変動機序～メチル化の関与」

下田　麻子

Asako Shimoda
有機材料（Organic materials）
ナノゲル架橋ハイドロゲルによるタンパク質デリバリー
Design of Nanogel-assembled hydrogel for protein delivery

高橋　治子

Haruko Takahashi
有機材料（Organic materials）
Polysaccharide nano-ball を用いた新規ナノキャリアの開発
Design of Funtional Polysaccharide nano-ball as new nanocarrier

東京医科歯科大学

グローバルCOEプログラム概要

1. 目的・必要性

東京医科歯科大学は“歯”と“骨”の疾患科学において世界的な拠点であること特徴とする。本拠点形成の目的は、世界で最も高年齢化の進行する我国にあって、人々が生きるために必須の“歯”と“骨”の分子疾患科学について、21世紀COEの成果を発展的に継承し、世界最先端の研究を展開して、合わせて次世代を担う国際的に活躍する若手研究者を養成する世界でも類のない国際教育研究拠点を形成することである。

2. 人材育成計画

(1) 国際PIシャペロン（PI-Chaperon（PIC））制度

国際PIシャペロン（PIC）制度とは、国際公募により選抜され、国際的に活躍する自立した研究者を目指す（Principal Investigator）、シャペロン型（大学院生を指導し共に研究する）のPostDoc終了後の（PDは採用しない）若手研究者育成制度である。さらに挑戦的な学際領域を開拓して（Prime Innovation）未来の領域を作り上げ、国際的に競争力のある創造性豊かなプロジェクトを遂行する（Project with Imagination）ことの3つのPIをキーワードとする若手研究者を育成するシステムである。英語のインタビューにより、全て外部より採用する。またGrant Writing等の指導ではGrant査読者やStudy Section担当者による教育を含め国際的視点でのトレーニングを行う。

(2) アドバンスト・I・スーパースチューデント（AI-SS）制度

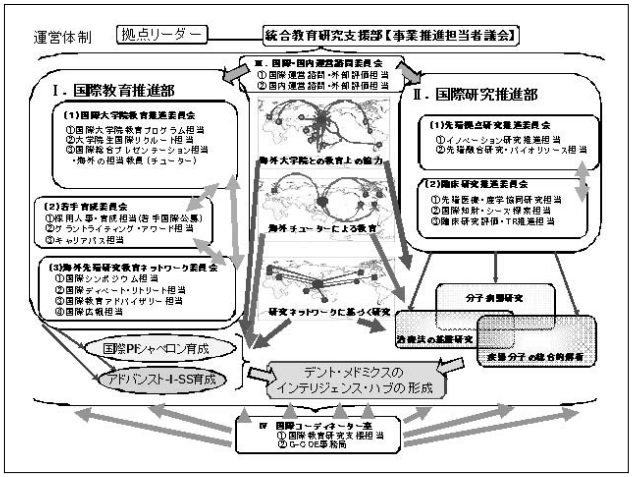
アドバンスト・I・スーパースチューデントとは選抜され重点的な大学院教育と経済支援を受け、国際的に発展する力をつけるスーパースチューデント（SS）である。21世紀COEにおいては、本拠点は重点教育・経済支援の対象となるSS制度を創出し、優れた大学院生の教育、育成を達成した。本拠点においては、これを発展させ，(i) 国際的に活躍する（International），(ii) 国際的に大学院生同士で相互に切磋琢磨する（Interactive），(iii) 個性の輝く（Individual Identity）の“3つのI”をキーワードとする指導的人材の育成を目指す新制度を創設する。新たに、(1) 国際教育としての国際メンター制度、(2) 国際“Interactive”プログラムによる、一流の大学院であるUCSF、ハーバード大（米国）トロント大（カナダ）における大学院の教育（学生発表会）に参加し、海外拠点の大学院生との交流ならびに現地海外教員による教育を受け、(3) 個を伸ばす国際教育プログラムとして国際コンティニュエータープログラム（AISS-ICP）などを自ら選択しつつ教育を創造する。医歯学系大学院留学生数は全国一位だが更に海外の若手のリクルート、キャリアパスの担当部を其々設置して強化する。

3. 研究活動計画

拠点の研究においては、歯と骨の疾患領域における世界最高レベルの研究として硬組織の喪失と形成に関わる疾患のメカニズムならびにその診断・治療基盤研究を推進する。具体的研究目的は以下の3点である。即ち、【研究目的1】歯と骨の喪失に至る疾患の分子病態成立のメカニズムの解明、【研究目的2】歯と骨の先進的再建の為の治療法の基盤研究の推進、【研究目的3】歯と骨の疾患の統合的機能情報研究の推進である。これらの有機的融合により新たな歯と骨の疾患分子の統合研究（デントメドミクス）を創成する。この目的のために、歯学部、医学部、難治疾患研究所、生体材料工学研究所、研究部の五つの部局が横断的体制をとり、個々の先進研究をさらに発展させるとともにこれらを合わせた新領域のイノベーションを推進する。

4. 組織構成

学部・研究所を越えた横断的体制をとり、先進研究をさらに発展させる。



5. 中間評価結果（文部科学省発表2011年1月7日）

「グローバルCOEプログラム」（平成20年度採択拠点）中間評価について

http://www.mext.go.jp/a_menu/koutou/globalcoe/1301052.htm

グローバルCOEプログラム　平成20年度採択拠点中間評価結果一覧（総括評価内訳）

【医学系】

現行の努力を継続することによって、当初目的を達成することが可能と判断されるとされた12件に選ばれ、更にこの中で特に秀れた2件として評価された。

拠点番号	拠点プログラム名	機関名
F07	歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点	東京医科歯科大学

専攻等名	拠点リーダー名	連携先機関名（※）	特に優れている拠点12件中2件
医歯学総合研究科器官システム制御学系専攻	野田政樹		◎

グローバルCOE プログラム 平成20年度採択拠点中間評価【特に優れている拠点】概要

【医学系】

F07「歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点」
東京医科歯科大学医歯学総合研究科器官システム制御学系専攻

特に人材育成面において、国際PI シャペロン教員やアドバンスト・I・スーパースチューデントなどユニークなシステムが立ち上がり、世界の著名大学の教員をメンターに採用するなどメンター制度も効率的に活用され、若手研究者育成に大変優れた成果があがっている。

また、毎週1 回の国際総合プレゼンテーション、海外のトップ研究者を招く海外研究者講演会、国際シンポジウムの開催などが積極的、生産的になされるとともに、海外の先端的研究者による国際外部評価会など、拠点の活動に対する評価システムをうまく構築しており、教育にかなりの努力が払われている。

研究活動においても、世界トップレベルの業績が得られ、基礎的研究の実績のみならず、臨床研究活動も進展している。

運営面では、大学及び拠点リーダーの強いリーダーシップの下で精力的に拠点が運営され、国際化に向けた取組みも盛んで、歯科と医科の融合もうまくなされている。

6. 国際外部評価会

3回の国際外部評価会を開催した。

実施日

2010.10.29　　2011.1.31　　2011.2.4

International Advisory Review

EVALUATION FORM

【評価者】

Derrik Rancourt
Associate Professor, University of Calgary, Canada

Irma Thesleff
Professor, University of Helsinki, Finland

Adam Engler
Assistant Professor, University of California, San Diego, USA

Dennis C. Crawford
Surgical Director, Oregon Health Sciences University, USA

James Hui Hoi Po
Associate Professor and Senior Consultant, National University of Singapore, Singapore

Alberto Gobbi
Director, Orthopaedic Arthroscopic Surgery International (OASI), Italy

A.Overall Evaluation on the Global COE Program

1. Overall evaluation on the Global COE program activities

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
5	1			

2. Research

2-1. Evaluation on the researches in the Global COE program

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
4	2			

2-2. Collaboration within the Global COE program

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
2	3			1

2-3. Clinical aspects of the Global COE program

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
3	2			1

3. Education

3-1. Efforts to promote young scientists in the Global COE program

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
4	2			

3-2. International collaborative efforts

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
3	2	1		

4. Management

4-1. Administrative structure of the Global COE program (Excellent, Good, Fair, Poor)

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
3				3

4-2. Is the budget of the Global COE program spent efficiently?

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
3				3

5. Perspective

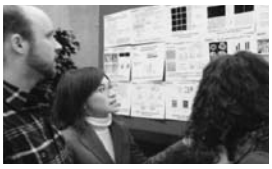
Will the GCOE program contribute to the future development of the bone and tooth field?

Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
4	2			

7. 国際教育活動

歯と骨のGCOEの大学院生（AISS/QAISS）による海外活動

2011年2月15日 University of Toronto Research Dayに参加
参加者:Kaori Tsuji



2011年2月14日 University of Torontoでの本学の大学院生による Kaori Tsuji（AISS）によるレクチャーを実施

2010年10月6日 UCSF Research Dayに参加
参加者:Daisuke Miyajima, Paksinee Kamolratanakul

2010年10月5日 UCSF での本学大学院生・Paksinee Kamolratanakul（AISS）によるレクチャーを実施

2010年7月12日 University of Gothenburg, Swedenにおける本学大学院生 Kanako Noritakeによるレクチャーを実施

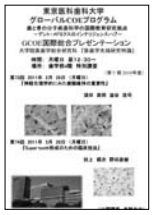
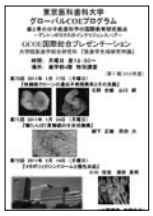
2010年4月14日 Harvard Dental School での大学院生・Kanako Noritake（AISS）によるレクチャーを実施

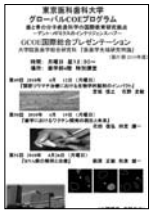
2010年4月13日 Harvard Dental School Research Dayに参加
参加者:Kanako Noritake, Tomomi Nakagawa, Bai Hua

2010年11月1日 Dr. Derrik E. Rancourtとの個別ディスカッション

8. 総合プレゼンテーション

参加者　教授64名を含む2,014名が参加　　学生評価　Excellent & Good率　平均95%（最近25回分）［アンケート数1,479件］

ポスター	プレゼンテーションタイトル	日　付
	第74回「Super tooth形成のための臨床技法」	2011年3月28日
	第73回「神経生理学的にみた歯髄維持の重要性」	2011年2月28日
	第72回「メタボリックシンドロームと慢性炎症」	2011年2月14日
	第71回「糖たんぱく質糖鎖の生合成機構」	2011年1月24日
	第70回「体細胞クローンの遺伝子発現異常とその克服」	2011年1月17日
	第69回「印刷技術を応用した組織再生」	2010年12月20日
	第68回「がんと遺伝子疾患のゲノム・エピゲノム解析」	2010年12月6日
	第67回「骨形成の制御因子」	2010年11月29日
	第66回「口腔領域特異的に存在する細胞外マトリックスの役割に関する最近の知見」	2010年11月22日
	第65回「脱灰エナメル質と象牙質の光学的特性」	2010年11月15日
	第64回「体謝と血管機能を結ぶ分子メカニズム」	2010年11月1日
	第63回「Ras-cyclin D2活性化による精原幹細胞の自己複製」	2010年10月25日
	第62回「BMP研究の進捗」	2010年10月4日
	第61回「関節炎新規治療薬開発の試み」	2010年9月27日
	第60回「分子時計の破綻と脊椎骨異形成症」	2010年9月13日
	第59回「細胞外マトリックス分解最近の知見」	2010年6月28日
	第58回「ストア作動性カルシウムとその生理的な役割」	2010年6月21日
	第57回「ペースメーカーチャネルHCNの骨組織における役割」	2010年6月14日
	第56回「ナノゲルDDSの最前線」	2010年6月7日
	第55回「医療機器か薬剤か?医療機器の製品化の真の阻害因子」	2010年5月31日
	第54回「種々の脊椎動物の骨格の形態学的変化」	2010年5月24日
	第53回「口腔癌のセンチネルリンパ節・ナビゲーション手術」	2010年5月17日
	第52回「歯周組織再生治療の進歩」	2010年5月10日

ポスター	プレゼンテーションタイトル	日　付
	第51回「RNA病の解明と治療」	2010年4月26日
	第50回「歯学におけるワクチン開発の現在と未来」	2010年4月19日
	第49回「関節リウマチ治療における生物学的製剤のインパクト」	2010年4月12日

9. 国際シンポジウム

ポスター	タイトル	講演者	日　付
	第5回国際シンポジウム “臨床経験からみた軟骨再生研究 -国際比較と近未来-”	Alberto Gobbi Dennis Crawford James Hui 越智　光夫 脇谷　滋之 関矢　一郎	2011年2月3日
	薬害監視学講座 “関節リウマチ患者における生物学的製剤の安全性に関する国際シンポジウム“	Loreto Carmona 瀬戸口　聡子　他	2010年10月7日
	第4回国際シンポジウム “インプラントの表面改変とデザイン“	Peter Schupbach Peter Thomsen 他	2010年2月11日

大山学長と国際シンポジウム講演者（2011年2月3日）

グローバルCOE国際シンポジウムを開催して

運動器外科学　関矢一郎

2011年2月3日に野田政樹先生を拠点リーダーとする東京医科歯科大学グローバルCOEプログラムの第5回国際シンポジウムを、宗田大先生が世話人となり開催しました。事務局を担当した関矢からご報告させていただきます。ご記憶のことと思いますが、2008年2月7日にもCOEプログラムの一環として、整形外科教室で整形外科シンポジウムを開催しています。

今回のテーマは「臨床経験からみた軟骨再生研究-国際比較と近未来―」としました。軟骨再生研究は現在世界中で盛んに実施されていますが、そのなかで臨床応用を意識しているものは実際には多くないように感じられます。さらに、実際に臨床応用まで進め、科学的に解析している施設は限られています。本会では、軟骨再生を実際に臨床で進めており、かつ国際的に活躍されている臨床医にこだわり、海外から3名、国内から2名お呼びしました。軟骨再生医療に関して、世界の最前線と、今後の展開を感じることができるプログラムになるように努めました。

本学のM&Dタワー2階大講堂で開催しました。すべて英語で進行し、平日の木曜日であることから、参加者が十分集まるか心配でしたが、当日はスタッフをいれると会場内には総勢約170人の参加となりました。大山喬史学長をはじめ、土屋正光先生、大川淳先生など、同門の先生方にも多数ご出席いただきまして、ありがとうございました。

最初の演者は広島大学の越智光夫先生でした。越智先生はコラーゲンゲルに培養自己軟骨細胞を包埋して、軟骨欠損部に移植する方法を開発しています。世界で最初に普及した軟骨細胞移植は、軟骨欠損部を骨膜で被覆後、軟骨細胞の浮遊液を欠損部に注射する方法でしたが、現在では第二世代として、越智先生が開発されたコンセプトに変わっています。広島大学では現在、広範囲な軟骨変性に対して、膝の屈伸が可能な創外固定器を用いたdistraction arthroplastyを行なっており、今後の展開が注目されます。

2人目は、Oregon Health Sciences UniversityのDr. Dennis Crawfordでした。ハニカムコラーゲンに自己培養軟骨を包埋し、パッチや縫合を必要としない術式を開発しています。米国の厳しい審査を通過させ、マイクロフラクチャー法との前向き比較研究を行ない、2年時の臨床成績が軟骨細胞移植が優れていたことを報告されました。今回、奥様といっしょに来日されましたが、奥様は日系で、エノモト　ミコさんという素敵な麻酔医の方でした。

3人目は大阪市立大学の脇谷滋之先生でした。世界で最初に骨髄幹細胞を軟骨欠損部に移植した臨床例を報告されており、国際的に高名です。以前勤務されていた信州大学では、加藤教授と共同で、肘の離段性骨軟骨炎の患者さんにも骨髄幹細胞移植を行なっています。最近、自動培養装置を開発し、安全性を高める努力をされています。

4人目はNational University of SingaporeのDr. James Huiでした。Singaporeはその時期旧正月であり、家族と過ごすのが一般的なのですが、強くお願いして来ていただきました。第1世代の自家軟骨培養移植と骨髄幹細胞を同じ手技で移植した臨床研究を紹介されました。軟骨細胞と同等の結果が得られ、1回の手術で可能である点で骨髄細胞の有用性が高いことを示されました。

5人目は私が発表させていただきました。現在臨床研究を行なっている、自己滑膜幹細胞の鏡視下移植術をご紹介しました。海外からのゲスト、特にDr. Huiに滑膜幹細胞に大きな関心を持ってもらいました。

最後はイタリアのDr. Alberto Gobbiでした。Dr. Gobbiは開業されている先生ですが、NPOの研究所を有し、国際学会でも大活躍されています。骨髄液を遠心し、有核細胞成分を濃縮したものを、人工素材とともに軟骨欠損部に鏡視下で移植、あるいは関節内注射する治療を紹介されました。これまで自家培養軟骨細胞移植とマイクロフラクチャーの比較研究をされていましたが、その経験を踏まえ、現在は低侵襲治療に関心を持たれています。

今回、宗田先生と演者の先生方に交代で座長をお願いしましたが、みなさん的確に座長役をこなしていただき、場内からも多数の質問がでました。参加していただいた方々に、軟骨再生の臨床の現状と将来性が伝わったのではないかと感じています。

国際シンポジウムの翌日はポストGCOEシンポジウムとして、野田先生に進行していただき、教育に関するディスカッションを行ないました。はじめに運動器外科大学院生の宮本崇先生、高橋徹先生、中村智祐先生に研

究成果を発表していただき、海外ゲスト3名とディスカッションしました。大学院生3名のうち2名は2011年1月の米国整形外科基礎学会（ORS）のNew Investigator Recognition Award（NIRA）のfinalistだったのですが、その時の審査よりもはるかに厳しい質問が多数でました。後半は運動器外科の大学院生とともに、教育の成果をあげるためには何をするべきか、海外ゲスト3名と、運動器外科のスタッフ、大学院生がそれぞれ意見を述べ、ディスカッションしました。動機付けをどうするか、いかに英語のスキルをあげるか、手術手技の獲得とのバランスをどうするか等、「マイケル・サンデル教授のハーバード白熱教室」のような、熱いディスカッションが行なわれました。内容はもちろん有意義でしたが、同時に私たちの英語の取り組みに対するmotivationがグンと上がりました。

最後に今回の国際シンポジウムでは、第一線で活躍されるゲスト、特に海外から複数の臨床医をお呼びするのは準備がたいへんでしたが、その苦労に見合う成果が得られたと感じています。今回のシンポジウムにご尽力いただいた野田先生、事務の方々、運動器外科のスタッフや大学院生の皆様に、宗田先生とともに感謝いたします。

10. 海外研究者等招聘講演会

ポスター	タイトル	講演者	日　付
	第42回グローバルCOE海外研究者講演会 「Biologics and joint destruction in patients with rheumatoid arthritis - evidence and perspective -」	Desiree MFM van der Heijde	2011年3月8日
	第41回グローバルCOE海外研究者講演会 「AN ANATOMICAL REVIEW OF HEAD & NECK ANATOMY USING CONE BEAM COMPUTED TOMOGRAPHY」	Neil S.Norton	2011年2月28日
	第40回グローバルCOE海外研究者講演会 「Can coral sand be used as calcium phosphate drug delivery micro system for bone regeneration and repair」	Besim Ben-Nissan	2011年2月24日
	第39回グローバルCOE海外研究者講演会 「Therapeutic single-chain sc-Fvmonoclonal antibody for human periodontal disease」	Andy Yen-Tung Teng	2011年2月8日
	第38回グローバルCOE海外研究者講演会 「Molecular mechanisms of tooth development」	Irma Thesleff	2011年1月31日
	第37回グローバルCOE海外研究者講演会 「The role of primary cilia in orofacialdevelopment」	Atsushi Ohazama	2011年1月31日

ポスター	タイトル	講演者	日　付
	第36回グローバルCOE海外研究者講演会 「Intrinsic extracellular matrix propertiesregulatestem cell differentiation」	Adam Jeffrey Engler	2011年1月31日
	第35回グローバルCOE海外研究者講演会 「OrofacialTissue Regeneration and Function Reconstruction in Swine」	SonglinWang	2010年12月22日
	第34回グローバルCOE海外研究者講演会 「BMP signaling in bone」	Vicki Rosen	2010年11月2日
	第33回グローバルCOE海外研究者講演会 「Expansion and Differentiation of PluripotentStem Cells to the Osteoblastand ChondrocyteLineage in Stirred Suspension Bioreactors」	DerrikE.Rancourt	2010年10月29日
	第32回グローバルCOE海外研究者講演会共催 「第10回骨免疫学セミナー」	Jiake Xu Edward Schwarz	2010年10月21日
	第31回グローバルCOE講演会 「マウス初期胚での左右非対称性決定機構へのBMPシグナルのかかわり」	三品裕司	2010年7月9日
	第30回グローバルCOE講演会「Evc2: A Novel Modulator in Tooth Development」	持田　欣幸	2010年7月7日
	第22回グローバルCOE講演会 「細菌ゲノムから見た病原性獲得の進化機構」	中川　一路	2010年6月11日
	第21回グローバルCOE講演会 「Physiological role of autophagyand its regulation mechanism」	水島　昇	2010年6月8日

ポスター	タイトル	講演者	日　付
	第29回グローバルCOE海外研究者講演会 「Research Priorities in Operative Dentistry」 「NACPDE’ s Role in Postgraduate Dental Education in the UK』」	Nairn Wilson Margaret Wilson	2010年6月1日
	第28回グローバルCOE海外研究者講演会 「LRP5 and Wntsignaling: How is it anabolic to bone?」	Roland Baron	2010年4月6日

2010年6月11日
グローバルCOE講演会
中川一路教授

2010年11月2日
グローバルCOE海外研究者講演会
Dr. Vicki Rosen
（ハーバード大学　歯学部教授）

11. イノベーション研究活動推進

【2010年度】
実施日:2010年11月30日
審査結果:

プロジェクト1
研究代表者:歯周病学　和泉雄一
共同研究者:分子薬理学　野田政樹
研究課題名
和文:歯周炎における硬組織代謝に与える神経性炎症の役割について
英文:Roles of nerve inflammation on the hard tissue metabolism in periodontitis

プロジェクト2
研究代表者: 分子細胞遺伝　稲澤譲治
共同研究者:分子薬理学　野田政樹、額口腔外科学　小村健、顎顔面矯正学　森山啓司、膠原病・リウマチ内科学　宮坂信之、分子遺伝学　三木義男、整形外科学　四宮謙一、有機材料学　秋吉一成
研究課題名
和文:難治性硬組織疾患の病態オミックス先端拠点研究
英文:Advanced omics research for intractable hard tissue diseases

プロジェクト3
研究代表者:歯髄生物学　須田英明
共同研究者:運動器外科学　宗田大
研究課題名
和文:歯髄・歯肉組織由来の間葉幹細胞による歯槽骨・顎骨再生
英文:Regeneration of alveolar and jaw bone by using mesenchymal stem cells derived from dental pulpal and gingival tissues

プロジェクト4
研究代表者:硬組織病態生化学　柳下正樹
共同研究者:歯周病学　和泉雄一
研究課題名
和文:歯周組織炎症部位における生体内細胞死の組織学的・生化学的解析
英文:Histological and biochemical analyses of sterile inflammation at the inflammation site of periodontal diseases

プロジェクト5
研究代表者:口腔病理学　山口朗
共同研究者:分子情報伝達学　高柳広
研究課題名
和文:光メージングと分子生物学の融合によるオステオネットワークの解明を目指したフロンティア研究拠点
英文:New frontier of osteonetwork research by combinational approaches of optical imaging and molecular biology

12. 国際PIシャペロンの活動

●2010年9月14日

国際PIシャペロンへのグラントライティング指導・競争的研究費審査表彰

受賞者

1位　大洞正嗣　　2位　飯村忠浩　　3位　辻邦和

●2011年11月4日

国際PIシャペロンフォーラム・森田研究理事による特許申請について講演

2010年9月14日
国際PIシャペロンへのグラントライティング指導

2010年9月14日
国際PIシャペロン
競争的研究費審査　表彰

2010年11月4日
国際PIシャペロンフォーラム・
森田研究理事による特許申請について　講演

13. 大学院生採用面接評価

●第Ⅳ期（2010年4月～）複数教員による英語（年次）面接と評価　優秀賞受賞者

Most Excellent Award　Paksinee Kamolratanakul Excellent Award　Smriti Aryal A. C., Hoi Chin Hew

●第Ⅴ期（2010年10月～）複数教員による英語（年次）面接と評価　優秀賞受賞者

Most Excellent Award　姫野彰子 Excellent Award　高橋治子, 宮嶋大輔

第Ⅳ期 AISS採用面接　点数分布

評価点数	全体平均　66.18点	該当者数
91-100		0
86～90		0
81～85	○○○	3
76～80	○○○○	4
71～75	○○○○○	5
66～70	○○○○○○○○	8
61～65	○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○	16
56～60	○○○○○○○	7
51～55	○○	2
46～50		0
合　計		45

第Ⅴ期 AISS採用面接　点数分布

評価点数	全体平均　71.51点	該当者数
91-100		0
86～90	○○	2
81～85	○○○○○○○	7
76～80	○○○○○○○○○	9
71～75	○○○○○○○○○○○○○○○○○○○	18
66～70	○○○○○○○○○○○○○○○	13
61～65	○○○○○○○○○○○○○○○	13
56～60	○○	2
51～55	○○	2
46～50		0
合　計		66

14. プレゼンテーション型　英語クラス

開催日
平成22年6月28日
平成22年9月27日
平成22年11月1日
平成22年11月29日
平成22年12月13日
平成23年1月24日
平成23年2月21日

Instructor
Mr. Kevin Cleary
（本学准教授）

参加者
PI Chaperon　5名、
Student 28名

15. 歯と骨のGCOE　受賞リスト

野田　政樹

・Daisuke Miyajima. Plenary Poster Award. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010.
・Paksinee Kamolratanakul. Plenary Poster Award. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010.

高柳　広

・大洞将嗣
第5回日本免疫学会研究奨励賞
平成22年12月3日
・大洞将嗣
平成22年度戦略目標「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域のさきがけ
期間:平成23年度－25年度

小村　健

・丸岡　豊、今井英樹、小村　健: 第55回日本口腔外科学会　優秀口演発表賞　2010年10月16-18日　「ケモカイン受容体異常に起因する骨軟骨代謝異常と進行性下顎頭吸収に関する研究」
・大山　篤、須永昌代、樺沢勇司、荒木孝二、俣木志朗、木下淳博: 日本テスト学会大会発表賞　2010年11月20日受賞　「医歯学シミュレーション教育システムの概要」

春日井昇平

・Academy of Osseointegration（AO） Best Clinical Innovation Award: Miyahara T, Nyan M, Nagayama T, Hao J, Rodoriguez R, Yamamoto Y, Shimoda A, Kuroda S, Tachikawa N, Shiota M, Akiyoshi K, Kasugai S. Novel GBR membrane consisting of cholesterol-bearing pullulan nanogel. The 25th Annual Meeting of Academy of Osseointegration 2010.3.4-7 Walt Disney World Dolphin Resort Hotel, Orland, USA
・日本口腔インプラント学会　最優秀発表賞: 宮原宇将、永山友子、小林裕史、黒田真司、春日井昇平.新規GBRナノゲルクロスリンキングメンブレン　ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるドライタイプとウェットタイプの骨治癒比較評価.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌
・日本口腔インプラント学会　デンツプライ賞: 渡邉武、塩田真、春日井昇平.上顎洞外側壁における後上歯槽動脈の分布.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌
・日本口腔インプラント学会　デンツプライ賞: 岡田常司、宗像源博、立川敬子、春日井昇平. β -TCPを用いた上顎洞挙上術の経時的変化の観察　歯科用コーンビームCTによる分析.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌
・International Association for Dental Research（IADR）, Implantology Research Group, Young Invesitigator Prize: Rungsiyanont S, Swasdison S, Dhanesuan N, Kasugai S. Biocompatibility evaluation of gelatin–hydroxyapatite crosslinked scaffold for tissue engineering. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain

・International Association for Dental Research（IADR）, Implantology Research Group, Young Invesitigator Prize: Rojbani H, Nyan M, Kasugai S. Osteoconductivity Of alfa, betaTCP and HA with/without simvastatin. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain

須田英明

・池田英治.Mechanical distortion influences on transjunctional Ca2+ spreading in human odontoblasts. 1st Prize（Meta Grand Prize）presentation, Korean Academy of Endodontics,2010年3月28日.
・植竹千香子（指導　鈴木規元、石村瞳）.電気的根管長測定における根尖孔の大きさおよび根管内溶液の影響.D4研究体験実習学生発表会　歯学科長賞,2010年9月25日.

和泉雄一

・Aleksic V. The best award in poster presentation. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, Mar 11, 2010.
・Aleksic V: Student Scholarship Award for 2010（2nd prize）. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. Academy of Laser Dentistry 17th Annual Conference, Miami, USA, April 17, 2010
・Yamada A:Research Forum Poster Competition First Prize in the category of Basic Science.Expression of WNT related genes in human periodontal ligament cells during osteogenic differentiation. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology（AAP）
Honolulu, Hawaii, 2010.11.1-3.
・姫野彰子、中根綾子、和泉雄一、山口朗、飯村忠浩. 平成22年度　ゴールドリボン賞受賞. 蛍光イメージングによる骨細胞の形態・機能分化の計測.（第30回日本骨形態計測学会（2010.5.米子コンベンションセンター BIG SHIP（鳥取県米子市））
・谷口陽一.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会優秀発表賞.高ヘルツEr:YAGレーザーによるインプラント体粗造面の最適デブライドメント出力の検討. 第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会,名古屋, 2010.11.13-14.

森山啓司

・Tsuji K, Negishi-Koga T, Maeda T, P Paolo Pandolfi, Moriyama K, Takayanagi H. Transcriptional repressor, LRF regulates NFATc1 expression in osteoclastogenesis. 3rd international conference on osteoimmunology, Travel Award, Santorini, Greece, June 20-25, 2010.
・出井彩乃、小野卓史、宮本順、高田潤一、森山啓司. 口腔周囲筋における血流量および筋活動量に関する検討. 第69回日本矯正歯科学会・優秀発表賞、横浜、平成22年9月27－29日.
・佐藤麻緒、馬場祥行、井口隆人、本田綾、片岡恵一、辻美千子、鈴木聖一、森山啓司. 口唇裂・口蓋裂症例の永久歯の先天性欠如に関する臨床統計学的検討. 第34回日本口蓋裂学会総会・優秀ポスター賞、東京、平成22年5月27-28日.

宗田大

・古賀英之
Mechanisms for Noncontact Anterior Cruciate Ligament Injuries: Knee Joint Kinematics in 10 Injury Situations From Female Team Handball and Basketball.
東京医科歯科大学整形外科同門会研究奨励賞

秋吉一成

・戸井田さやか、第59回高分子討論会、准奨励賞、2010年6月.

石野史敏

・李知英
受託研究費JST・さきがけ「iPS細胞と生命機能」研究領域:細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立
期間:平成21年度-平成24年度

稲澤譲治

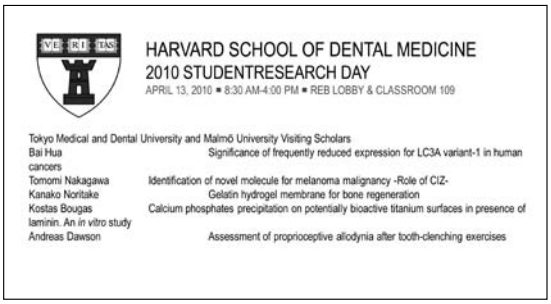
・春木茂男が「Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.（Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010発表）」の研究成果で平成22年度東京医科歯科大学　田中道子賞を受賞

水島　昇

・平成22年10月
第5回日本生化学会柿内三郎記念賞受賞

16. Research Day

●国際的なトップ大学RESEARCH DAYへ派遣
（Harvard University UCSF University of California SanFrancisco）



17. リトリート

●リトリート　ポスター発表　受賞者

1位　Warunee Pluemsakunthai

2位　辻　香織、南原　弘美、Hao Jia

3位　土戸　優志、Xu Jing、Adorno Quevedo Carlos Gabriel 、Kunawarote Sitthikorn 、Rojbani Hisham Khalifa

日　程

2月1日（火曜日）

10:00	東京医科歯科大学集合
10:30	大学出発（バス）
11:30	ホテル到着
11:30-12:30	昼食
12:50-	開会の挨拶　野田教授
13:00-14:00	特別講演1　Dr.Irma Thesleff （University of Helsinki）
14:00-15:00	特別講演2　Dr. Adam Engler （University of California）
15:00-15:15	休憩
15:15-15:45	特別講演3　山下 晃弘先生 （University of Calgary）
15:45-17:45	シャペロンによる講演　一人25分　4名
17:45-18:00	チェックイン
18:00-18:15	ポスター準備
18:15-19:00	夕食
19:00-20:00	セッション2（ポスター）
20:00-22:00	Dr. Thesleff, Dr. Engler, 山下先生、 シャペロンとのラウンドディスカッション
22:00-	ポスター片付け　就寝

2月2日（水曜日）

7:00-8:00	朝食
8:00-8:30	荷造り　チェックアウト
8:30-11:30	シャペロンによる講演　6名
11:30-12:30	昼食
13:00-16:00	産業技術総合研究所つくばセンター 講演、見学 糖鎖医工学研究センター　成松 久 センター長
17:30ごろ	大学到着　解散

Schedule

Tuesday Feb 1st, 2011

10:00 am	Gather at Main gate, Hongo street, TMDU
10：30am	Departure from TMDU by bus
11:30 am	Arrive at the Okura Frontier Hotel
11:30-12:30 pm	Lunch
12:50am	Opening speech by Prof. Noda
13:00-14:00 pm	Presentation by Dr. Irma Thesleff (University of Helsinki)
14:00-15:00 pm	Presentation2 by Dr. Adam J Engler (University of California)
15:00-15:15 pm	Break
15:15-15:45 pm	Presentation by Dr. Yamashita Akihiro (University of Calgary)
15:45-17:45 pm	Presentation by Chaperones
17：45-18：00	Check-in for the hotel
18：00-18：15	Start Poster Presentation Session
18:15-19:00 pm	Dinner
19:00-20:00 pm	Poster Presentation Session2
20:00-22:00 pm	Round Discussion with Dr.Thesleff, Dr. Engler, Dr. Yamashita and Chaperones
22:00 pm	End of the Poster Session (Remove your own Poster)

Wednesday Feb 2nd, 2011

7:00-8:00 am	Breakfast
8:00-8:30 am	Check out
8:30-11:30 am	Presentation by Chaperones
11:30-12:30 pm	Lunch
13:00-16:00 pm	Visiting The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
17:30 pm	Arrive TMDU

Tooth organogenesis and regeneration

Irma Thesleff
Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland

The process of tooth development is understood in great detail at the level of cells and genes. Dozens of important genes and molecules are known which regulate the initiation and morphogenesis of teeth as well as the formation of the dental hard tissues. Of special significance for organogenesis are interactions between the two key tissues forming the teeth, the epithelium and mesenchyme, and the molecules associated with the signal pathways regulating communication between the epithelial and mesenchymal tissues. The signal molecules of the conserved families, TGFbeta, FGF, Wnt, Hedgehog and TNF (in particular Ectodysplasin, Eda) regulate the numbers, shapes and sizes of teeth. Recent work has indicated that inhibitors with regulate signalling activity, and it is thought that subtle variations in signaling networks have contributed to the differences in the dentitions and tooth morphologies between vertebrate species.

The capacity to regenerate teeth has been largely lost during evolution, and it has been suggested that this is also associated with variation in signal activities, in particular in the Wnt signal pathway. Stem cells have been discovered in teeth, and in the mouse dentition they have been located in a niche in the continuous growing incisors. This bears anatomical similarities to the stem cell niches in other epithelial organs, in particular in hairs and intestine. The maintenance and differentiation of these stem cells is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and the same conserved signal molecules as tooth morphogenesis. More thorough understanding of the molecular signatures of the stem cells and the epithelial and mesenchymal tissues and their interactions will be crucial for successful bioengineering of teeth in the future.

For more information: Thesleff, I, Tummers, M.: Tooth organogenesis and regeneration. In: StemBook, 2009, http://www.stembook.org

"Touchy-Feely" Stem Cells: Lessons for Regenerative Medicine from Matrix Biology

Adam J Engler
Dept. of Bioengineering
University of California, San Diego; La Jolla, CA USA

Mesenchymal stem cells (MSCs) are responsive to the physical properties of their adjacent extracellular niche, e.g. stiffness, which varies dramatically during development and between tissues and drives stiffness-based differentiation into muscle and bone. MSCs have also recently been used to repair myocardial function post-infarct, but this treatment has had limited success, in part due to MSC calcification within the heart wall from a stiffening 3-fold from the infarct scar. Using biopolymers which mimic developmental changes, e.g. myocardial matrix stiffening between days E2 to E13, we have recently been able to control cell differentiation versus static gels in this environment and this can play a protective role in regenerate myocardial strategies. Infarction can also induce distinct stiffness gradients, ~ 8.7 ± 1.5 kPa/mm, which could drive MSC migration. Surprisingly, MSCs appear to undergo directed migration up stiffness gradients, or "durotaxis," in physiological gradients as shallow as 1.0 ± 0.1 kPa/mm, indicating a 'differentiation hierarchy' since when given the choice MSCs will durotax into the stiffest regions of the niche and then differentiate based on niche elasticity. Developing increasingly biomimetic systems represents a new approach to tissue engineering that may better our understanding of regeneration.

In vitro cartilage differentiation reveals the risk of oncogenic transformation in human induced pluripotent stem cells.

Akihiro Yamashita[1]
Bradley Thomas[1], Guoliang Meng[1], Akitsu Hotta[2,3], James Ellis[2] and Derrick E Rancourt[1]*

1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Calgary,
2. Developmental and Stem Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada
3. Department of Reprogramming Science, CiRA, Kyoto University, Kyoto, Japan

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are attractive cells for regenerative medicine. However, iPSCs may have the risk of oncogenic transformation due to the use of proto-oncogenes in reprogramming, in addition to the use of viral vectors and random genomic integrations. Indeed, an incident of tumor formation was observed in mouse iPSC-derived chimeras. In this regard, chimera formation is a useful approach for oncogenic potential in mouse iPSCs. Unfortunately, this risk remains unclear for human iPSCs, as a useful indicator has been lacking. What is needed is a useful indicator for evaluating the risk of oncogenic transformation in human iPSCs. Here, we demonstrate how we have discovered a new way to reveal the oncogenic risk of human iPSCs using in vitro cartilage tissue engineering.

In this study, we initially used the human ESC line, H9 and iPSC line, BJ-EOS-4YA, which are derived from the 4 Yamanaka reprogramming factors, Oct3/4, Sox2, c-Myc and KLF4. Following micro-mass chondrogenic differentiation, both human ESCs and iPSCs displayed similar cell morphology. Following 6 weeks of culture, although cartilage specific histological staining and gene expression was present in cartilage derived from both cell types, upon closer inspection the presence of mucous glands/adenocarcinoma-like cysts was detected within iPSC-derived cartilage. The pro-oncogenic/pluripotency genes, c-Myc and Lin28, were up-regulated in iPSCs in comparison to ESCs. These results indicate that certain human iPSCs may have pro-oncogenic/adenocarcinoma potential and reveal their risks following differentiation into cartilage.

Considering the aforementioned observations, cartilage tissue engineering can be an excellent model for testing human iPSC cell lines in vitro, without the need for transplantation into animals. There are several variations between iPSC lines owing to genomic insertional mutagenesis. Since safety is a foremost issue in human iPSC application, cartilage tissue engineering may provide a useful approach for evaluation of their safety.

Important information.

From the next lecture series we would like to evaluate your understanding of the lectures every week as this course would be certified as one of formal lectures of the university. Please express your opinion and submit both the following questionnaire including your short comments on the contents of lecture at the end of each lecture:

Questionnaire

1. The name of the lecturer.
2. Your name and department.
3. Evaluation of the lecture

The quality of the content of the lecture was

(excellent, good, average, relatively poor, poor)

The method of the presentations was

(excellent, good, average, relatively poor, poor)

Overall evaluation of your attitude (effort, motivation and commitment).

(excellent, good, average, relatively poor, poor)

4. Your comments or questions to the lecturer.

Thank you for your wonderful lecture regarding Molecular Mechanism underlying Regulation of bone metabolism. My question is regarding bone metabolism and vascular disease. RANKL is the bone metabolism. Do you think the RANKL has any role and function of onset and progression of vascular disease? Thanking you.

Important information.

From the next lecture series we would like to evaluate your understanding of the lectures every week as this course would be certified as one of formal lectures of the university. Please express your opinion and submit both the following questionnaire including your short comments on the contents of lecture at the end of each lecture:

Questionnaire

1. The name of the lecturer.
2. Your name and department.
3. Evaluation of the lecture

   The quality of the content of the lecture was

   (excellent, good, average, relatively poor, poor)

   The method of the presentations was

   (excellent, good, average, relatively poor, poor)

   Overall evaluation of your attitude (effort, motivation and commitment).

   (excellent, good, average, relatively poor, poor)

4. Your comments or questions to the lecturer.

   学籍への反応を見るためのプロトコールとして
   大変興味深かったです.
   また、今回、お出しした mustard oil についても、
   日本人にとっては なじみがないものなので、
   興味深いお話でした。

Reporting Discussion with Presenters participated in Harvard U. and UCSF

Questionnaire

1. The name of the presenter

   Kanako Noritake, Tomomi Nakagawa, Bai hua,

   Daisuke Miyajima Paksinee Kamolratanakul

2. Your name and department.

3. Questions to the presenter

Kanako Noritake

手続き等しっかりされていてすごいと思いました。
英語の勉強はどのようになされていますか？
私も英語の勉強をしなければいけないと思いました。

Tomomi Nakagawa

アメリカの歯科大学の写真がみられて、印象に残りました。
とてもきれいだったということで、日常的に身のまわりの
整理から、良い仕事がうまれると思いました。

Bai hua

Vicki 先生が、世界的な研究者であっても、仕事と
家庭を両立されているというお話が印象的でした。
女性研究者として、そのようなお話を聞けるのは、
とても有意義なことだと思いました。

Daisuke Miyajima

アメリカの研究はとてもハイレベルで、全然追いつけない
ものというイメージがありましたが、実際に行かれて、
日本の研究もハイレベルだという印象を受けたというお話
を聞き、~~dh~~ イメージが変わりました。

Paksinee Kamolratanakul

アメリカのclinicと日本の病院との違いは
どのようなところがありますか？

平成22年度

GCOEプログラム 実績報告書

CONTENTS

野田　政樹（分子薬理学分野）…… 30
田上　順次（う蝕制御学分野）…… 42
高柳　広（分子情報伝達学分野）…… 70
森田　育男（分子細胞機能学）…… 96
小村　健（顎口腔外科学分野）…… 110
春日井 昇平（インプラント口腔再生学分野）…… 130
須田　英明（歯髄生物学分野）…… 146
和泉　雄一（歯周病学分野）…… 170
柳下　正樹（硬組織病態制御学）…… 190
山口　朗（口腔病理学分野）…… 210
森山　啓司（顎顔面矯正学分野）…… 230
四宮　謙一（整形外科学分野）…… 256
宮坂　信之（膠原病・リウマチ内科）…… 266
宗田　大（運動器外科分野）…… 298
秋吉　一成（有機材料分野）…… 330
稲澤　譲治（分子細胞遺伝学分野）…… 346
三木　義男（分子遺伝分野）…… 356
石野　史敏（分子生物学分野）…… 372
澁谷　浩司（分子細胞生物学分野）…… 388
小川　佳宏（分子代謝学分野）…… 400
荻原　正敏（形質発現分野）…… 414
水島　昇（細胞生理学分野）…… 426
中川　一路（細菌感染制御学分野）…… 446

分子薬理学

野田 政樹

医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻
分子薬理学・教授

1）研究の課題名

1. ナノゲルドラッグデリバリーシステムを用いた、プロスタグランジンE2受容体特異的アゴニスト（EP4A）とBMPの骨損傷修復における効果に関する分子骨代謝学的研究。

Molecular bone metabolism study on the effects of prostaglandin E（2）receptor（EP4）specific agonist in combination with low dosage of bone morphogenetic protein on bone defect repair.

大型骨欠損に対しての低用量のBMPにプラスタグランディンEP4受容体アゴニストであるEP4Aを加えることにより、自然治癒しない大型骨欠損を修復できる事を示した。

2. クロック遺伝子Per-1の骨芽細胞の副甲状腺ホルモン（PTH）シグナリングにおける役割の解明。

Role of Clock gene Per-1 for parathyroid hormone signaling in osteoblasts.

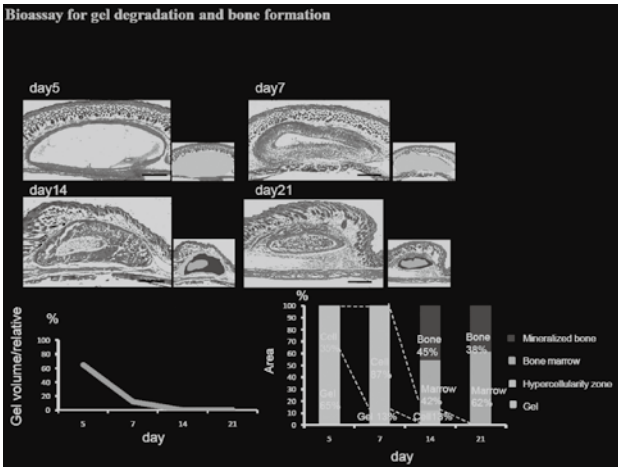
骨芽細胞におけるPTHシグナリングは、in vivoにおいて、一部転写制御を通じて骨同化作に付随したPer-1遺伝子発現を活性化させることを明らかにした。

3. Schnurric-2 の閉経後骨粗鬆症モデルにおける役割の検討

The role of Schnurric-2 on post-menopausal osteorosis model

骨量の卵巣摘除動物における応答に関して、骨形態計測によりSchnurri-2の役割を検討した。その結果、Schnurri-2が骨量調節に関与することを明らかにした。

2）



3）研究内容の英文要約

Critical size bone defect that does not heal spontaneously can be repaired by nanogel-based drug delivery of Prostaglandin E2 Receptor（EP4）agonist in combination of low dosage of BMP. PTH signaling in osteoblasts was found to activate expression of a clock gene Per-1 in association with its anabolic action.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

基礎研究としての骨芽細胞の分化の進展と共に、その再生医学に向けたナノゲルの応用についての拠点内の基礎分野間での研究が進展したと共に、臨床科として歯周病学、矯正歯科学、口腔外科学や内科学との共同研究がさらに推進され、研究拠点体制が多面的に形成され研究が進展した。

B（研究教育環境）

拠点内におけるイノベーションや海外研究者の招聘、さらには、大学院生の海外への派遣による発表

のみならず、海外の若手に対する大学院生の教育経験が積まれ、これまでの蓄積としての英語による毎週の総合プレゼンテーション並びに、学生若手による内部評価や、国際外部評価も進展し研究教育環境が整えられ、研究教育環境の整備がさらに推進された。

C（人材確保）

GCOEのシャペロン教員として採用した研究者の研究が推進されると共に大学院生として新たな人材を登用し、これにより大学院の育成拠点としての若手の研究・人材の確保が行われた。本年はさらに、事業推進担当者として水島教授、中川教授の参加が得られ、推進担当者の連携体制がさらに拡充された。

D（人材育成）

若手研究者としてのシャペロンの育成においては、拠点内の競争的研究費の獲得や、研究費を獲得する為のグラントライティング指導、さらには、拠点内の大学院生の新たなグループや一年ごとの複数教授による評価とこれに基づく適切な研究支援や経済支援が行われ人材育成が進展した。

E（国際化）

育成する大学院生および、若手研究者やその50%が外国籍であり、国際的な環境での大学院生の教育育成が進展した。また、海外の著名研究者も16名招聘され、国際シンポジウムを開催するなど、国際化的環境における、研究拠点の形成が進展した。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

若手育成の国際化並びに個々の若手研究者の個性ある育成環境の設定、並びに拠点の研究の世界的な発信と高いレベルの研究の確立に力を入れた。

6）英文原著論文

1. ◎Kamolratanakul P, Hayata T, Ezura Y, Kawamata A, Hayashi C, Yamamoto Y, Hemmi H, Nagao M, Hanyu R, Notomi T, Nakamoto T, Amagasa T, Akiyoshi K, Noda M. Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E (2) receptor (EP4) specific agonist in combination with low dosage of growth factor heals critical size bone defect. Arthritis Rheum (in press).
2. ◎Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Kronenberg H, Kaneko K, Kurosawa H, Ezura Y, Noda M. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. J Cell Biochem 112:433-8, 2011.
3. ◎Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y, Noda M. Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. J Cell Physiol 226:573-8, 2011.
4. Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y. Osteopontin deficiency impairs wear debris-induced osteolysis via regulation of cytokine secretion from murine macrophages. Arthritis Rheum 62:1329-37, 2010.
5. Nifuji A, Ideno H, Ohyama Y, Takanabe R, Araki R, Abe M, Noda M, Shibuya H. Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. Exp Cell Res 316:1127-36, 2010.
6. ◎Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. J Cell Biochem 109:866-75, 2010.

7）総説ならびに著書

(英文)

- Masaki Noda, Editor, Mechanosensing Biology, Springer, 2011
- Masaki Noda, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi, and Yoichi Ezura, Mechanical Stress and Bone, Mechanosensing Biology, Editor (Masaki Noda), 2011.

(和文)

- 野田政樹、長尾雅史、羽生亮、溝口史高、納富拓也、早田匡芳、中元哲也、江面陽一　Clinical Calcium 神経と骨、Vol.20 No.12 pp1801-1805, 2010年
- 野田政樹　ORTHO-VIEWS「骨粗鬆症の病態生理」No.12 P2-P4

8）特許取得、特許申請

名称：「骨形成促進物質とナノゲルを含有する
　　骨形成用生体材料」
日本：特願2007-554906

9）平成22年度までの自己評価

研究面では基礎研究のGCOE拠点内における成果から新たな骨形成の方法論についての研究が進展し、また、臨床の分野との共同研究を推進しており、分野における大学院生が海外発表を行い、若手研究者の育成も海外との共同研究、ならびに米国骨代謝学会における受賞を含

め、拠点としての活動が進展した。

10）学会発表（英文）

1. ◎Nagao M, Ezura Y, Saita Y, Miyai K, Hanyu R, Nakamoto T, Hemm H, Hayata T, Notomi T, Ishii S,Kato S. Fukumoto S, Kurosawa H, Kaneko K, Noda M. Schnurri2-Deficiency Increases all of 1,25（OH）2D3, Renal 25-hydroxyvitamin D 1- α Hdroxylase, PTH, FGF23, Serum Calcium and Phosphate in Association with Hypercalcificationin in Joints. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 口頭。
2. ◎Nagao M, Ezura Y, Saita Y, Nakamoto T, Hayata T, Izu Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Rittling S, Kurosawa H, Kaneko K, Denhardt D, Noda M. Osteopontin Plays a Pivotal Role Sympathetic Control of Bone Mass. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 口頭。
3. ◎Ezura Y, Nagata J, Hemmi H, Nagao M, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Noda M. Unloading-induced Suppression of B-lymphogenesis and Expansion of Peripheral Monocyte/macrophage Lineage Cells is Preserved in the Mice Deficient for Osteopontin. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010.示説。
4. ◎Hanyu R, Karsenty G, Hayata T, Nakamoto T, Notomi T, Kronenberg H, Saita Y, Hemmi H, Nagao M, Ezura Y, Takeda S, Noda M. Adregergic Receptor Regulates Anabolic Action of Constitutively Active Form of PTH/PTHrP Receptor Signaling., The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
5. ◎Watanabe C, Morita M, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Noda M. Cnot3, a Novel Critical Regulator of a mRNA Stability, is Involved in the Maintenance of the Bone Mass and the Bone Structure in Senile Osteoprosis Model. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
6. ◎Kamolratanakul P, Ezura Y, Mizoguchi F, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Amagasa T, Noda M. PTH Anabolic Action is Influenced by the Deficiency of TRPV4 in Bone. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
7. ◎Sakuma T, Miyai K, Hayata T, Ezura Y, Noda M. Identification of Novel Molecule for Melanoma Malignancy- Role of CIZ. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
8. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard, a Novel BMP Inhibitor, Targets Smad1 to Suppress BMP-dependent Transcription in Mammalian Osteoblastic Cells.. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
9. ◎Miyajima D, Kawamata A, Inoue A, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Amagasa T, Yamanashi Y, Noda M. Deficiency of Dok-1 and Dok-2, Ras-Erk Pathway Inhibitors, Enhances Bone Loss in Postmenopausal Osteoprosis Model of Mice., The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
10. ◎Aryal A.C S, Hanyu R, Nakamoto T, Miyai K, Nagao M, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Hemmi H, Pawson T, Noda M. Nck1, a Molecular Adaptor Prerequisite for Cell Motility, is Stimulated by Bone Morphogenetic Protein and Contributes to Maintain Bone Mass. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
11. ◎Suzuki T, Notomi T, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Mizuno A, Suzuki M, Mizoguchi F, Izumi Y, Noda M. TRPV4（Transient Receptor Potential Vanilloid 4）, a Mechanosensor for Bone Is Required for the Maintenance of Bone Mineral Density of Mandible Exposed to Occlusal Force. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
12. ◎Nakamoto T, Motoyoshi T, Hada T, Sakuma T, Hayata T, Ezura Y, Kitazawa R, Kitazawa S, Noda M. CIZ Expression is Enhanced by Inflammatory Stimulation and Transcriptionally Regulates the RANKL Promoter. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
13. ◎Notomi T, Kuno M, Ezura Y, Noda M. Genetic Conversiion of Osteoclast Precursor to be Responsive to Light-controlled Cation Channel Activation Enhances Differentiation Upon Modulation of their Membrane Potential. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
14. Kawamata A, Yokoyama H, Izu Y, Hayata T, Erwin F. Wanger, Nakashima K, Ezura Y, Noda M, Amagasa T Ovariectomy induced bone loss was prevented by the deficiency of jund which determines osteoblastic activity and basal levels of bone mass The 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-28, 2010. 示説。

15. Ryo Hanyu, Masashi Nagao, Hisashi Kurosawa, Kazuko Kaneko, Masaki Noda, The 1st International Academy of Sportology. Tokyo, Japan, March 5, 2011.

11）学会発表（和文）

1. 長尾雅史、斎田良知、羽生亮、辺見弘明、納富拓也、早田匡芳, 中元哲也、金子和夫、黒澤尚、江面陽一、野田政樹。マウスSchcurri2欠失は腎25-hydroxyvitamin D 1- alpha hydroxylaseの発現高値と高カルシウム・リン積を呈して間接周囲の異所性石灰化をもたらす　第25回日本整形外科学会　京都　10月14-15日, 2010。
2. 羽生亮、斎田良知、長尾雅史、辺見弘明、納富拓也、早田匡芳, 中元哲也、江面陽一、竹田秀、金子和夫、黒澤尚、野田政樹。副甲状腺ホルモンによる全身性骨量増加作用は交換神経系シグナルを必要とする　第25回日本整形外科学会　京都　10月14-15日, 2010。
3. 元吉貴之、中元哲也、江面陽一、早田匡芳、納富拓也、長尾雅史、羽生亮、佐久間朋美、野田政樹。IL-1βはマウス軟骨細胞においてCIZの発現を促進する。第28回日本骨代謝学会　東京　7月21日-23日, 2010。
4. 羽田佑、中元哲也、佐久間朋美、長尾雅史、早田匡芳、江面陽一、北澤理子、北澤荘平、野田政樹。CizによるRANKLのプロモーター制御機構の解析。第28回日本骨代謝学会　東京　7月21日-23日, 2010。
5. 中元哲也、羽田佑、元吉貴之、佐久間朋美、早田匡芳、江面陽一、野田政樹。転写因子CIZの欠損は、関節炎進展を抑制する。第28回日本骨代謝学会　東京　7月21日-23日, 2010。
6. 早田匡芳、江面陽一、野田政樹。新規BMP阻害因子Dullardは、骨芽細胞においてSmad1を標的としてBMP応答性の転写を抑制する。第28回日本骨代謝学会、東京　7月21日-23日, 2010。
7. 佐久間朋美、中元哲也、宮井健太郎、辺見弘明、天笠光雄、早田匡芳、江面陽一、野田政樹。CIZは悪性黒色腫細胞の転移に促進的に働く。第33回日本分子生物学会　神戸　12月7日-10日, 2010。
8. 早田匡芳、江面陽一、西中村隆一、浅島誠、野田政樹。新規BMP阻害因子Dullardは、骨芽細胞においてBMP受容体及びSmad1の下流でBMP応答性の転写を抑制する。第33回日本分子生物学会　神戸　12月7日-10日, 2010。

12）受賞

1. Daisuke Miyajima. Plenary Poster Award. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010.
2. Paksinee Kamolratanakul. Plenary Poster Award. The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Toronoto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010.

13）外部資金の獲得状況

グローバルCOEプログラム（拠点リーダー）	
	28,412万円（2010年）
日本学術振興会研究費補助金（基盤S）	
	1,650万円（2010年）
日本学術振興会委託研究費	260万円（2010年）
日本宇宙フォーラム	300万円（2010年）
痛風財団研究助成	30万円（2010年）

14）特別講演、招待講演、シンポジウム

1. 野田政樹: 岡山大学　特別講義
   2011年1月18日
   演題: 骨形成の分子機構
2. 野田政樹: 岡山大学　大学院セミナー / ECM Society / ITPセミナー
   2011年1月18日
   演題: 骨関節疾患の基礎研究
3. 野田政樹: The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting
   2010年12月11日
   演題: Bone Formation and Extracellular Signaling
4. 野田政樹: 社団法人　日本酪農乳業協会
   第25回国際学術フォーラム
   2010年12月4日
   演題: 非荷重と骨量制御のメカニズム
5. 野田政樹: The 70th Anniversary Celebration 2010 Faculty of Dentistry Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand)
   2010年8月11日
   演題: Molecular mechanism under lying regulation of bone metabolism
6. 野田政樹: 第23回日本臨床整形外科学会学術集会
   2010年7月18日

演題: 骨粗鬆症治療薬・最新の進化

7. 野田政樹: 第83回日本整形外科学会学術総会
2010年5月29日
演題: 骨粗鬆症の基礎

8. 野田政樹: 第9回日本再生医療学会総会
2010年3月18日
演題: 骨形成の分子機構

9. 野田政樹: 第13回多摩骨代謝研究会
2010年2月13日
演題: 骨量制御の分子機構

15）主催学会

第5回国際シンポジウム
臨床経験からみた軟骨再生研究-国際比較と近未来-
2011年2月3日
東京医科歯科大学M&Dタワー大講堂

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには◯印）のリスト

准教授　江面陽一
助　教　早田匡芳
特任教員　中元哲也
国際PIシャペロン　納富拓也
ポスドク　Ying Yang
大学院生
◯Paksinee Kamolratanakul.
◯佐久間朋美
◯Smriti Aryal
◯鈴木允文
◯宮嶋大輔
渡辺千穂
川崎真希理

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など

GCOEの拠点活動の中で、共同研究の推進と共にシャペロンならびに選抜大学院生の教育がなされているが、今後についてはさらに国際的な活動の場が我が国の拠点を中核として進展が期待される。

RAPID COMMUNICATION

573

Journal of Cellular Physiology

Schnurri-2 Deficiency Counteracts Against Bone Loss Induced by Ovariectomy

MASASHI NAGAO,[1,2,3] YOSHITOMO SAITA,[1,2] RYO HANYU,[1,2,3] HIROAKI HEMMI,[1,4] TAKUYA NOTOMI,[1,3] TADAYOSHI HAYATA,[1,3] TETSUYA NAKAMOTO,[1,3] KAZUHISA NAKASHIMA,[1] KAZUO KANEKO,[2] HISASHI KUROSAWA,[2] SHUNSUKE ISHII,[5] YOICHI EZURA,[1,3,6,7]* AND MASAKI NODA[1,3,6,7]*

[1]*Department of Molecular Pharmacology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

[2]*Department of Orthopedics, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan*

[3]*Global Center of Excellence Program for the International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Disease, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

[4]*Medical Top Track Program, Medical Research Institute, Genome Research Center, Tokyo Medical and Dental University Tokyo, Japan*

[5]*Laboratory of Molecular Genetics, RIKEN Tsukuba Institute, Ibaraki, Japan*

[6]*Advanced Bone and Joint Science Program, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

[7]*Hard Tissue Genome Research Center, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

Schnurri (Shn)-2 is a transcriptional modulator of bone formation and bone resorption and its deficiency causes low turnover state with higher cancellous bone mass due to the defects in osteoclasts that exceeds the defects in osteoblasts in mice. We addressed whether such low turnover of bone remodeling in Shn2 deficiency may be modulated in the absence of estrogen that induces high turnover state in vivo. Ovariectomy reduced bone mass in wild type compared to sham operated control mice and such reduction in bone mass was also observed in Shn2 deficient mice. However, due to the high levels of basal bone mass in Shn2 deficient mice, the bone mass levels after ovariectomy were still comparable to sham operated wild-type mice. Analysis indicated that estrogen depletion increased bone resorption at similar levels in wild type and Shn2 deficient mice though the basal levels of osteoclast number was slightly lower in Shn2-deficient mice. In contrast, basal levels of bone marrow cell mineralization in cultures were low in Shn2-deficeint mice while estrogen depletion increased the mineralization levels to those that were comparable to sham wild type. This indicates that Shn2-deficient mice maintain bone mass at the levels comparable to wild-type sham mice even after ovariectomy-induced bone loss and this correlates with the high levels of mineralization activity in bone marrow cells after ovariectomy.

J. Cell. Physiol. 226: 573–578, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Bone mass levels are determined by continuous remodeling through the maintenance in the reciprocal cycles of resorption and formation under control of hormones and cytokines (Raisz, 2005; Hawse et al., 2008; Gallet and Vanacker, 2010). This bone mass level is based on the balanced actions between osteoclasts resorbing bones and osteoblasts forming bones. However, in postmenopausal women, bone resorption levels exceed those of bone formation, resulting in osteoporosis and increased bone fragility and susceptibility to fractures (Hofbauer et al., 2000; Zaidi et al., 2003; Syed and Khosla, 2005). Numerous patients are estimated to suffer from this disease in the world. Many drugs have been developed to treat osteoporosis, with many to inhibit bone resorption and only a few promoting bone formations. Treatment of osteoporosis by modulating of only one of the two processes, such as bone resorption and bone formation, in bone remodeling limits the efficacy of these drugs in restoring the remodeling balance and normal bone mass. Recent progress has identified certain genetics that lead to the loss of balance underlying pathogenesis of postmenopausal osteoporosis (Boyce et al., 1999). However, molecules involved in the determination of the levels of reduction in bone due to estrogen deficiency are not yet fully understood.

Schnurri (Shn) family is a large zinc-finger protein and they consist of three homologs (Shn1, Shn2, and Shn3) (Arora et al., 1995; Marty et al., 2000; Torres-Vazquez et al., 2000; Takagi et al., 2001; Oukka et al., 2004; Kimura et al., 2005). Among this family, Shn2 is known to involve in adipogenesis and lymphogenesis (Jin et al., 2006; Takagi et al., 2006; Nakayama and Kimura 2010). We have investigated that Shn2 is also involved in skeletal remodeling and mice lacking Shn2 showed low turnover bone remodeling by suppressing both osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption activities in physiologically state (Saita et al., 2007). However, with respect to pathological situation such as estrogen depleted situation, role of Shn2 has not been elucidated (Jones et al., 2006, 2010; Kimura et al., 2007; Iwamura et al., 2007; Tamma et al., 2009; Shukla et al., 2009). To examine the possible role of Shn2 in estrogen depleted-induced bone loss, we

*Correspondence to: Masaki Noda and Yoichi Ezura, 1-5-45 Yushima Bunkyo-ku 113-8510 Tokyo, Japan.
E-mail: noda.mph@mri.tmd.ac.jp

Received 24 October 2010; Accepted 26 October 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 10 November 2010.
DOI: 10.1002/jcp.22521

© 2010 WILEY-LISS, INC.

ovariectomized (OVX) Shn2 deficient mice and compared the bone loss to that in OVX wild-type mice.

Results and Discussion

Schnurri-2 deficient mice maintain nomal bone mass even after bone loss due to ovariectomy

In contrast to wild-type mice, where ovariectomy resulted in sparse trabecular pattern (Fig. 1A vs. B), Shn2 deficient mice did not reveal such change in the pattern (Fig. 1C vs. D). Quantification indicated that ovariectomy caused a significant reduction in bone volume per tissue volume (BV/TV) levels (Fig. 1E, Ctrl vs. OVX in WT) while Shn2 deficient mice still exhibited the levels of bone mass comparable to those in wild-type control (sham-operated) mice even after the ovariectomy-induced reduction in BV/TV (Fig. 1E, Ctrl vs. OVX in KO). The base line levels of BV in control (sham-operatede) Shn2 deficient mice were higher than those in wild-type mice (Fig. 1E, Ctrl · WT vs. OVX · KO). To examine the structural parameters in addition to BV/TV levels in Shn2 deficient mice, we further analyzed micro CT data. Although both trabecular thickness and trabecular number (Tb.N) were reduced by ovariectomy, these parameters in OVX Shn2 deficient mice were comparable to those in with-sham mice (Fig. 1F,G). Ovariectomy enhanced the levels of trabecular separation (Fig. 1H) and trabecular spacing (Fig. 1I). While these parameters were also enhanced in Shn2 deficient mice, the final levels were comparable to those in wild-sham type mice.

Shn2-deficient mice and wild-type mice were comparable in body weight and showed no significant difference in body weight gain during the 4 weeks experimental period (Fig. 2A), although the OVX mice tended to gain more weight compared with the respective sham group mice. To confirm the estrogen status in the OVX or sham-operated mice, the uterine wet weight was measured 4 weeks after ovariectomy. Ovariectomy significantly decreased the uterine weight by 75% of both Shn2 deficient mice and WT mice (Fig. 2B). Shn2 deficiency had no effect on the basal levels or reduced levels of uterus weight (Fig. 2B).

We examined bone mineral density (BMD) of the whole femur. The both BMD base line of wild-type mice and Shn2 deficient mice were similar in 12 weeks old, although younger Shn2 deficient mice showed lower BMD than wild-type mice (Saita et al., 2007). The BMD of femur in wild-type mice after ovariectomy tended to be less than wild-type sham-operated mice (wild sham-mice hereafter) and such tendency was also observed after ovariectomy in Shn2 deficient mice (Fig. 2C).

To examine the effect of Shn2 deficiency on morphology of bone, 3D-μCT analysis was conducted. Previously, we reported

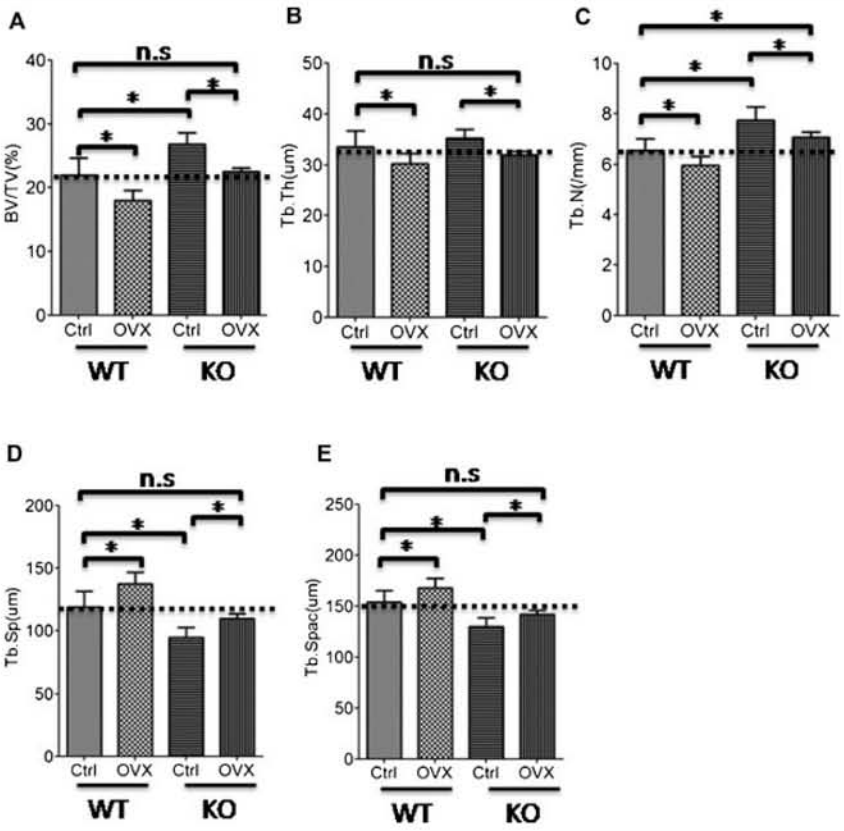


Fig. 1. Shn2 deficient mice maintain normal levels of bone mass even after ovariectomy-induced bone loss. A: Bone mass. B: Trabecular thickness. C: Trabecular number. D: Trabecular separation. E: Trabecular space. Experiments were conducted as described in Materials and Methods Section.

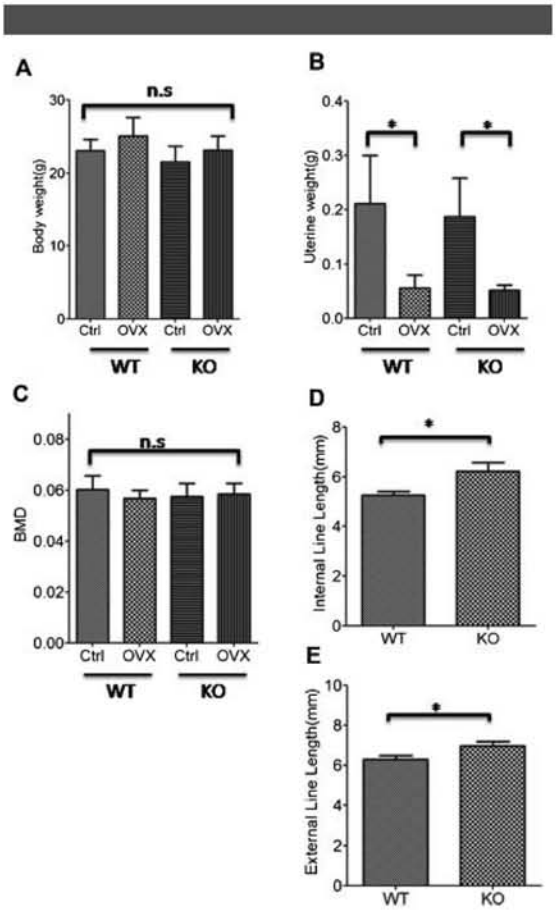


Fig. 2. Shn2 deficiency effects on body weight and BMD after ovariectomy. A: Body weight. B: Uterine weight. C: BMD. D: Internal perimeter length. E: External perimeter length. Experiments were conducted as described in Materials and Methods Section.

that Shn2 deficiency reduced cortical thickness. The 3D pictures revealed that in addition to thinner cortical thickness, both endosteal (internal) and periosteal (external) line (perimeter) length away from 300 to 800 μm of growth plate in Shn2 deficient mice were longer than those of wild type (Fig. 2D,E).

Shn2 deficient mice and wild-type mice exhibited similar increase in osteoclast number even after ovariectomy

As we have reported before Shn2 deficient mice showed impaired osteoclast formation in vivo (Fig. 3A–D). However, it has not been clarified whether osteoclast differentiation or osteoclast precursor cells number was impaired. Therefore, we examined osteoclast precursor cells number by using flow cytometry. c-kit^{+}Lin^{-}c-fms^{+} osteoclast precursor cells were counted. The levels of osteoclast precursor cell number in Shn2 deficient mice were comparable to those in wild-type mice (Fig. 3E). These data suggested that osteoclast differentiation was impaired in Shn2 deficient mice.

To obtain insights into the mechanism of Shn2 deficiency effects on estrogen deficiency-induced bone loss, we examined bone resorption parameters in vivo. Baseline levels of osteoclasts number (N.Oc/BS) are impaired and osteoclasts surface (Oc.S/BS) are tend to be lower, but statistically similar in Shn2 deficient mice (Fig. 3F,G). Although ovariectomy-induced increase in N.Oc/BS and Oc.S/BS in both genotypes, those levels in OVX Shn2 deficient mice were comparable to those in OVX wild-type mice.

Shn2 deficient mice exhibited normal levels of in vitro mineralization even after ovariectomy

Ovariectomy-induced bone loss is contributed to increase of bone formation in addition to its enhancement of bone resorption. Thus, we analyzed bone formation by using calcein double labeling. In Shn2 deficient mice, basal levels of mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR) in the sham-operated group tended to be lower, though not statistically significant compared to those in wild-type mice (Fig. 4 A vs. C,E,F). Ovariectomy-induced tendency of increase in both MAR and BFR were also observed in Shn2 deficient mice (Fig. 4B vs. D,E,F). In OVX mice, mineralizing surfaces tended to be higher, though not significantly different in all groups (Fig. 4G).

To further analyze cell autonomous effect of estrogen depletion-induced bone loss, mineralized nodule formation assays were carried out using bone marrow cells cultured for 3 weeks after taking out cells from bone of mice subjected to ovariectomy. In Shn2 deficient mice, nodule formation in the sham-operated group were suppressed compared to those in wild-type sham-operated group. Ovariectomy-induced enhancement of nodule formation was observed in Shn2 deficient mice as seen in wild-type mice and the final levels of mineralized nodule formation were comparable to those in WT sham-operated mice (Fig. 4H–L). These data indicated that impaired bone formation activities in Shn2 deficient mice in vitro were returned to normal and this could contribute to the maintenance of normal levels of bone mass in Shn2 deficient mice even after ovariectomy.

To address molecular events, we tested the interaction of estrongen and Shn2 regarding transcriptional events by using luciferase linked to TGFbeta response element as TGFbeta may be the target of Shn2. As known before, TGFbeta enhances 3TP-luciferase activity in osteoblasts in the presence of estrogen (Fig. 5). We found that estrogen depletion enhances TGFbeta luciferase activity. This suggest the high levels of nodule formation in cultures of cells taken from OVX mice. However, the presence or the absence of Shn2 did not add much to such estrogen modulation of TGFbeta action (Fig. 5).

In discussion, the high basal levels of bone mass in Shn2 deficient mice benefited to maintain the bone mass levels to be maintained at sham wild-type levels even after ovariectomy. Thus, suppression of Shn2 action could be beneficial for the prevention of significant bone loss due to estrogen depletion. If measures to suppress Shn2 could be developed, that would serve to maintain bone mass after estrogen deficient status such as postmenopausal osteoporosis.

Materials and Methods

Animals

Shn2 deficient mice were produced as described (Takagi et al., 2001). Female BALB/c background 12-week-old Shn2 deficient mice and wild-type littermates were used for the studies for experiments. All animals were housed under controlled conditions at 25°C on a 12-h light and 12-h dark cycle. The experiments were approved by the animal welfare committee of Tokyo Medical and Dental University. All mice were sacrificed by over dosage of pentobarbital.

3D micro X-ray computed tomography (μCT) analysis

3D-μCT analysis was conducted using Scan-Xmate-E090 (Comscan Techno Co., Ltd, Sagamihara, Japan) and computer software, Tri/3D-Bon (Ratoc System Engineering Co., Ltd, Tokyo, Japan). BV/TV as well as Tb.N, and other micro-architectural

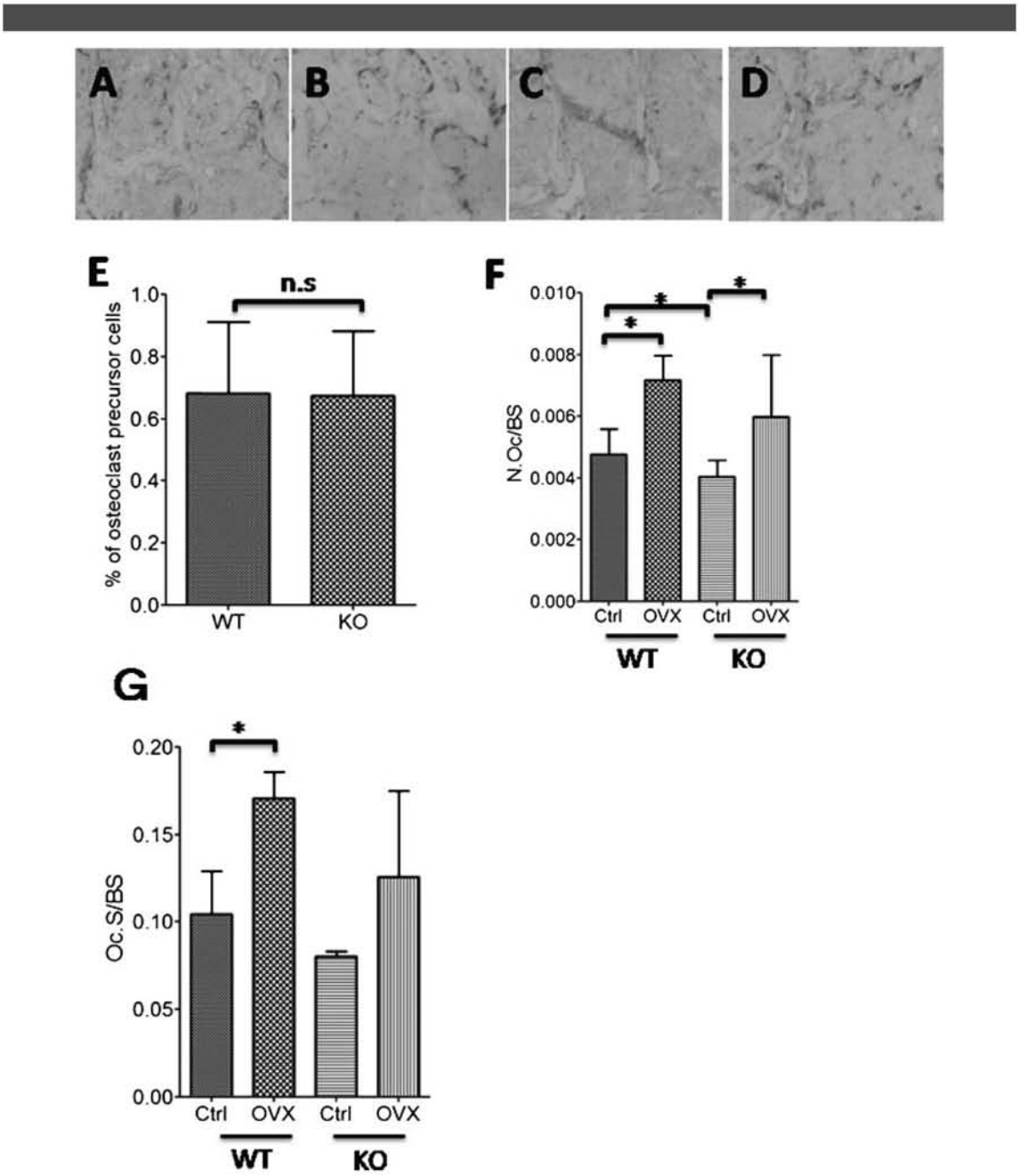


Fig. 3. Shn2 deficiency preserves ovariectomy-induced bone resorption. Osteoclasts in culture (A–D); E, percentage of osteoclast precursors; F, number of osteoclasts; G, ostoeclast surface. Experiments were conducted as described in Materials and Methods Section.

parameters were analyzed in the secondary trabecular regions from 300 to 800 μm away from the growth plate.

Bone histomorphometric analysis

Calcein labeling was conducted to estimate the levels of newly formed bone within a given time period according to the methods described elsewhere (Parfitt et al., 1987; Saita et al., 2007). Briefly, calcein (10 mg/kg body weight) was given intraperitoneally 2 and 6 days before sacrifice. Femora were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in glycomethacrylate. Sagittal histological sections were prepared and the calcein bands were visualized based on confocal laser microscopy with an excitation wave length oat 488 using and a 550 nm band-pass filter. Single labeled bone surface

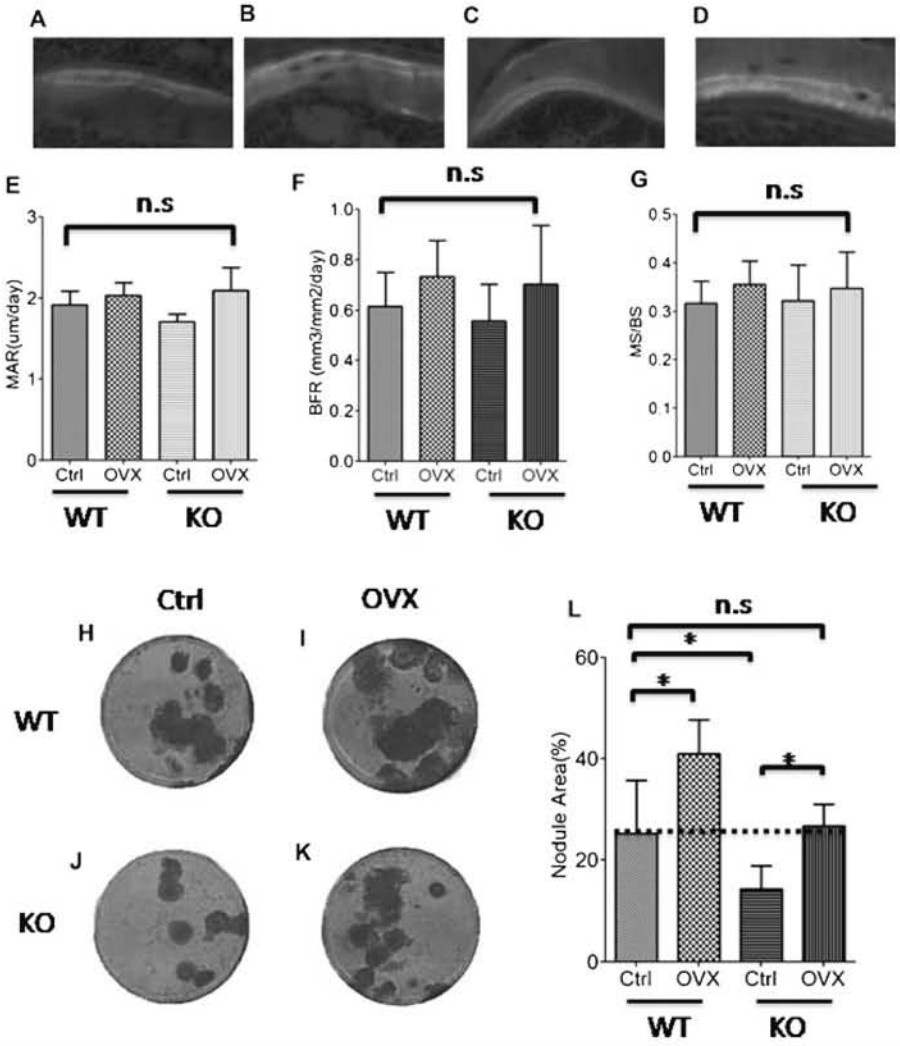


Fig. 4. Shn2 deficiency preserves ovariectomy-induced increases of bone formation. Calcein labeling pictures are presented in (A–D). E, mineral apposition rate, MAR; F, bone formation rate, BFR; G, mineralizing surface, MS; H–K, mineralization in culture; L, nodule formation. Experiments were conducted as described in Materials and Methods Section. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

(sLS), double labeled bone surface (dLS) and total bone surface (BS) were separately measured. Mineralizing surface per BS (MS/BS) was calculated as (dLS + sLS/2)/BS. The distance between the parallel calcein lines was measured to yield MAR (mm/day). BFR was obtained by multiplication of MAR and MS/BS. Histomorphometric analysis was performed by focusing on the secondary trabecular regions from 300 to 800 μm away from the growth plate of in the distal end of the femora. In the decalcified section, osteoclast number per bone surface (N.Oc/BS, N/mm) and osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS, %) were analyzed based on tartrate-resistent acid phosphatase (TRAP) staining in sagittal sections of the tibiae. Staining was performed as described previously (Mizoguchi et al., 2008). TRAP positive cells that contain one or more nuclei and are located on the surface of the trabeculae were regarded as osteoclasts. One section per animal was analyzed for these parameters.

Nodule formation assay

Bone marrow cells were obtained from wild type or Shn2 deficient mice four weeks after sham operated or OVX. The cells were cultured in the presence of ascorbic acid (50 ug/ml) and β-glycerophosphate (10 mM) in α-MEM with 10% FBS, 1% antibiotics. After 3 weeks in culture, alizarin red staining was conducted. This staining was used to visualize the calcified materials formed in vitro. Briefly, after the cultures were terminated, the cells were fixed in 100% ethanol and then were stained in alizarin red solution (1%) for 1 min. The cultures were then rinsed several times with water. The area of alizarin red positive nodules was measured by using image analyzer.

Transfection and luciferase assay

MC3T3-E1 clone4 osteoblastic cells were plated on 24-well plates at a density of 1×10^4 cells per well in phenol red free α-MEM

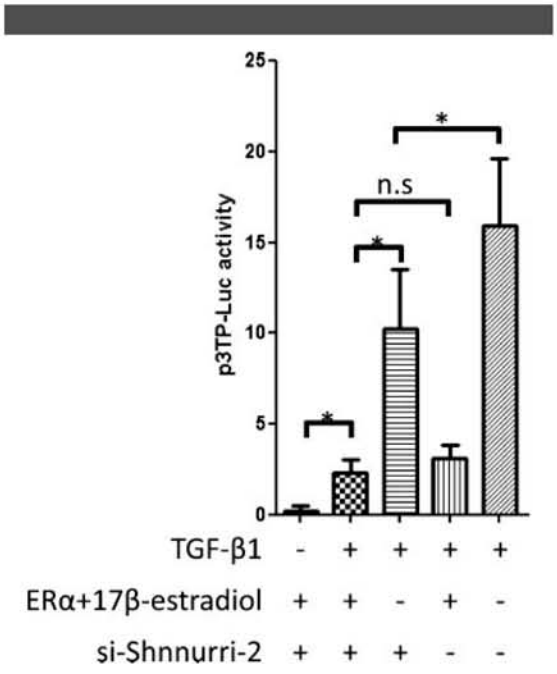


Fig. 5. 3TP-luciferase assay in response to TGFbeta, estrogen, and Shn2. Luciferase experiments were conducted as described in Materials and Methods Section.

supplemented with 10% charcoal-stripped FBS. Transfection of siRNA and plasmid DNA was performed on day 1 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA). The construct of siRNA for Shn2 was purchased from Ambion (Silencer Pre-designed siRNA). Silencer Negative Control siRNA (Ambion) was used as a control. 3TP-luciferasereporter plasmid was used to estimate TGF-β-induced transcriptional activity. Renilla luciferase reporter vector pGL4 (Promega Co., Wisconsin, USA) was used as an internal control. Empty vector (pcDNA3.1, Invitrogen Inc) was used as a control for reporter plasmids. Estrogen receptor (ER) α-plasmid was kindly provided from Dr. Shigeaki Kato (Laboratory of Nuclear Signaing, Institute of Molecular cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan). For transfection, each well received 0.2 μg of 3TP-luc plasmid DNA or control, 20 pmol of siRNA for OPN or control, and 40 ng of Renilla luciferase plasmid combined with 2 μl of Lipofectamine 2000. 17β-Estradiol (100 nM) (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA, E4389) and TGF-β1 (1 ng/ml) were added 24 h after transfection. The luciferase assay was performed using the dual luciferase reporter assay system (Promega) 24 h after TGF-β1 treatment. Luciferase activity was measured using a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Germany).

Flow cytometry

Bone marrow cells from wild-type and Shn2 deficient mice were incubated with anti-CD16/32 antibody (clone 93, eBioscience Inc, San Diego, USA) to block non-specific binding of antibodies. After washing with 2% FBS/PBS, the cells were stained with allophycocyanin-conjugated anti-c-kit (clone ACK2), hycoerythrin-conjugated anti-c-fms (clone AFS98), andfluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD11b (clone M1/70). The cells were counted by FACSCalibur (BD Biosience, USA) and CellQuest software. Data were analyzed by FlowJo software (Tree Star Inc, Oregon, USA). C-kit positive, c-fms positive and CD11b low cells were defined as osteoclast precursor cells.

Bone mineral density

BMD of the right whole femora was measured based on dual-energy X-ray absorptiometry with PIXI (GE Lunar, Madison, WI).

Statistical evaluation

Data were expressed as mean ± SD for all values. Statistical significance of the differences was evaluated based on Students' *t*-test or two way ANOVA test.

Literature Cited

Arora K, Dai H, Kazuko SG, Jamal J, O'Connor MB, Letsou A, Warrior R. 1995. The Drosophila schnurri gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. Cell 81:781–789.

Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. 1999. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. Lab Invest 79:83–94.

Gallet M, Vanacker JM. 2010. ERR receptors as potential targets in osteoporosis. Trends Endocrinol Metab 21:637–641.

Hawse JR, Subramaniam M, Ingle JN, Oursler MJ, Rajamannan NM, Spelsberg TC. 2008. Estrogen-TGFbeta cross-talk in bone and other cell types: Role of TIEG, Runx2, and other transcription factors. J Cell Biochem 103:383–392.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. 2000. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 15:2–12.

Iwamura C, Kimura MY, Shinoda K, Endo Y, Hasegawa A, Yamashita M, Nakayama T. 2007. Schnurri-2 regulates Th2-dependent airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Int Immunol 19:755–756.

Jin W, Takagi T, Kanesashi SN, Kurahashi T, Nomura T, Harada J, Ishii S. 2006. Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. Dev Cell 10:461–471.

Jones DC, Wein MN, Oukka M, Hofstaetter JG, Glimcher MJ, Glimcher LH. 2006. Regulation of adult bone mass by the zinc finger adapter protein Schnurri-3. Science 312:1223–1227.

Jones DC, Schweitzer MN, Wein M, Sigrist K, Takagi T, Ishii S, Glimcher LH. 2010. Uncoupling of growth plate maturation and bone formation in mice lacking both Schnurri-2 and Schnurri-3. Proc Natl Acad Sci USA 107:8254–8258.

Kimura MY, Hosokawa H, Yamashita M, Hasegawa A, Iwamura C, Watarai H, Taniguchi M, Takagi T, Ishii S, Nakayama T. 2005. Regulation of T helper type 2 cell differentiation by murine Schnurri-2. J Exp Med 201:397–408.

Kimura MY, Iwamura C, Suzuki A, Miki T, Hasegawa A, Sugaya K, Yamashita M, Ishii S, Nakayama T. 2007. Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. J Immunol 178:4926–4936.

Marty T, Müller B, Basler K, Affolter M. 2000. Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. Nat Cell Biol 2:745–749.

Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, Sokabe M, Miyasaka N, Suzuki M, Ezura Y, Noda M. 2008. Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. J Cell Physiol 216:47–53.

Nakayama T, Kimura MY. 2010. Memory Th1/Th2 cell generation controlled by Schnurri-2. Adv Exp Med Biol 684:1–10.

Oukka M, Wein MN, Glimcher LH. 2004. Schnurri-3 (KRC) interacts with c-Jun to regulate the IL-2 gene in T cells. J Exp Med 199:15–24.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. 1987. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Minor Res 2:595–610.

Raisz LG. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. J Clin Invest 115:3318–3325.

Saita Y, Takagi T, Kitahara K, Usui M, Miyazono K, Ezura Y, Nakashima K, Kurosawa H, Ishii S, Noda M. 2007. Lack of Schnurri-2 expression associates with reduced bone remodeling and osteopenia. J Biol Chem 282:12907–12915.

Shukla A, Malik M, Cataisson C, Ho Y, Friesen T, Suh KS, Yuspa SH. 2009. TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3. Nat Cell Biol 11:777–784.

Syed F, Khosla S. 2005. Mechanisms of sex steroid effects on bone. Biochem Biophys Res Commun 328:688–696.

Takagi T, Harada J, Ishii S. 2001. Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. Nat Immunol 2:1048–1053.

Takagi T, Jin W, Taya K, Watanabe G, Mori K, Ishii S. 2006. Schnurri-2 mutant mice are hypersensitive to stress and hyperactive. Brain Res 1108:88–97.

Tamma R, Colaianni G, Zhu LL, DiBenedetto A, Greco G, Montemurro G, Patano N, Strippoli M, Vergari R, Mancini L, Colucci S, Grano M, Faccio R, Liu X, Li J, Usmani S, Bachar M, Babl, Nishimori K, Young LJ, Buettner C, Iqbal J, Sun L, Zaidi M, Zallone A. 2009. Oxytocin is an anabolic bone hormone. Proc Natl Acad Sci USA 106:7149–7154.

Torres-Vazquez J, Warrior R, Arora K. 2000. Schnurri is required for dpp-dependent patterning of the Drosophila wing. Dev Biol 227:388–402.

Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. 2003. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. J Bone Miner Res 18:599–609.

MEMO

う蝕制御学分野

田上 順次

医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻
齲蝕制御学・教授

1）研究の課題名

う蝕象牙質に対するレジンの接着性能の改良
Improvement of bonding to caries-affected dentin

う蝕罹患象牙質に対するレジンの接着性能が低下する原因としては、特にう蝕罹患象牙質の無機成分量に低下および結晶構造の変化、管間象牙質中の水分量の増加、象牙質コラーゲン性状の変化などが考えられている。特に、Self-etch接着システムでは健全象牙質とのスミヤー層構造・成分の違いも原因のひとつとして考えられる。すなわち、う蝕罹患象牙質スミヤー層における有機成分比率の増加により、健全象牙質のスミヤー層と比べ溶解・除去されにくく、レジンモノマーの象牙質への浸透を妨げている可能性がある。

これまでの研究により6%NaOCl水溶液を応用し、う蝕罹患象牙質スミヤー層表層の有機成分を除去したところ、Self-etch接着システムのう蝕罹患象牙質に対する接着性能を向上させることが可能であることが判明した。しかしながら、酸化効果を持つNaOCl水溶液で長時間、処理した場合、レジンの重合反応（酸化-還元反応）を阻害してしまい、健全象牙質に対するレジンの接着性能が低下した。そこで、NaOCl水溶液処理後に抗酸化剤（還元剤）による処理を追加することを試み、第一歩として健全象牙質を用いて、酸化剤の種類およびその処理時間に関し、検討を行った。

さらにNaOCl水溶液は、口腔内での使用に関し安全性に関し問題を有しているので、有機質溶解作用を示すが安全性の高い弱酸性次亜塩素酸機能水の応用を試みることとし、健全象牙質を用いて、濃度および処理時間に関する検討を行った。その結果をもとに、う蝕象牙質に対する接着強さ試験を行ったところ、弱酸性次亜塩素酸機能水ではSelf-etch接着システムにおける健全象牙質への接着性能に対する影響は少なく、NaOCl水溶液より短時間の使用で、う蝕罹患象牙質に対するSelf-etch接着システムの接着性能の向上効果が発現することが示唆された。

Super Toothの創生ー接着界面のナノ微細構造の解析
Creation of "Super Tooth" - Nano-assessment of adhesive-tooth interface

象牙質とレジンとの接着メカニズムは、これまで接着界面における樹脂含浸層の形成によるものとして説明されてきた。しかし、セルフエッチングシステムの場合、樹脂含浸層の下にもう一層う蝕に抵抗する層（酸ー塩基抵抗層）の存在が明らかとなった。この層は象牙質と構造が類似しており、アパタイト結晶を含み、接着によって象牙質が化学的に強化された層と考えることができ、Super Dentinと命名されている。Tsujimotoらは、この層の化学的性質について明らかにするため、接着界面に対する異なる酸処理を行い、SEM観察を行った。その結果、酸の種類によって形成される層の厚み、形態が異なることを明らかにした。この違いは接着材に含まれる機能性モノマーと象牙質中のハイドロキシアパタイトとの化学結合の違いによるものであることが推察された。

一方、接着材とエナメル質との接着界面に関する酸ー塩基処理後の形態の観察についてはこれまで検討されていない。Liらは、セルフエッチングシステムとエナメル質における接着界面の観察を行い、酸ー塩基処理後の接着界面にSuper Enamelの形成を世界に先駆けて報告した。さらに、機能性モノマーとしてリン酸エステル系モノマーであるMDPとPhenyl-Pを含む試作接着材を用いて検討したところ、MDPを含む接着材では良好なSuper Enamelの形成が観察されたのに対し、Phenyl-PではSuper Enamelの形成が不十分であることもわかった。

以上のことより、象牙質、エナメル質ともに接着技術

を用いて歯質表面の強化が可能であることが明らかとなり、さらに接着材に含まれる機能性モノマーの選択とそのハイドロキシアパタイトとの化学結合の状態がSuper Toothの創生に非常に重要であることがわかった。

薄膜コーティング材料による歯質接着性の向上と歯の保護

Enhancement of adhesion and protection of tooth using thin film coating materials

間接法では、切削によって露出した象牙質の取り扱いが問題となってきたが、接着材料を象牙質表面に塗布してコーティングすることによって、歯髄を保護し、レジンセメントの象牙質接着性の向上や修復物の封鎖性の向上させることが可能となった。Takahashiらは、オールインワン接着システムが薄膜を形成することに注目し、薄膜コーティング材料を用いたレジンコーティングによるレジンセメントの象牙質接着性について検討した。その結果、薄膜コーティングを2コートすることによって10ミクロン前後の薄膜が形成され、象牙質に対する接着性も著しく向上することを明らかにした。

一方、これらの薄膜コーティング材の臨床応用の可能性として、露出根面にコーティングすることによって露出歯根面に対するう蝕予防や、健全エナメル質に対する病的なTooth Wearを防ぐ可能性がある。これまで露出歯根に対してオールインワン接着システムを用いてコーティングした場合、10ミクロン程度の薄膜コーティングにもかからわず、根面象牙質の脱灰抑制に著しい効果を占めすであることがわかっている。さらに人工口腔装置を用いたバイオフィルムの付着実験の結果から、根面コーティングは、象牙質に対するバイオフィルムの付着量を著しく減少させることがわかった。そこで丸藤らは、薄膜コーティング材料の歯ブラシ摩耗に対する耐久性について検討した結果、歯ブラシ摩耗10000回（1年間の歯ブラシ摩耗に相当）後でも、コーティング材は象牙質表面に残存することが確認された。

我々はコーティング材表面の高機能化に関する一連の研究を行っている。Kondoらは、PMMAの球状フィラーを添加した新しいコンポジットレジンを試作し、その理工学的な性質について検討した。その結果、少量（2%以下）のPMMAフィラーを添加することによってコンポジットレジンの圧縮強さの著しい向上が認められた。本材料を根面コーティング材に応用すれば、より耐摩耗性の高い材料の開発が可能であることを示唆した。

咬合面う蝕の診断における波長走査型光干渉断層計（SS-OCT）の有効性

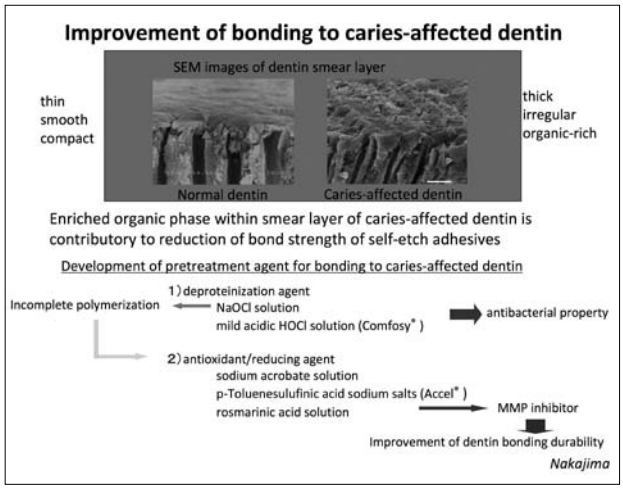
Validation of swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) for the diagnosis of occlusal caries

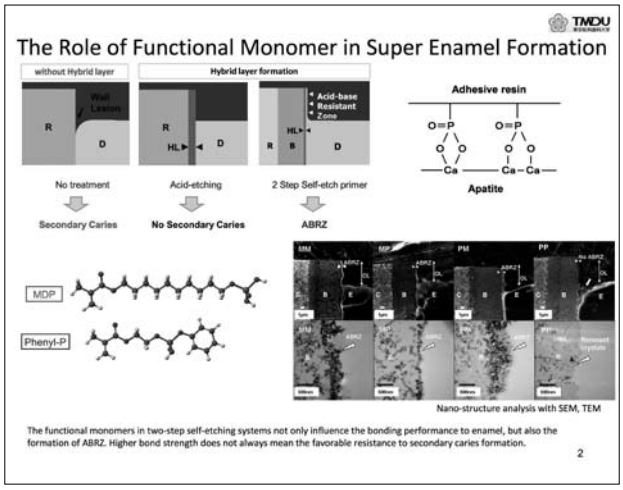
光干渉断層計（Optical Coherence Tomography, OCT）は、2つの異なる光路をもつ光が合波した時に生じる干渉を利用して、画像を構築する技術であり、電離放射線を用いずに、組織の断層画像を、高い精度で観察できるため、非侵襲的な医療撮影技術として注目を集めている。

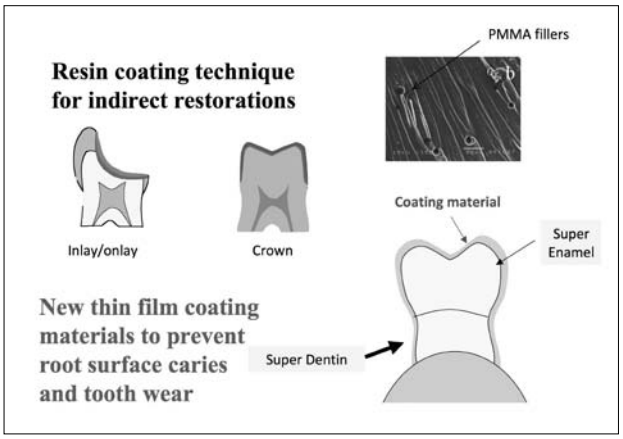
世界に先駆けて、歯科用OCTの開発を目指し、特に干渉シグナルをフーリエ変換して画像構築し、解像度を格段に向上させたFD-OCT（Fourier domain OCT）の中で、近赤外光を超高速で走査し、光波長領域の光干渉信号を処理する波長走査型のSS-OCT（swept-source OCT）を用い、咬合面う蝕の観察を行った。咬合面う蝕を有するヒト抜去歯を用いて、従来から行われている視診による診断と、SS-OCT画像による診断を行い、その後、実際に裂溝部を半切し、レーザー顕微鏡にて拡大観察した結果と比較した。

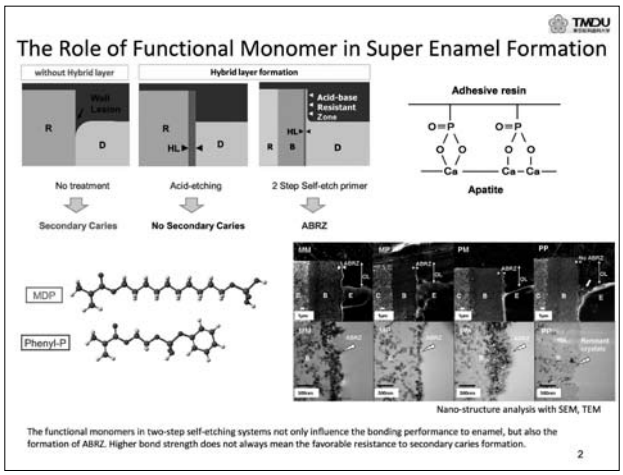
結果、視診では、咬合面う蝕の感度は0.8（う蝕と診断したものが、真にう蝕に罹患していた確率）であったのに対し、SS-OCTでは0.98と有意に高く、また、特異度は（う蝕に罹患していない歯と診断したものが、真にう蝕ではなかった確率）、視診0.69に対し、OCTでは0.75と、有意に高かった。

2)









3) 研究内容についての英文要約

Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin

This study investigated the use of 3.8% silver diamine fluoride ($Ag[NH_3]_2F$) as an antibacterial agent against Enterococcus faecalis biofilms and its ability to penetrate dentinal tubules by the formation of silver salts. Biofilms were generated on membrane filter discs and subjected to 15-minute and 60-minute exposure times with 3.8% Ag（NH3）2F, saturated Ca（OH）2, 5.25% NaOCl（negative control）, and 0.9% NaCl（positive control）. Cleaned and shaped radicular dentin were applied with Ag（NH3）2F for 24, 48, and 72 hours. The presence of silver salts on the dentin surface was examined using low-pressure scanning electron microscopy. Both NaOCl and Ag（NH3）2F were effective against E. faecalis biofilms, with no significant difference in reduction of microorganisms for both exposure times. Silver deposits were present on 66.5% of the radicular dentin surfaces after 72-hour application of Ag（NH3）2F as simulated interappointment dressings. Penetration of the silver deposits was observed at most 40 microm into dentinal tubules after smear layer removal. $Ag(NH_3)_2F$ has potential to be used as an antimicrobial root canal irrigant or interappointment dressing, especially in locations in which potential browning/blackening of dentin by metallic silver is not a major concern.

The effect of the dentin preparation with an ultrasonic abrasion on the microtensile bond strength of self-etch adhesive systems

This study evaluated the effect of the dentin preparation with an ultrasonic abrasion on the microtensile bond strengths（μ TBS）of self-etch adhesive systems to dentin. A two-step self-etch adhesive, Clearfil SE Bond and a one-step self-etch adhesive, Clearfil S3 Bond were applied on dentin prepared with a diamond-coated round working tip, Excavus（EX, Satelec）activated through ultrasonic frequency oscillations, with a regular grit diamond bur（DB）, with a steel bur（SB）, or with a #600 grid silicon carbide abrasive paper（SiC）. Then, a composite was placed and polymerized and μ TBS was measured after 24 hours. The data were statistically analyzed. The prepared dentin was observed using an SEM. For Clearfil SE Bond, the μ TBS of EX was higher than that of DB and there were no differences among EX, SB, and SiC groups. For Clearfil S3 Bond, the μ TBSs of EX and DB were lower than those of SB and SiC. SEM observation of the dentin surfaces prepared with EX showed the thicker and uneven smear layers. It was concluded that the preparation methods of dentin was affected the μ TBS of self-etch adhesive systems.

Effect of high-power LED light curing unit on bond strength of composite resin to dentin

This study evaluated the effect of a high-power LED curing unit on the microtensile bond strength（μ TBS）of a composite resin with self-etching primer adhesives to dentin. The flat dentin surfaces of the extracted human molars were prepared. Each surface was treated with either two adhesives（Clearfil SE Bond: SE, Clearfil Tri-S

Bond: TS) and a photocure composite was placed. The adhesive and composite were photocured with a high-power LED, a conventional LED, or a halogen light curing unit. In high-power LED group, the exposure time was reduced 3 or 5s for the adhesive and 5 or 10s for the composite. The specimens were trimmed and the micro-tensile bond strengths were measured. The spectrum of the wavelength of each light curing unit was also measured. In SE group, μ TBSs of high-power LED groups were statistically lower than that of a halogen group. In TS group, there were no statistical differences in μ TBSs between halogen and high-power LED groups, when the composite was photocured for 10s. The spectrum of both high-power and conventional LED units had a single sharp peak around 465 nm. The halogen showed broad spectra. A high-power LED affected μ TBS of a composite resin with self-etching primer adhesives.

CO2 Laser Improves 45S5 Bioglass Interaction with Dentin

Bioglass 45S5 is a bioactive glass that can create a layer of calcium-phosphate crystals on mineralized hard tissues. In this study, 45S5 bioglass was mixed with phosphoric acid and irradiated with CO (2) laser and examined as a possible aid in the treatment of dentin hypersensitivity. The dentinal surface modified by the aforementioned technique was chemically and micro-morphologically examined with a field emission scanning electron microscope (FE-SEM) equipped with an energy-dispersive x-ray spectroscope (EDS), and the crystalline structures of the examined dentinal surfaces were examined by x-ray diffraction (XRD). Moreover, the mechanical properties of the newly formed layer were examined by nanoindentation. The results showed that 45S5 bioglass could occlude the dentinal tubule orifices with calcium-phosphate crystals. The application of CO (2) laser potentially improved the mechanical organization of these crystals.

Transmission of diode laser through dentin

The purpose of this study was to evaluate the transmission of a diode laser through the dentin. The dentin disks of 1 mm in thickness were obtained from five extracted human molars. The surfaces of five disks of them were parallel to the long axis of the tooth (Prl group), and the other five were perpendicular (Ppd group). The transmission of a diode laser through the dentin discs was measured by a power meter and the laser transmission ratio was calculated. The laser transmission ratio varied between 0.049 and 0.216 and the Ppd group showed higher transmission ratio than Prl group. The laser transmission was affected by the orientation of the dentinal tubules of the dentin disks.

Influence of filling technique and curing mode on the bond strengths of composite cores to pulpal floor dentin.

This study evaluated the influence of filling technique and curing mode on the microtensile bond strengths (MTBS) of composite cores to pulpal floor dentin. Access cavities of human molars with pulpal floor dentin were restored with a two-step self-etch adhesive system, Clearfil Liner Bond 2V and a composite core, Clearfil DC Core Automix, using different filling techniques and curing strategies. A flowable resin composite, Clearfil Flow FX was placed on the cured adhesive resin prior to restoration with a composite core. Packing the composite in the access cavity was performed in bulk with or without light curing or using an incremental technique with light curing. Microtensile bond strengths to pulpal floor dentin were measured after 24 hours storage in water. Light curing and incremental technique had positive effects on the MTBSs. Lining with a flowable resin composite did not significantly improve the MTBSs, however, influenced the failure mode after debonding. Non-lining and bulk filling with chemical curing strategy provided the lowest MTBS.

Microtensile bond strengths of a dual-cure resin cement to dentin resin-coated with an all-in-one adhesive system using two curing modes

This study evaluated the effect of resin coating using an all-in-one adhesive system on the dentin bond strength of a dual-cure resin cement after different curing modes. Human molars were ground to obtain flat dentin surfaces and divided into three groups: untreated as a control and resin-coated with either a single- or double-application of an all-in-one adhesive (Tokuyama Bond Force). The specimens were bonded to indirect composite disks using a dual-cure resin cement (Bistite II) activated by dual-cure or self-cure modes. Each specimen was sectioned into beams for the microtensile bond strength test. The data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's correction ($p=0.05$). Resin coating with a double-application of the all-in-one adhesive system significantly improved the bond strength of the dual-cure resin cement to dentin. In addition, dual-curing of the resin cement enhanced the bond strengths to dentin.

Thin resin coating by dual-application of all-in-one adhesives improves dentin bond strength of resin cements for indirect restorations

This study was evaluated the tensile bond strength (TBS) of resin cements to bovine dentin resin-coated with all-in-one adhesive systems. Each of the dual-polymerizing resin cements; Link Max, Clearfil Esthetic Cement, Bistite II and Chemiace II were used to bond indirect resin disks to bovine dentin, as control, or coated by single-application or by dual-application of an adhesive system from the same manufacturer; G-Bond, Clearfil Tri-S Bond, Tokuyama

Bond Force and Hybrid-Coat (n=10). After 24-hour water storage, TBSs were measured. The fracture pattern and the adhesive interface were observed using an SEM. Dual-application of the adhesive yielded significantly higher TBSs compared to control and single-application groups for all materials ($p<0.001$). From the limited information of this study, it was concluded that dual-application of all-in-one adhesive systems created a thin coating on dentin, and significantly improved the bond strengths of resin cements

The role of functional monomers in bonding to enamel: Acid-base resistant zone and bonding performance.

In 2004, Tsuchiya et al. firstly observed a zone beneath the hybrid layer when dentin was treated with Clearfil SE Bond. It is characterized by a resistance to an acid and base challenge, and different from the conventional hybrid layer and caries-inhibition zone. Therefore, it was named as "acid–base resistant zone (ABRZ)". After that, the existence of dentin ABRZ has been confirmed with some other self-etching adhesive systems. Various adhesive materials and evaluation methods were assessed with dentin and in previous studies; however, it is still unknown whether or not an ABRZ forms when enamel is treated with self-etching adhesives. Based on these considerations, the purpose of this study was to investigate the role of two functional monomers incorporated into two-step self-etching adhesives on the formation of ABRZ and enamel bonding performance by these adhesives.The findings suggested that the enamel-adhesive interface formed by MDP-containing adhesive systems remains after acid–base challenge, and may play an important role in improving bonding performance and resistance against the acid attack from the microorganisms in caries. Future study and confirmatory experiments are necessary to interpret the mechanism of ABRZ formation and the bonding performance.

Effect of PMMA filler particles addition on the physical properties of resin composite.

The aim of this study was to evaluate the effect of additional polymethyl methacrylate (PMMA) fillers on the physical properties of experimental resin composites. PMMA particles (d=30 μm) were added to an experimental methacrylate-based resin composite in five concentrations of 0, 2.0, 4.8, 9.1, and 23.1 wt%. Properties such as contact angle, water sorption and compressive strength were measured and the fractured specimens were observed with a scanning electron microscope. The results showed that a small amount (2 wt%) of additional PMMA fillers inhibited the crack propagation and enhanced compressive strengths of the resin composites, without a significant change in water contact angle of surface or increased water sorption. However, in higher portions, the mechanical properties were not improved as a debonding at the interface between untreated fillers and the matrix, or failure within the organic filler could reduce the compressive yield strength of the composite.

Ultrastructural observations of the acid-base resistant zone of all-in-one adhesives using three different acid-base challenges.

The aim of this study was to analyze the ultrastructure of the dentin-adhesive interface using two all-in-one adhesive systems (Clearfil Tri-S Bond, TB; Tokuyama Bond Force, BF) after different acid-base challenges. Three solutions were used as acidic solutions for the acid-base challenges: a demineralizing solution (DS), a phosphoric acid solution (PA), and a hydrochloric acid solution (HCl). After the acid-base challenges, the bonded interfaces were examined by scanning electron microscopy. Thickness of the acid-base resistant zone (ABRZ) created in PA and HCl was thinner than in DS for both adhesive systems. For BF adhesive, an eroded area was observed beneath the ABRZ after immersion in PA and HCl, but not in DS. Conversely for TB adhesive, the eroded area was observed only after immersion in PA. In conclusion, although the ABRZ was observed for both all-in-one adhesive systems, its morphological features were influenced by the ingredients of both the adhesive material and acidic solution.

Effects of water-storage on the physical and ultramorphological features of adhesives and primer/adhesive mixtures.

The aims of this study were to evaluate the ultimate tensile strength (UTS) and elastic modulus (E) of adhesives, and primer/adhesive mixtures after aging for 6 months in water or oil; and to compare silver uptake patterns under the TEM. A one-step self-etching adhesive (One-up Bond F: OB), two two-step self-etching primers (SE Bond: SE and Protect Bond: CP), and two etch-and-rinse systems (Single Bond: SB and Prime&Bond NT: PB) were used. Bonding and primer solutions of self-etching systems were also mixed (SE+P and CP+P). Most adhesives presented decreased UTS after water-storage. Similar or increased UTS was observed after oil storage. Except for SB, E values did not change after water-storage, but they increased after storage in oil. OB, CP+P and SE+P presented more silver uptake. The effects of water-storage were material-dependent, and significantly affected the mechanical properties and silver uptake patterns of adhesives.

Nanoleakage of current self-etch adhesives bonded to artificial carious dentin.

The purpose of this study was to evaluate the nanoleakage of one- and two-step self-etch adhesives bonded to artificial carious dentin. Deep dentin of 24 human molars was

exposed and divided into four groups. One group served as control while the others were demineralized in artificial demineralization solution for 10 minutes, 6 hours, and 24 hours. Roots were sectioned and the crowns were bonded with one- and two-step self-etch adhesives then restored with flowable composite. Specimens were exposed to intrapulpal pressure through a tube connected to a barrel filled with silver nitrate solution in total darkness for 24 hours and then sectioned into two mid-slabs that were photo-developed and prepared for nanoleakage evaluation using FE-SEM and EDX. Penetration of silver into the hybrid and adhesive layers was evaluated and compared between adhesives and dentin condition. There were statistically significant differences for both adhesives ($P < 0.05$) and dentin demineralization ($P< 0.05$) in hybrid and adhesive layers. Normal dentin interfaces revealed no or slight nanoleakage regardless of adhesive. The bonded interface treated with one-step adhesive showed significant differences between normal and demineralized dentin. A trend towards increases in nanoleakage with the increasing of the demineralization time was demonstrated.

Validation of swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) for the diagnosis of occlusal caries.

In this laboratory study, we examined the use of a swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) as a diagnostic tool for occlusal caries. One-hundred and eleven investigation sites of occlusal fissures were selected from 62 extracted teeth and examined visually using conventional dental equipment without any magnification. SS-OCT observations were carried out on the same locations as where the conventional examination had been performed. The teeth were then sectioned using a diamond saw and directly viewed under a confocal laser scanning microscope (CLSM). Presence and extent of caries was scored in each observation and the obtained results from SS-OCT and conventional visual inspection were compared with the CLSM.

SS-OCT could clearly detect the presence of enamel demineralization lesion in a tomography image synthesized based on the backscatter signal (sensitivity=0.98). Although the sensitivity for dentine caries of SS-OCT was over that of the visual inspection, the detection level was decreased to 0.60. The diagnostic accuracy of SS-OCT was better than that of the conventional visual inspection (Az values of visual inspection and SS-OCT, 0.74 versus 0.86 for enamel demineralization, 0.68 versus 0.80 for dentine caries).

Properties of injectable apatite-forming premixed cements.

The present study investigated properties of fast-setting hydroxyapatite (HA) -forming premixed alcium phosphate cements (CPCs) that initially consisted of two separate premixed pastes: (1) finely ground (1.0 μm in median size) dicalcium phosphate anhydrous (DCPA) mixed with an aqueous NaH2PO4 solution, 1.5 mol/L or 3.0 mol/L in concentration, and (2) tetracalcium phosphate consisting of combinations of particles of two different size distributions, 5 μm (TTCP5) and 17 μm (TTCP17) in median size, mixed with glycerin. Equal volume of Pastes 1 and 2 were injected into sample molds. The molar Ca/P ratio of combined paste was approximately 1.5. Cements were characterized in terms of setting time (Gilmore needle), diametral tensile strength (DTS), and phase composition (powder x-ray diffraction, XRD).

Injectable HA-forming premixed CPCs with setting times from 4 to 70 min can be prepared by using DCPA and TTCP as the ingredients. Both the NaH2PO4 concentration and TTCP particle size distribution had significant ($p < 0.01$) effects on setting time and DTS. Powder XRD analysis showed that low crystallinity HA and unreacted DCPA were present in the 1-day specimens, and the extent of HA formation increased with increasing amount of TTCP5 in the TTCP paste.

Effect of composite post placement on bonding to root canal dentin using 1-step self-etch dual-cure adhesive with chemical activation mode.

This study evaluated the effect of composite post placement and/or light-irradiation of dual-cure resin composite on adhesion to root canal dentin using the chemical activation mode of a 1-step self-etch dual-cure adhesive. Post spaces were prepared in extracted premolars. Root canal spaces were applied with Unifil Core EM Self-Etching Bond, which was chemically-polymerized, and then filled with Unifil Core EM with or without the placement of composite post. Half the specimens of each group were light-cured for 10 seconds and the other half were chemically-cured in darkness for 30 minutes. After 24 h storage, microtensile bond strengths (μTBS) at the coronal and apical regions were measured. When light-curing, placement of the composite post significantly reduced the μTBS to root canal dentin. On the other hand, when chemical-curing, there was no significant difference in μTBS between with and without placement of the composite post.

Dentin bonding durability and water sorption/solubility of one-step self-etch adhesives.

The purpose of this study was to evaluate the dentin bonding durability of three HEMA-containing one-step self-etch adhesives after one-year water storage and to measure the amounts of their water sorption/solubility. OptiBond All-In-One (OP), Bond Force (BF) and Clearfil S3 Bond (S3) were applied to the dentin surfaces according to manufacturers' instructions. Bond strengths to dentin were determined using μTBS test after water storage for 24 hours, six months, and one year. In addition, water sorption

and solubility of the polymerized adhesives were measured. The μ TBS of S3 and OP significantly decreased after one year. On the other hand, for BF there were no significant differences in μ TBS between all storage periods. There were significant differences in water sorption and solubility among the adhesives (BF>S3>OP). The initial amounts of water sorption and solubility of the three adhesives did not affect their bonding durability to dentin.

Translucency, opalescence and light transmission characteristics of light-cured resin composites.

The purpose of this study was to evaluate the translucency, opalescence and light transmission characteristics of resin composites with different thicknesses. Disks of three resin composites (Estelite, Beautifil II, Clearfil Majesty) of A2 shade were prepared in diameter of 10mm with various thicknesses (0.5mm, 1.0mmand 2.0 mm). Color was measured according to CIELAB color scale on a reflection spectrophotometer and a color haze meter, and translucency parameter (TP) and opalescence parameter (OP) were calculated. Using the distribution graphs of transmitted light intensity on a goniophotometer, diffusion factor (DF) as an indicator for a diffuse transmission property and peak gain (G0) for a straight-line transmission property were calculated. At the 0.5mm thickness, the translucency (TP) and opalescence (OP) of resin composites had a significant correlation with a diffuse transmission property (DF). When more than 1.0mm thickness of resin composites, translucency and opalescence were influenced by the thickness, in which translucency significantly decreased and opalescence significantly increased.

Effect of dentin pretreatment with mild acidic HOCl solution on microtensile bond strength and surface pH.

The purpose of this study was to evaluate the pretreatment effect of mild acidic HOCl solution on the microtensile bond strength (mTBS) of a two-step self-etch adhesive to dentin and the alteration of dentin surface pH. Thirty-nine flat ground coronal dentin specimens were divided into one control group and 12 experimental groups, which were treated with 6% NaOCl or 50, 100 and 200 ppm HOCl (Comfosy) solutions for 5, 15 and 30 s. After rinsing with running water for 30 s, all the dentin surfaces were bonded with Clearfil SE Bond according to the manufacturer' s instructions. After 24 h water storage, the bonded specimens were sectioned and trimmed to an hourglass shape with a cross-sectional area of approximately 1.0 mm2 and then subjected to the mTBS test. Thirty-six mid-coronal dentin discs were used for surface pH measurement. Dentin surface pH with or without pretreatment was examined using a pH-imaging microscope (SCHEM-100). The 50 ppm Comfosy1 pretreatments for 5, 15 and 30 s did not affect the mTBS of the two-step self-etch adhesive to dentin and dentin surface pH.

Effect of reducing agents on bond strength to NaOCl-treated dentin.

The purpose of this study was to evaluate the effect of three antioxidant/reducing agents with different application times on microtensile bond strengths to sodium hypochlorite-treated dentin. The occlusal surfaces of 24 extracted human third molars were horizontally cut to expose sound dentin. The teeth were divided into eight groups. The dentin surfaces of the teeth were treated as follows: group 1,no treatment; group 2, treated with 6% sodium hypochlorite (NaOCl) for 30s; groups 3–8, applications of 10% sodium ascorbate solution, 100 _M rosmarinic acid solution or Accel for 5 or 10 s after the same treatment as in group 2. All treated dentin surfaces were bonded with a 2-step self-etching adhesive system (Clearfil Protect Bond) and restored with a resin composite (Clearfil AP-X). After storage in water for 24 h, the bonded specimens were subjected to the microtensile bond test at a cross head speed of 1.0 mm/min. The reversal effect on compromised bonding to NaOCl-treated dentin depended upon the type of antioxidant within the short application time. Applying Accel or rosmarinic acid for 5 or 10 s improved bond strengths to NaOCl-treated dentin.

Relationship between mechanical properties of one-step self-etch adhesives and water sorption.

The purpose of the study was to evaluate the relationship between changes in the modulus of elasticity and ultimate tensile strength of one-step self-etch adhesives, and their degree of water sorption. Five one-step self-etch adhesives, Xeno IV (Dentsply Caulk), G Bond (GC Corp.), Clearfil S3 Bond (Kuraray Medical Inc.), Bond Force (Tokuyama Dental Corp.), and One-Up Bond F Plus (Tokuyama Dental Corp.) were used. The moduli of elasticity and ultimate tensile strengths of the adhesives fell significantly after water-storage. Water sorption depended on the constituents of the adhesive systems. The percent decreases in the ultimate tensile strengths of the adhesives were related to water sorption, while the percent reductions in the moduli of elasticity of the adhesives were not related to water sorption.

The clinical use of pH measurements to quantitatively monitor white spot enamel lesions.

The aim of this study was to determine whether pH measurements could be used to monitor white spot enamel lesions (WSEL) during a preventive course of care aiming to remineralise the lesions. Eight subjects with at least one WSEL were recruited. Each subject was placed on a preventive treatment program including the daily application of a CPP-ACP paste (MI paste, GC Corp., Japan) for more than 6 months. The surface pH values of

sound enamel and WSEL were monitored for up to two years using a micro-pH sensor. The visual appearance of the WSEL was monitored via digital photography, and images were analysed qualitatively on a five point scale. The relationship between the qualitative assessment of WSEL appearance and the WSEL pH was investigated using a Spearman's rho non-parametric correlation. The surface pH of the WSEL was different to that of the sound enamel surrounding it at all times. All lesions showed visual improvement as the treatment period progressed. The pH of the WSEL increased towards that of sound enamel over the course of treatment significantly correlating with the visual improvement of the lesion. Evaluating the surface pH changes of WSEL may be useful for monitoring and assessing WSEL activity.

Relationship between perception of difficulty and clinical experience of approximal composite restorations in final-year undergraduate students at Tokyo Medical and Dental University.

The aims of this study were to clarify which steps in approximal restorative procedure were difficult for the final-year undergraduate students at Tokyo Medical and Dental University, and to examine the relationship between perception of difficulty and clinical experience. At mid-term of the clinical education experience, a self-questionnaire was performed by final-year undergraduate students to clarify the difficulty of restorative procedures at the time. There were statistically significant differences in the number of clinical cases experienced at the time between students who designated the matrix application, shade selection and finishing as the easy steps and those who considered them as the difficult ones (Fisher exact test with Bonferroni correction, $p<0.05$). There was a significant difference in the total number of procedures designated as difficult between students who had treated above 15 cases and those who had fewer than 15 cases (Wilcoxon rank-sum test, $p<0.05$). In the final-year clinical education for operative dentistry, students might need to treat over 15 cases to gain confidence in performing approximal composite restorations independently.

Surface roughness and pH changes induced by soft drinks in vitro-applications of stylus profilometry focus variation 3D scanning microscopy and micro pH sensor.

This study aimed to evaluate enamel surface roughness (Ra) and pH before and after erosion by soft drinks. Enamel was exposed to a soft drink (cola, orange juice, green tea) for 1, 5 or 60 min; Ra was measured using contact-stylus surface profilometry (SSP) and non-contact focus variation 3D microscope (FVM). Surface pH was measured using a micro pH sensor. Data were analyzed at significance level of alpha=0.05. There was a significant correlation on Ra between SSP and FVM. No morphological changes to the surface were detected after various periods of exposure to green tea under FVM images. Unlike cola and orange juice, exposure to green tea did not significantly affect Ra or pH. A relationship between Ra change and surface pH after exposure to the drinks was observed. Optical surface analysis and micro pH sensor may be useful tools for non-damaging quantitative assessment of soft drinks erosion on enamel.

Effects of electrodeposited poly (ethylene glycol) on biofilm adherence to titanium.

Protein-resistant coatings have been studied for inhibiting biofilm formation on implant devices. In this study, titanium (Ti) surfaces were biofunctionalized with poly (ethylene glycol) (PEG) by electrodeposition and were evaluated as biofilm substrates under an oral simulated environment. Streptococcus gordonii, an early colonizer of oral biofilms, was inoculated on Ti and PEG-electrodeposited Ti (PEG-Ti) surfaces and was analyzed quantitatively and topographically. Streptococcus mutans supplemented with sucrose was also used to form biofilms on the surfaces of Ti and PEG-Ti for 20 h followed by sonication as a means of detaching the biofilms. The results indicated that the attachment of S. gordonii on PEG-Ti surfaces was inhibited compared with Ti, and the S. mutans biofilm was easier to be detached from the surface of PEG-Ti than that of Ti. Moreover, the presence of PEG electrodeposited on Ti surface inhibited salivary protein adsorption. The degree of detachment of biofilms from PEG-Ti was associated with the inhibition of the salivary protein adsorption, suggesting weak basal attachment of the biofilms to the electrodeposited surfaces. Therefore, controlling protein adsorption at the initial stage of biofilm formation may be an effective strategy to protect metal surfaces from bacterial contamination in various fields medical including dentistry and orthopedics.

An artificial biofilm-induced secondary caries model for in vitro studies.

The aim of this study was to establish a new in vitro model for biofilm induced secondary caries studies using an oral biofilm reactor. An approximately $2 \times 3 \times 2$ mm^3 sized dentino-enamel Class I cavity was prepared in the middle of a squareshaped specimen from the mid-labial portion of bovine incisors. The cavities were partially filled with either Clearfil AP-X with SE-Bond or Clearfil AP-X without any bond. Artificial biofilms were then formed on the resin composite filled surfaces using three species of oral bacteria in an oral biofilm reactor for 20 hours followed by 7- or 30-day incubation periods. The lesions were clearly visible on fluorescence microscopy and by scanning electron microscopy in the enamel at the interface of resin

restorations in all samples. The data from image analysis showed that the lesion size was largest in the No-bond samples with statistically significant differences ($p < 0.05$). Demineralization along the cavity wall extended deeper in No-bond compared to SE-Bond samples and penetration was significantly deeper in No-bond 30-day samples. A primary artificial secondary caries model was established using biofilms for in vitro studies and the significance of using a bonding system could also be verified.

An in vitro study to assess the efficacy of OH- ion superadded alkali-ion water in inhibiting caries and secondary caries.

This study assessed the caries and secondary caries prevention efficacy of OH- ion superadded alkali-ion water (AW) using an in vitro model. Class 1 type cavities were prepared on bovine teeth blocks and they were immediately filled with Clearfil AP-X composite with application of an adhesive system. Biofilms were formed on the specimens using three species of cariogenic bacteria inside an oral biofilm reactor for 20 hours and specimens were further incubated separately for 7 days. During the incubation period the specimens were lightly rinsed with three pH levels of AW (AW-H: 11.5, AW-M: 10.5, and AW-L: 9.5) as the experimenting functional waters and control solutions (tap water; TW: 7.5 and heart infusion broth; HI: 7.3) dividing into five groups. The progression of the developed caries and secondary caries lesions were examined using a fluorescence microscope. The caries and secondary caries were visible mainly in enamel at the edge of resin restorations in all specimens. Lesion size was smaller in AW samples compared to control samples, which was statistically significant when compared between AW-H and TW ($p<0.05$). It was suggested that AW can be used to inhibit the progression of caries and secondary caries.

Effect of C-factor on bond strength to cavity wall

The purpose of this study was to evaluate the effect of C-factor on resin composite bond strength to Class I cavity wall using various adhesive systems. Box-form occlusal cavities, 3 mm wide, 5 mm long, 2 mm deep (C-factor=3.1), were prepared on flat dentin surfaces of human molars. And control specimen walls of cavities were removed in order to make flat dentin walls for bonding (C-factor=0.2). Each specimen was restored with one of three adhesives: Clearfil Mega Bond (Kuraray Medical), Single Bond (3M ESPE) or Clearfil Tri-S Bond (Kuraray Medical); followed by bulk filling or buildup using Z100 resin composite (3M ESPE). After 600mW/cm2 for 40s light-curing, teeth were stored in the dark for 24 hours in water maintained at 37 degrees centigrade. Specimen was cut parallel to cavity floor obtaining approximately 1 mm2 beams. Control specimens were also cut obtaining beams. The Micro-tensile bond strength (μ-TBS, MPa) to flat dentin specimen, cavity wall specimen was determined. It was concluded that the bonding to cavity wall was dominated by C-factor.

Effect of primer treatment on bonding of resin cements to zirconia ceramic.

To evaluate and compare bond strengths of different primers and resin cements to silica-based and zirconia ceramics. Silica-based and zirconia ceramic specimens were ground flat with #600-grit SiC paper. The ceramic surfaces were airborne-particle abraded and then divided into 11 groups of seven each: untreated (control); and conditioned with one of the six primers in combination with a resin cement from the same manufacturer as follows: Bistite II/ Tokuso Ceramic Primer, Linkmax/GC Ceramic Primer, RelyX ARC/RelyX Ceramic Primer, Panavia F 2.0/Clearfil Ceramic Primer, and Resicem/Shofu Porcelain Primer and Resicem/AZ Primer. Stainless steel rods were bonded to the ceramic surfaces using one of the five resin cements. After 24-h water storage, the tensile bond strengths were tested using a universal testing machine. Conditioning with primers containing a silane coupling agent (all the primers except AZ Primer) significantly enhanced bond strengths of resin cements to silica-based ceramic. For zirconia ceramic, Resicem/AZ Primer exhibited significantly higher bond strength than the other groups except Panavia F 2.0/ Clearfil Ceramic Primer. The use of primers containing a silane coupling agent improved resin bonding to silica-based ceramic. On the other hand, the use of primers containing a phosphonic acid monomer or a phosphate ester monomer improved resin bonding to zirconia ceramic.

Internal coating of zirconia restoration with silica-based ceramic improves bonding of resin cement to dental zirconia ceramic.

This study was aimed to examine the tensile bond strength of resin cement to zirconia ceramic using a new laboratory technique. Sixty-four zirconia ceramic specimens were air-abraded using Al2O3 particles and divided into two groups; the control group with no pretreatment (Control), and the group pretreated using the internal coating technique (INT), in which the surface of the zirconia specimens were thinly coated by fusing silica-based ceramic and air-abraded in the same manner. The specimens in each group were further divided into two subgroups according to the silane coupling agents applied; a mixture of dentin primer/ silane coupling agent (Clearfil SE Bond Primer/Porcelain Bond Activator) or a newly developed single-component silane coupling agent (Clearfil Ceramic Primer). After bonding with dual-cured resin cement (Panavia F 2.0), they were stored in water for 24 h and half of them were additionally subjected to thermal cycling. The tensile bond strengths were tested. The INT coating technique

significantly increased the bond strengths of resin cement to zirconia ceramic, whereas thermal cycling significantly decreased the bond strengths. The use of a single-component silane coupling agent demonstrated significantly higher bond strengths than that of a mixture of dentin primer/silane coupling agent.

Why does fluorosed dentine show a higher susceptibility for caries: An ultra- morphological explanation.

Chronic endemic dental fluorosis is a malformation of teeth caused by excessive ingestion of fluoride during period of tooth development. Apatite crystallites and collagen fibrils determine the caries susceptibility related properties of dentine. Information relating the effect of dental fluorosis with dentine crystallite and collagen structure is currently unavailable. This study examined structural aberrations of apatite crystallites and collagen fibrils in human fluorosed dentine. Superficial dentine of thirty six normal (Thylstrup-Fejerskov index - 0) and thirty six severely fluorosed (Thylstrup-Fejerskov index - 7 to 9) extracted human molars from individuals living in an area which is endemic for dental fluorosis were morphologically analyzed using transmission electron microscopy with selected area electron diffraction and dynamic force microscopy.

A statistically significant enlargement in the size of crystallites was found in fluorosed dentine ($p<0.05$). These crystallites were not homogenously arranged. Selected area electron diffraction revealed a lower density of crystallites in fluorosed dentine. Randomly distributed collagen fibrils showed a less complex lay out in contrast to normal dentine tissue. Ultrastructure aberrations of the dentine explain the caries susceptibility of the tissue and suggest the necessity of special approach in dental caries treatment for patients with chronic severe endemic dental fluorosis.

Swept Source Optical Coherence Tomography for Quantitative and Qualitative Assessment of Dental Composite Restorations.

The aim of this work was to explore the utility of swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) for quantitative evaluation of dental composite restorations. The system with a center wavelength of around 1300 nm and was used to record data during and after placement of light-cured composites. The Fresnel phenomenon at the interfacial defects resulted in brighter areas indicating gaps as small as a few micrometers. The gap extension at the interface was quantified and compared to the observation by confocal laser scanning microscope after trimming the specimen to the same cross-section. Also, video imaging of the composite during polymerization could provide information about real-time kinetics of contraction stress and resulting gaps, distinguishing them from those gaps resulting from poor adaptation of composite to the cavity prior to polymerization. Some samples were also subjected to a high resolution microfocus X-ray computed tomography (μCT) assessment; it was found that differentiation of smaller gaps from the radiolucent bonding layer was difficult with 3D μCT. Finally, a clinical imaging example using a newly developed dental SS-OCT system with an intra-oral scanning probe (Panasonic Healthcare, Japan) is presented. SS-OCT is a unique tool for clinical assessment and laboratory research on resin-based dental restorations.

Non-invasive quantification of resin-dentin interfacial gaps using optical coherence tomography.

Polymerization shrinkage of light-cured dental composites may result in gap formation at the tooth-restoration interface; non-destructive assessment and monitoring of these defects are important. The aim of this study is to assess the tooth-restoration interface using a non-invasive technique; swept source optical coherence tomography (SS-OCT) and to confirm the findings with confocal laser scanning microscope (CLSM). It was found that increased SS-OCT signal intensity along the interface corresponded well to the interfacial gaps detected by CLSM. The actual gap size detected ranged from 26μm to 1.9mm in length, and the flowable composite showed highest gap formation compared to the universal composites. It was found that SS-OCT imaging technology can be used to non-invasively detect and quantify micrometer gaps at the bottom of composite restorations, and potentially become a clinical monitoring tool for composite restorations.

Marginal adaptation of self-etch adhesives by 3D swept-source optical coherence tomography.

Three dimensional imaging of a composite restoration can help in clinical decision making by the dentist. The aim of this study was to investigate the potential use of swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) as a new tool to evaluate marginal adaptation of composite restorations in class I cavities with and without a contrast agent. Cross-sectional images obtained from 3D scans of the restoration were analyzed before and after immersion into a staining solution (ammoniacal silver nitrate), used as a contrast agent. Area fraction of pixels with high brightness values at the interfacial zone was calculated using digital image analysis software. A significant positive linear correlation was found between stained and non-stained SS-OCT images. It was concluded that 3D imaging by SS-OCT can be considered as a non-invasive technique for fast detection of gaps at the restoration interface, with or without a staining solution.

Quantitative analysis of nanoleakage expression and bond strength of an etch-and-rinse adhesive to enamel and dentin: effect of increasing thermal cycling regimens

Nanoleakage studies have been introduced for qualitative assessment of interfacial seal of adhesive materials, but image analysis methods have made quantitative evaluation of nanoleakage possible, in combination with advances statistical methods. In addition, despite extensive research on dentin, little is known about nanoleakage at enamel interface. This study aimed to evaluate the effects of increasing thermal cycling regimens on bond strength and nanoleakage of an etch-and-rinse adhesive. Enamel mean bond strength was not significantly affected by thermal cycling. However, artificial aging decreased dentin bond strength. Weibull analysis indicated that the characteristic strength decreased gradually with aging in both substrates. All groups exhibited some nanoleakage, a significant increase in silver penetration compared to the baseline was observed in enamel and dentin groups (II) through (V). Nanoleakage increase was detected in a stage earlier than when a significant drop was observed in bond strength, with dentin bond being more susceptible to deterioration.

Nanoleakage expression and microshear bond strength in the resin cement/dentin interface.
Self-adhesive resin cements are the new generation of cements in dentistry. These materials do not require any surface pretreatment prior to application and rely on chemical bonding to the mineral tooth tissue; however, there are few reports on these materials. The aim of this study was to evaluate dentin sealing ability and microshear bond strength of two different resin cements. A self-adhesive resin cement (RelyX Unicem) or a resin cement with a self-etching primer (Panavia F2.0) were used in the current study. No statistically significant difference was detected in the microshear bond strength between RelyX Unicem and Panavia F2.0. However, a significant difference was detected in silver particle penetration (nanoleakage) percentage between them. While the bond strengths of the two materials were comparable, the self-adhesive resin cement may provide better dentin sealing compared to the self-etching primer resin cement.

Adhesion of epiphany self-Etch sealer to dentin treated with intracanal irrigating solutions.
Chlorhexidin (CHX) and sodium hypochlorite (NaOCl) have been used as intra canal irrigation solutions frequently, but few studies have focused on possible adverse reactions of these two common solutions, and proposed a method to overcome the problem. This in vitro study assessed the adhesion of Epiphany Self-Etch (SE) root canal sealer to dentin treated with different irrigation regimens. It was found that NaOCl decreased the bond strength of Epiphany SE sealer to dentin while the use of Na- Ascr (Sodium Ascorbate) reversed this negative effect of NaOCl. CHX had neither negative nor positive influence on the bond strength. The use of a reducing agent following application of NaOCl as an endodontic irrigating solution was beneficial to prevent adverse reactions with CHX or adhesive resins.

Effect of prophylaxis methods on surface roughness and adherence of Streptococcus mutans to giomer surfaces.
Surface attributes of a restoration play an important role in adherence of plaque bacteria. Prophylaxis methods may be involved in modification of or damaging the restoration surface. The aims of those studies were to evaluate the effect of prophylaxis methods on surface roughness and adherence of Streptococcus mutans to the surface of the newly developed generation of resins (giomers), which release fluoride due to their surface-treated glass fillers. Prophylaxis with pumice and rubber cup resulted in a significantly lower bacterial adherence compared to prophylaxis with air-powder polishing device. Polishing with air-powder is not recommended for giomer products as it increases surface roughness. Finally, bacterial adhesion was significantly higher in conventional composite groups compared to corresponding giomer groups.

4) 世界的研究拠点の形成に向けて

A（研究拠点体制）

ペンシルバニア大学歯学部（米国)、香港大学歯学部（中国)、マヒドン大学歯学部（タイ)、チュラロンコン大学歯学部（タイ)、チェンマイ大学歯学部（タイ)、ブルノ大学歯学部（チェコ共和国)、国際カトリック大学（スペイン)、西安第4軍医大学（中国)、岡山大学歯学部との間で、共同研究を継続または新たに立ち上げて、国際的な研究拠点としての体制整備に努めた。

B（研究教育環境）

各種研究設備の整備のため、獲得した外部資金や企業との委託研究による資金を充てた。分野内で調達できないものについては学外の施設の利用を推進した。特に大型放射光施設（SPring 8）により、再石灰化エナメル質部にアパタイト結晶が形成されていることが確認されたことは特筆すべき成果である。

C（人材確保）

外部資金により複数の特任教員を雇用し、特に歯の脱灰と再石灰化に関する研究と、抗MMP物質の根面う蝕の抑制効果に関する研究に取り組む学生の指導の強化および研究の推進を図った。さらに外国人研究者も多く受け入れて、大学院生と共同で研究をおこなわせることで、相互の能力開発を図った。

D（人材育成）

多くの学生を国際学会に派遣して研究発表させて、多くの研究者と討論させる機会を提供した。各研究グループと定期的なミーティングを行い、研究内容に関する議論の場を多く持つよう心掛けた。学会発表に際しては、すべての演者にリハーサルを義務付けて、分野の教員、学生全員により、プレゼンテーションの内容、形式についての改善を行った。

E（国際化）

国際学会だけでなく、海外での臨床家向けのプログラムにおいても講演を積極的に行い、現在臨床に携わる歯科医師にも当教室の研究成果を普及し、新たな留学生確保のための情報提供も行った。大学院生の約30-40%が留学生という状況を最近の5年間維持している。東アジア東南アジアだけでなく、中東からの学生も増加し、新たな国際ネットワーク形成が期待される。大学院向けの講義は長年英語で行ってきており、外国人留学生、研究者が活動しやすい環境を整備している。

5） GCOEを推進するにあたって力を入れた点

・外部資金は決して十分とはいえないが、複数の特任教員を雇用して、これまでに十分な研究指導、推進ができなかった領域をカバーした。
・できるだけ国際学会での研究発表の機会を多く提供できるよう、外部資金の獲得に努めている。
・研究拠点としてのアピールのため、臨床的なテーマのプログラムにおいても多くの講演、研究発表を行い、研究成果の臨床への貢献をアピールするよう心掛けた。

6）英文原著論文

1. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tagami J, Tay FR. Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin. J Endod 36（6）:1026-1029、2010
2. ◎Takanashi H, Hosaka K, Kishikawa R, Otsuki M, Tagami J. The effect of the dentin preparation with an ultrasonic abrasion on the microtensile bond strength of self-etch adhesive systems. Int Chin J Dent 10（1）:7-15、2010
3. ◎Nomura T, Ikeda I, Otsuki M, Tagami J. Effect of high-power LED light curing unit on bond strength of composite resin to dentin. Int Chin J Dent 10（3）:35-40、2010
4. ◎Bakry AS, Takahashi H, Otsuki M, Yamashita K, Tagami J. CO2 Laser Improves 45S5 Bioglass Interaction with Dentin. J Dent Res（in press）
5. ◎Sadr A, Shimada Y, Mayoral JR, Hariri I, Bakhsh TA, Sumi Y, Tagami J. Swept Source Optical Coherence Tomography for Quantitative and Qualitative Assessment of Dental Composite Restorations. SPIE Proc. 7884:11, 2011.
6. ◎Bakhsh TA, Sadr A, Shimada Y, Tagami J, Sumi Y. Non-invasive quantification of resin-dentin interfacial gaps using optical coherence tomography. Dent Mater（in press）
7. ◎Makishi P, Shimada Y, Sadr A, Tagami J, Sumi Y. Marginal adaptation of self-etch adhesives by 3D swept-source optical coherence tomography. J Dent（in press）
8. ◎Hariri I, Shimada Y, Sadr A, Tagami J. Quantitative Analysis of Nanoleakage Expression and Bond Strength of an Etch-and-Rinse Adhesive to Enamel and Dentin: Effect of Increasing Thermal Cycling Regimens. J Adhes Dent（in press）
9. ◎Makishi P, Shimada Y, Sadr A, Wei S, Ichinose S, Tagami J. Nanoleakage expression and microshear bond strength in the resin cement/dentin interface. J Adhes Dent. 2010 Oct;12（5）:393-401.
10. ◎Nassar M, Awawdeh L, Jamleh A, Sadr A, Tagami J. Adhesion of Epiphany Self-Etch Sealer to Dentin Treated with Intracanal Irrigating Solutions. J Endod（in press）
11. Kimyai S, Savadi-Oskoee S, Ajami AA, Sadr A, Asdagh S. Effect of three prophylaxis methods on surface roughness of giomer, Med Oral Patol Oral Cir Bucal 16（1）:e110-4, 2011.
12. Kimyai S, Lotfipour F, Pourabbas R, Sadr A, Nikazar S, Milani M. Effect of two prophylaxis methods on adherence of Streptococcus mutans to microfilled composite resin and giomer surfaces. Med Oral Patol Oral Cir Bucal.（in press）
13. ◎Shimada Y, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. Validation of swept-source optical coherence tomography（SS-OCT）for the diagnosis of occlusal caries. Journal of Dentistry 38（8）: 655-665, 2010.
14. Shimada Y, Chow LC, Takagi S, Tagami J. Properties of injectable apatite-forming premixed cements. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology 115（4）: 233-241, 2010.
15. ◎Nayif M M, Shimada Y, Ichinose S, Tagami J. Nanoleakage of current self-etch adhesives bonded to artificial carious dentin. American Journal of Dentistry 23（5）: 279-284, 2010
16. ◎Okuma M, Nakajima M, Hosaka K, Itoh S, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Effect of composite post placement on bonding to root canal dentin using 1-step self-etch dual-cure adhesive with chemical activation mode. Dental Materials Journal 29（6）: 642-648, 2010.
17. ◎Itoh S, Nakajima M, Hosaka K, Okuma M, Takahashi M, Shinoda Y, Seki N, Ikeda M, Kishikawa R, Foxton

RM, Tagami J. Dentin bonding durability and water sorption/solubility of one-step self-etch adhesives. Dental Materials Journal 29（5）: 623-630, 2010.
18. ◎Arimoto A, Nakajima M, Hosaka K, Nishimura K, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. Translucency, opalescence and light transmission characteristics of light-cured resin composites. Dental Materials 26（11）: 1090-1097, 2010.
19. ◎Kunawarote S, Nakajima M, Shida K, Kitasako Y, Foxton RM, Tagami J. Effect of dentin pretreatment with mild acidic HOCl solution on microtensile bond strength and surface pH. Journal of Dentistry 38（3）: 261-268, 2010.
20. ◎Prasansuttiporn T, Nakajima M, Kunawarote S, Foxton RM, Tagami J. Effect of reducing agents on bond strength to NaOCl-treated dentin. Dent Mater in press.
21. ◎Hosaka K, Nakajima M, Takahashi M, Itoh S, Ikeda M, Tagami J, Pashley DH. Relationship between mechanical properties of one-step self-etch adhesives and water sorption. Dent Mater. 26（4）:360-367. 2010
22. ◎Tanaka Y, Matin K, Gyo M, Okada A, Tsutsumi Y, Doi H, Nomura N, Tagami J, Hanawa T. Effects of electrodeposited poly（ethylene glycol）on biofilm adherence to titanium. J Biomed Mater Res A 95（4）: 1105-13, 2010.
23. ◎Hayati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J and Matin K. An artificial biofilm-induced secondary caries model for in vitro studies. Aust Dent J（in press）.
24. ◎Uchida R, Matin K, Tagami J. An in vitro study to assess the efficacy of OH- ion superadded alkali-ion water in inhibiting caries and secondary caries. Asian Pac J Dent 11（in press）.
25. ◎Waidyasekera K, Nikaido T, Weerasinghe DDS, Watanabe A, Ichinose S, Tay F, Tagami J. Why does fluorosed dentine show a higher susceptibility for caries: An ultra- morphological explanation. J Med Dent Sci 57:17-23、2010
26. ◎Kitayama S, Nikaido T, Takahashi R, Lei Z, Ikeda M,Foxton RM, Sadr A, Tagami J. Effect of primer treatment on bonding of resin cements to zirconia ceramic. Dent Mater 26（5）:426-432、2010
27. ◎Kitayama S, Nikaido T, Ikeda M, Sadr A, Miura H, Tagami J. Internal coating of zirconia restoration with silica-based ceramic improves bonding of resin cement to dental zirconia ceramic. Biomed Mater Eng 20（2）:77-87、2010
28. ◎Li N, Nikaido T, Takagaki T, Sadr A, Makishi P, Chen J, Tagami J. The role of functional monomers in bonding to enamel: Acid-base resistant zone and bonding performance. J Dent 38（9）:722-730、2010
29. ◎Takahashi R, Nikaido T, Ariyoshi M, Foxton RM, Tagami J. Microtensile bond strengths of a dual-cure resin cement to dentin resin-coated with an all-in-one adhesive system using two curing modes. Dent Mater J 29（3）:268-276、2010
30. ◎Takahashi R, Nikaido T, Ariyoshi M, Kitayama S, Sadr A, Foxton RM, Tagami J. Thin resin coating by dual-application of all-in-one adhesives improves dentin bond strength of resin cements for indirect restorations. Dent Mater J 29（5）:615-622、2010
31. ◎Ariyoshi M, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. Influence of filling technique and curing mode on the bond strengths of composite cores to pulpal floor dentin. Dent Mater J 29（5）:562-569、2010
32. ◎Kondo Y, Takagaki T, Okuda M, Ikeda M, Kadoma Y, Yamauchi J, Okada K, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Effect of PMMA filler particles addition on the physical properties of resin composite. Dent Mater J 29（5）:596-601、2010
33. ◎Tsujimoto M. Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Ultrastructural observations of the acid-baseresistant zone of all-in-one adhesives using three different acid-basechallenges. Dent Mater J 29（6）:655-660、2010
34. ◎Reis AF, Carrilho MR, Ghaname E, Pereira PN, Giannini M, Nikaido T, Tagami J. Effects of water-storage on the physical and ultramorphological features of adhesives and primer/adhesive mixtures. Dent Mater J 29（6）:697-705、2010
35. Senawongse P, Pongprueksa P, Tagami J. The effect of the elastic modulus of low-viscosity resins on the microleakage of Class V resin composite restorations under occlusal loading. Dent Mater J 29（3）: 324-329, 2010
36. ◎Kitasako Y, Cochrane NJ, Matin K, Shida K, Adams GG, Burrow MF, Reynolds EC, Tagami J. The clinical use of pH measurements to quantitatively monitor white spot enamel lesions. Journal of Dentistry 38（7）:584-90、2010.
37. ◎Kitasako Y, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. Relationship between perception of difficulty and clinical experience of approximal composite restorations in final-year undergraduate students at Tokyo Medical and Dental University. Journal of Medical and Dental Sciences、2011（in press）.
38. ◎Fujii M, Kitasako Y, Sadr A, Tagami J. Surface roughness and pH changes induced by soft drinks in vitro-applications of stylus profilometry, focus variation 3D scanning microscopy and micro pH sensor. Dental Materials Journal、2011（in press）.

7）総説ならびに著書

田上順次.機能水の歯科臨床への応用.日本歯科評論.Vol.70（4）No.810 2010.4

田上順次.OCTを用いた非侵襲断層画像審査の保存修復領域への応用
平成21年度長寿医療研究委託事業　近赤外光・レーザー等を用いた新たな歯科疾患断・治療用機器の開発に関する研究　総括・分担研究報告書.2010.3

田上順次.最終の修復処置後にしみるようになった　歯界展望.Vol.116 No.5 2010.11

8）平成22年度までの自己評価

大学院生の確保と早期に研究が開始できるような体制整備、新領域の研究指導と推進のできる特任教員の雇用、外国人留学生のと研究者の受け入れに成果を上げた。それぞれの研究テーマごとに大きな進展があり、多くの研究発表、論文発表を行った。

OCT、Super Toothなど国際的に注目される成果を上げた。

9）和文原著論文

大槻昌幸、木島峰雄、田上順次.半導体レーザーの象牙質透過性に関する研究.日レ歯誌　21（1）:18-21、2010

吉川孝子, WATTANAWONGPITAK Nipaporn, 田上順次．I級窩洞側壁部への接着強さに及ぼすC-factorの影響について．日本歯科保存学雑誌 54（1）: 2011.（印刷中）

10）学会発表（英文）

Oyanagi T, Matin K, Okada A, Tagami J. Response of Cariogenic Bacteria on Short Exposure to Hypochlorous Acid Electrolyzed-water and Mouth Washes. Ratan’s Dental 1st International Dental Conference, 2010. Dhaka, Bagladesh, Oral presentation , February 5, 2010.

◎Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Tagami J. Micro-CT Assessment of Inhibition of Enamel Demineralization by CPP-ACP Paste. 39th AADR, Washington DC, Oral presentation, March 3-6, 2010.

◎Sadr A, Mayoral JR, Shimada Y, Bakhsh TA, Cho E, Tagami J. Real-time Tomographic Monitoring of Composite Restoration Placement Using SS-OCT. 39th AADR, Washington DC, Poster presentation, March 3-6, 2010.

◎Nurrohman H, Takagaki T, Waidyasekera K, Nikaido T, Tagami J. Interfacial ultramorphology between MMA-based adhesive and dentin after acid-base challenge. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Nikaido T, Ichikawa C, Li N, Takagaki T, Yoshida Y, Suzuki K, Tagami J. Effect of functional monomers on ultrastructure of acid-base resistant zone. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Ichikawa C, Inoue G, Nikaido T, Tagami J. SEM observation of the acid-base resistant zone after long-term storage. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Li N, Nikaido T, Takagaki T, Makishi P, Chen JH, Tagami J. 10-MDP contributes to formation of acid-base resistant zone on enamel. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation , July 14-17, 2010.

◎Aoki K, Kitasako Y, Burrow MF, Ariyoshi M, Nikaido T, Tagami J. Dentin bond durability of 4-META/MMA-TBB resin cement after ten years. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Takagaki T, Nikaido T, Nurrohman H, Li N, Tagami J. The role of functional monomers in tow-step self-etching bonding systems. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

Mayoral JR, Sadr A, Shimada Y, Cho E, Sumi Y, Krejci I, Giner L, Roig M, Tagami J. Real-time gap formation of resin composites using SS-OCT during photopolymerization. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Sadr A, Hariri I, Bakhsh TA, Shimada Y, Nakashima S, Sumi Y, Tagami J. Demineralization affects refractive indices of human enamel and dentin. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Makishi P, Shimada Y, Sadr A, Sumi Y, Tagami J. Marginal adaptation of self-etch adhesives by 3D optical coherence tomography. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Nazari A, Sadr A, Nakashima S, Shimada Y, Sumi Y, Tagami J. Hydration and demineralization effects on reflectivity of enamel using SS-OCT. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Farrahi-Avval N, Sadr A, Hariri I, Nazari A, Tagami J. Orthodontic Bracket Debonding Enamel Damage Assessment Using Optical Coherence Tomography.

88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Hariri I, Sadr A, Shimada Y, Sumi Y, Tagami J. Local refractive index of human enamel and dentin by OCT. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

Nakajima Y, Miyashin M, Sadr A, Shimada Y, Tagami J, Sumi Y, Takagi Y. Optical coherence tomography for detection of experimentally formed enamel cracks. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Bakhsh TA, Sadr A, Shimada Y, Makishi P, Mayoral JR, Sumi Y, Tagami J. Comparison between SS-OCT & CLSM in assessment of restoration defects. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Takahashi R, Ariyoshi M, Nikaido T, Okano S, Nagai M, Yasue T, Ikeda M, Miura H, Takakuda K, Tagami J. Cutting efficiency of diamonod burs on zirconia ceramics. 88th IADR General Session, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.
◎Cho E, Sadr A, InaiN, Nango N, Tagami J . Regional Shrinkage Vectors of Light-Cured Composites by Micro-CT FillerTracing . 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.
Shimada Y, Sadr A, Burrow M, Kishikawa R, Ozawa N, Sumi Y, Tagami J. Diagnosis of occlusal caries using swept-source optical coherence tomography. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Okada A, Matin K, Hanada N and Tagami J. Change in 2-DE Spot-patterns of Cariogens on HClO Electrolyzed-water Treatment. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Imai K, Shimada Y, Sadr A, Tagami J, Sumi Y. Non-invasive cross-sectional visualization of enamel crack using OCT. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Ariyoshi M, Shimada Y, Sadr A, Tagami J, Sumi Y. Diagnosis of interdental cavitated caries lesions by optical coherence tomography. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Seki N, Kishikawa R, Hosaka K, Nakajima M, Tagami J. Influence of Light-irradiation Intensity on Bonding to One-step vs Two-step. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Bakry A, Otsuki M, Takahashi H, Yamashita K, Tagami J. Evaluation of New Treatment for Incipient Enamel Caries Using 45S5-Bioglass. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Nakajima M, Shinoda Y, Takahashi M, Hosaka K, and Tagami J. Effect of HEMA on dentin bonding durability of self-etch adhesives. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Takahashi M, Nakajima M, Hosaka K, Itoh S, and Tagami J. Water sorption and ultimate tensile strength of one-step adhesives. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Hosaka K, Nakajima M, Takahashi M, Sakano W, Kishikawa R, Pashley DH, Tagami J. The effect of water-sorption on the mechanical-property of self-etch adhesives. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Kishikawa R, Matin K, Oyanagi T, Gyo M, Seki N, Hosaka K, Hatayama H, Otsuki M, KatoJ, Tagami J. Bactericidal effect of TiO_2 incorporated H_2O_2 photocatalysing by 405-nm diode-laser. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Poster presentation, July 14-17, 2010.

◎Yoshikawa T, Wattanawongpitak N and Tagami J: Effect of C-factor on Bond strength to Cavity Fool / Wall. 88th General Session of IADR, Barcelona, Spain, Oral presentation, July 14-17, 2010.

◎Kunawarote S, Nakajima M, Ichinose S, Tagami J. Mild acidic HOCl solution as a pretreatment solution for caries-affected dentin: A morphological study. Annual Meeting of the Academy of Dental Materials, Trieste, Italy, Poster presentation, Oct 7-9, 2010.

◎Mayoral JR, Sadr A, Shimada Y, Cho E, Sumi Y, Krejci I, Giner L, Roig M, Tagami J. SS-OCT as alternative to Micro-CT for composites internal adaptation evaluation. Annual Meeting of the Academy of Dental Materials, Trieste, Italy, Poster presentation, Oct 7-9, 2010.

◎Sadr A, Shimada Y, Makishi P, Hariri I, Bakhsh TA. Swept source optical coherence tomography for quantitative and qualitative assessment of dental composite restorations, Lasers in Dentistry XVII, BiOS SPIE Photonics West, San Francisco, CA, USA. Oral presentation, January 23, 2011.

◎Oyanagi T, Matin K, Uchida R, Tagami J. Inhibition potential of hypochlorous-acid electrolyzed water against progression of caries. 89th General Session of IADR, San

Diego, CA, USA, Oral presentation, March 17, 2011.

◎Inoue G, Kirihara M, Tagami J. Morphological comparison of three different self-adhesive cements after acid-base challenge. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Poster presentation, March 17, 2011.
◎Mita H, Kitasako Y, Takagaki T, Tagami J. Evaluation of low erosive drink with phosphoryl oligosaccharides of calcium. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Oral presentation, March 18, 2011.

◎Takagaki T, Nurrohman H, Nikaido T, Tagami J. Relationship between functional monomer and acid-base resistant zone. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Poster presentation, March 18, 2011.

◎Natsume Y, Nakashima S, Shimada Y, Sadr A, Tagami J, Sumi Y. SS-OCT estimation of lesion depth in artificial root carious lesions. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Oral presentation, March 19, 2011.

◎Bakry AS, Tamura Y, Otsuki M, Kasugai S, Ohya K, Tagami J. Cytotoxicity of 45S5 bioglass paste used for dentin hypersensitivity treatment. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Poster presentation, March 18, 2011.

◎Hosaka K, Nakajima M, Takahashi M, Shinoda Y, Kishikawa R, Kunawarote S, Sakano W, Taweesak P, Tagami J. Microtensile Bond Strength of the newly developed one-step adhesive. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Poster presentation, March 18, 2011.

◎Hiraishi N, Sono R, Islam M.S, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of Hesperidin on Collagen and Demineralization in Root Dentin. 89th General Session of IADR, San Diego, CA, USA, Oral presentation, March 18, 2011.

11）学会発表（和文）

神原啓介、中島正俊、田上順次. 歯面処理がセルフアドヒーシブセメントの象牙質接着性能に及ぼす影響について. 第28回日本接着歯学会, 口頭発表,島根県松江市, 2010年1月23日

Waidyasekera K, Nikaido T, Nurrohman H, Tagami J. Long-term bonding durability of rot fragments bonded with self-etch adhesives and dual cure composite core material in complete vertical root fracture. 第28回　日本接着歯学会学術大会、松江、2010年1月23、24日

篠田祐子、中島正俊、保坂啓一、大槻昌幸、田上順次. 長期水中浸漬後の1-step接着システムの象牙質接着性能に及ぼすスミヤー層の影響. 第28回日本接着歯学会, 口頭発表,松江市, 2010年1月23日

有吉芽生、高橋礼奈、二階堂徹、岡野秀鑑、永井正洋、安江透、池田正臣、三浦宏之、高久田和夫、田上順次. ジルコニア切削用ダイヤモンドポイントにおける切削効率の検討第55回日本歯科理工学会学術講演会、東京、2010年4月18日

今村友美、岸綾香、大槻昌幸、田上順次.漂白処置後の色の後戻り抑制に関する研究、第21回日本歯科審美学会、八幡平市、2010年8月27日。

荒牧音、大槻昌幸、田上順次、東みゆき.マウス臼歯切削後の所属リンパ節における免疫機能分子の解析、第52回歯科基礎医学会、東京都、2010年9月21日。

夏目悠子、島田康史、中嶋省志、Sadr Alireza、田上順次、角　保徳.SS-OCTを用いた脱灰象牙質の検出に関する研究. 第132回日本歯科保存学会2010年度春季学術大会 示説,熊本 2010年6月4,5日

Sadr Alireza、田上順次、中嶋省志、島田康史、趙　永哲.SS-OCTとマイクロCTそれぞれのレジン充填評価方法の比較.第132回日本歯科保存学会2010年度春季学術大会　示説,熊本　2010年6月4,5日

Prasansuttiporn T, 中島正俊, Kunawarote S, 田上順次. Effect of reducing agents on bond strength to NaOCl-treated dentin. 第132回日本歯科保存学会, ポスター発表, 熊本, 2010年6月4-5日

趙永哲, サダル アリレザ,田上順次, 稲井紀通 マイクロCT を使ったコンポジットレジンの重合収縮挙動の観察 第132回日本歯科保存学会, ポスター発表,熊本, 2010年6月4-5日

木島峯雄,木島武尊,横瀬敏志,大槻昌幸、田上順次　新しいタイプの歯周病治療（第10報）-レーザーとプロポリスを用いて歯槽骨の造成-　第132回日本歯科保存学会, ポスター発表,熊本, 2010年6月4-5日

タウィーサックパサンスィティポン,中島正俊,田上順 次　Effect of reducing abents on bond strength on NaOCl-treated dentin　第132回日本歯科保存学会, ポスター発表,熊本, 2010年6月4-5日

山本裕也,　荒田正三,二階堂徹,田上順次　新規レジンコーティング材の評価―印象材に及ぼす影響―　第132回 日本歯科保存学会秋学術大会、熊本、2010年6月4、5日

吉川孝子、Nipaporn Wattanawongpitak、田上順次. I級窩洞窩壁への接着における
C-factorの影響. 第132回 日本歯科保存学会秋学術大会、熊本、2010年6月4、5日

マティン カイルール,暁万里子,志田嘉奈子,内田僚一郎,田上 順次. 二種電解水を用いたジェットウォッシャーのう蝕バイオフィルム制御効果. 第132回日本歯科保存学会秋季学術大会. 熊本. 2010. 6. 5

岡田彩子, マティン カイルール, 花田信弘, 田上順次. 活性酸素に影響を受ける Streptococcus mutans 菌体内蛋白質に対する二次元電気泳動法による解析. 第132回日本歯科保存学会秋季学術大会. 熊本. 2010. 6. 5

小柳岳大,マティン カイルール, 鵜鷹佐知子, 岡田彩子, 田上順次. 次亜塩素酸電解水及び市販洗口剤の短時間作用によるヒト象牙質う蝕細菌に及ぼす影響. 第132回日本歯科保存学会秋季学術大会. 熊本. 2010. 6. 5

井上剛、田上順次.　F-Ca-PO4混合液がacid-base resistant zoneの形成と接着強さに及ぼす影響、日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、熊本、2010年6月4,5日

桐原大、井上剛、二階堂徹、田上順次. 2ステップセルフエッチングシステムにおけるフッ素徐放性が接着強さとAcid-base Resistant Zoneの形態に及ぼす影響について日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、熊本、2010年6月4, 5日

矢作智花、高垣智博、二階堂徹、池田正臣、田上順次. Ⅰ級修復におけるフロアブルレジンによるライニングの効果. 日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、熊本、2010年6月4, 5日

丸藤伊織、有吉芽生、二階堂徹、田上順次. 薄膜コーティングの歯ブラシ摩耗に対する耐久性. 日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、熊本、2010年6月4, 5日

保坂啓一、中島正俊、篠田祐子、Prasansuttiporn Taweesak、Sitthikorn Kunawarote、坂野若詠、高橋真広、岸川隆蔵、田上順次.新規開発接着性レジンMTB200の象牙質接着性能.日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会（第133回）,口頭発表,岐阜市,2010年10月28日

Thitthaweerat S,　坂野若詠,　中島正俊,　田上順次. 支台築造用1ステップ化学重合型ボンド（DBC-510）の根管壁象牙質への接着性能.　第133回日本歯科保存学会, 口頭発表,岐阜, 2010年10月28-29日

坂野若詠, Prasansuttiporn T, 中島正俊, 田上順次. 新規接着修復システムLLB-2の象牙質接着性について. 第133回日本歯科保存学会, 口頭発表、岐阜, 2010年10月28-29日

ハミド・ヌロマン、二階堂徹、カンチャナ・ワイディアセケラ、高垣智博、池田正臣、田上順次. 垂直性歯根破折における3種MMA系レジンセメントの長期接着耐久性の評価. 第56回日本理工学会学術大会、岐阜、2010年10月9日、10日

北迫勇一、半場秀典、二階堂徹、田上順次. POs-Caおよびフッ素配合ガム咀嚼後のエナメル質初期う蝕の再石灰化効果および微小硬さ変化. 日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

森文彦,平石典子,大槻昌幸,田上順次　食事が安静時唾液の性状変化に及ぼす影響日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

栗林恵美,北迫勇一,マティン カイルール,田上順次　各種う蝕部位におけるう蝕除去前後のpH変化とう蝕最近叢qPCR解析　日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

平石典子,田上順次　クロルヘキシジン含有歯科メチルメタクリレートセメントの長期性抗菌作用　日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

角保徳,小澤総喜,田上順次　歯科用OCT画像診断器によるコンポジットレジン修復物の臨床評価　日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

田中智子,小林隆嗣,滝井寛,栗林隆,北迫勇一,田上順次. POs-Caおよびフッ素配合ガム咀嚼後のエナメル質初期う蝕の再石灰化効果および微小硬さ変化. 日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、岐阜、2010年10月28,29日

田野絵里、加藤 純二、大槻 昌幸、田上 順次、倉田浩志.405nm半導体レーザーの照射条件が漂白効果に及ぼす効果、第22回日本レーザー歯学会、名古屋、2010年11月13日

Perera UUKPC, Waidyasakera K, Nikaido T, Tagami J. Effect of non-vital bleaching on dentin bond strength. 58th JADR, Kitakyushu, Nov. 20-21, 2010

Hamba H, Inoue G, Nikaido T, Sadr A, Tagami J. Micro-CT assessment of remineralization by calcium, phosphate and fluoride agents. 58th JADR, Kitakyushu, Nov. 20-21, 2010

Takagaki T, Nurrohman H, Nikaido T, Tagami J. Relationship between functional monomer and acid-base resistant zone. 58th JADR, Kitakyushu, Nov. 20-21, 2010

Anbarafshan A, Matin K, 田 上 順 次. Minimum concentration of hypochlorous-acid electrolyzed water（ HEW ）as an effective bactericide inside cariogenic biofilms. 第75回口腔病学会学術大会. 東京都. 2010年12月4日

丹野恵造,平石典子,大槻昌幸,田上順次.低収縮コンポジットレジンの窩洞適合性の評価、第75回口腔病学会学術大会、東京都.2010年12月4日

高垣智博、アリレザ・サダル、アミール・ナザリ、二階堂　徹、田上順次. FIB-TEMを用いたエナメル質接着界面の新規ナノレベル解析, 第29回日本接着歯学学術大会、岡山. 2011年2月5,6日

Waidyasekera K, Nikaido T, Nurrohman H, Tagami J. Nanoleakage properties of the acid-base resistant zone 第29回日本接着歯学学術大会、岡山2011年2月5,6日

中川寿一、サダルアリレザ、島田康史、田上順次. OCTを用いたエナメル質平滑面齲蝕の評価, 第29回日本接着歯学学術大会、岡山. 2011年2月5,6日

12）外部資金の獲得状況

科学研究費補助金、 基盤C
研究題目:各種う蝕形態における罹患象牙質除去前後のpH変化とう蝕細菌叢遺伝子解析
代表:北迫　勇一 （分担者:　田上　順次）
期間:平成21年―平成23年
研究費総額:382万円

科学研究費補助金、 基盤C
研究題目:非侵襲的トモグラフィーを用いた修復物の欠陥と二次う蝕の精密画像診断
代表:島田　康史 （分担者:　田上　順次）
期間:平成21年―平成23年
研究費総額:407万円

受託研究
研究題目:リン酸化オリゴ糖カルシウムの歯の再石灰化効果に関する研究
代表:田上　順次
期間:平成20年―平成23年
研究費総額:1454万円

研究題目:低重合収縮ストレスレジンベース材「Surefil SDR flow」の臨床評価――応力緩和効果が窩壁適合性と接着強度に及ぼす影響
代表:田上　順次
期間:平成22年―平成23年
研究費総額:60万円

研究題目:OCT装置を用いた歯科臨床用途の研究
代表:田上　順次
期間:平成22年―平成23年
研究費総額:13万円

研究題目:口腔内用プローブを用いた光干渉断層計（OCT）の臨床応用
代表:田上　順次

期間:平成23年―平成25年
研究費総額:450万円

科学研究費補助金、 若手研究（B）研究題目:«研__究__課__題__名»
代表:サダル　アリレザ
期間:平成22年―平成23年
研究費総額:130万円

13）特別講演、招待講演、シンポジウム

[国内学術交流]

講演・シンポジウム

1. 田上順次.歯科の将来を考える、岡山大学　特別講義、岡山大学歯学部、2010年2月5日
2. 田上順次.セラミックに代わる最新CRテクニック.東京医科歯科大学歯科同窓会主催実習コース.東京医科歯科大学.2010年2月7日.
3. 田上順次.平成21年後第一回歯学系教員研修.多摩永山情報教育センター、2010年2月11日・12日.
4. 田上順次.医療系教育におけるe-ラーニングと著作権、第4回医療系大学e-ラーニング全国交流会、本学、2010年2月19日から2010年2月20日.
5. 田上順次.Super Toothとパーフェクトペリオの臨床応用、香川県保険医協会、マリンパレスさぬき、2010年2月28日.
6. 田上順次.医師・歯科医師、医歯学研究者のための、医歯工連携教育、「大学院から医療現場への橋渡し研究者教育」シンポジウム、東京ガーデンパレス、2010年3月1日.
7. 田上順次.即時審美修復.株式会社ジーシー、ジーシー東京支店セミナールーム.2010年3月7日.
8. 田上順次.千葉県歯科医師会　第2回ブロック別研修会講演.「接着が作る新しい歯科医療」.黄鶴.2010年5月16日.
9. 田上順次.日本歯科保存学会2010年度春期学術大会（第132回）及び日本歯科保存学会会議出席、特別講演座長.崇城大学市民ホール,熊本市国際交流会館.2010年6月2日から2010年6月5日.
10. 田上順次.日本顎咬合学会第28回学術大会出席、講演、「最高の接着:材料選択、歯の切削方および使用法」、東京国際フォーラム、2010年6月12日から2010年6月13日.
11. 田上順次.東京医科歯科大学歯科同窓会実習コース.講演.「セラミックに代わる最新CRテクニック」、東京医科歯科大学歯学部校舎等補綴示説室・実習室.2010年6月27日.
12. 田上順次.平成22年度鎌倉歯科医師会第1回学術講演会.講演.「接着・保存による最新歯科治療」、ホテル好養　～鎌倉市大船~.2010年7月3日.
13. 田上順次.平成22年度群馬県歯科医師会「歯科衛生士のスキルアップ・職場復帰セミナー」講演.群馬県歯科医師会館.2010年8月19日.
14. 田上順次.第21回日本歯科審美学会出席学術大会出席、大会長講演にて座長.安比プラザ・リゾートセンター.2010年8月27日から2010年8月29日.
15. 田上順次.第10回日本歯科用レーザー学会学術大会出席、講演.「OCTによる初期う蝕の診査・診断」.日本歯科大学生命歯学部・富士見ホール.2010年9月4日.
16. 田上順次.日本歯科保存学会市民公開講座「きれいな歯をいつまでも～むし歯と歯周病の予防と治療の過去・現在・未来」.講演.「むし歯と歯周病の予防と治療の最前線」、東京医科歯科大学歯学部特別講堂、2010年9月5日.
17. 田上順次.第59回口腔衛生学会出席、講演.「象牙質の強化～スーパーデンチンの形成～」.朱鷺メッセ.2010年10月7日から2010年10月8日.
18. 田上順次.台東区浅草歯科医師会第2回学術講演会講演.「最新の接着について」.東京都台東区浅草歯科医師会事務所.2010年11月17日.
19. 田上順次.東京医科歯科大学歯科同窓会主催講演会.講演.「ボーダレス接着臨床　―保存と補綴の最新データから結論する―」、東京医科歯科大学　M&Dタワー特別講堂.2010年12月12日.

[国際学術交流]

講演・シンポジウム

1. 田上順次.TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium, Barcelona, 基調講演、15:15-16:00、July 14, 2010
2. 田上順次.TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium Barcelona、「接着」討論共同司会者、16:00-16:45、July 14, 2010
3. 田上順次.TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium Barcelona、「OCT」討論司会者、18:00-18:45、July 14, 2010
4. 田上順次.チュラロンコン大学歯学部創立70周年記念ミーティング出席、Deans Scientific Lectureにて講演.「Optical coherence tomography: non invasive

diagnosis in operative dentistry」.2010年8月11日から2010年8月14日.

5. 田上順次.講演.「Creating the “Super Tooth”」.マサリク大学医学部口腔科学科.2010年11月18日から2010年11月24日.
6. 田上順次.The Annual Scientific Meeting of the Association for Dental Sciences of the Republic of China出席、”Dental Student Simulator Contest”出席・学生引率.Taipei World Trade Center、国立台湾大学医学院歯学系.2010年11月26日から2010年11月28日.
7. Matin. K,Tagami. J. The concept of Minimal Intervention (MI) in Restorative Dentistry. Ratan's Dental 1st International Dental Conference, 2010. Dhaka, Bangladesh. Feb 5, 2010.
8. Sadr A, Optical Coherence Tomography in Dentistry. TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium, Barcelona, Spain, July 14, 2010.
9. Nikaido T, New concept of enamel/dentin bonding mechanism. TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium, Barcelona, Spain, July 14, 2010.
10. Shimada Y, Diagnosis of occlusal caries by OCT. TMDU-UIC Restorative Dentistry Pre-IADR Symposium, Barcelona, Spain, July 14, 2010.

14) 主催学会

第132回 日本歯科保存学会秋学術大会、
2010年6月4、5日　熊本

15) 新聞、雑誌、TV報道

1. 田上順次.健康プラス　歯を白く.
読売新聞.2010年1月21日.
2. 田上順次.科学　微聞積聞　食物の酸から歯守る.
東京新聞.2010年4月13日.
3. 田上順次.科学　微聞積聞　食物の酸から歯守る.
中日新聞（夕刊）.2010年4月13日.
4. 田上順次.日本テレビ「おもいっきりドン」出演.
2010年5月13日.http://www.ntv.co.jp/don/contents02/2010/05/post-32.html
5. 田上順次.日本テレビ「おもいっきりドン」出演.
2010年6月10日.http://www.ntv.co.jp/don/contents02/2010/06/post-46.html
6. 田上順次.「大人の悠遊　からだチェック!　虫歯大人が気をつけること」.
週刊エコノミスト　毎日新聞社.2010年9月6日発行号.

16) GCOE総合講義

2010年2月8日　GCOE総合プレゼンテーション
田上順次　う蝕象牙質への接着
Bonding strategies for caries affected dentin

2010年11月15日　第65回　GCOE総合プレゼンテーション
サダル アリレザ　脱灰エナメル質と象牙質の光学的特性
Optical characterization of sound and demineralized enamel and dentin.

17) 教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授:大槻昌幸
講　師:二階堂徹、中島正俊
助　教:吉川孝子、島田康史、北迫勇一、岸川隆蔵、井上剛、趙永哲、保坂啓一
医　員:有吉芽生、高垣智博、辻本美穂、山本聖子
大学院GP特任講師:Matin Khairul
大学院GP特任助教:園田秀一
GCOE特任講師:Alireza Sadr
特任講師:中嶋省志
特任助教:平石典子
技術補佐員:
Peththahandi Gayani Kanchana Waidyasekera
大学院4年:市川千秋、内田遼太郎、荒牧音、篠田祐子、堀江加奈子、関奈央子、高橋礼、高橋真広、岸綾香、青木香那子、藤井美恵、高井智行、森文彦、丹野恵造、○Patricia Makishi、○Sitthikorn Kunawarote
3年:田中美由紀、矢作智花、小柳岳大、夏目悠子、坪根真子、田野（武田）絵里、半場秀典、神原啓介、○Hamid Nurrohaman、Amir Nazari、○Ilnaz Hariri、Prasansuttiporn Taweesak
2年:今井加奈子、今村友美、鵜鷹佐知子、丸藤伊織、桐原大、栗林恵美、坂野若詠、美田瞳、Suppason Thitthaweerat、○Turki Abdulsam Bakhsh
1年: Gerardo Jose Joves Mendez,　田中梓、貝ノ瀬公典, Amir Masoud Anbarafshan, Mandurah Mona Mohammad,Md.Sofiqul Islam, 中川寿一、Haidil Akmla, Ena Lodha、Upoma Guha

2010年(平成22年)1月21日(木曜日) 読売新聞

教育ルネ…

…重きを置くのは、字の上達でなく、書道の作法を通じて、伝統文化への関心や落ち着いて物事に取り組む姿勢、思いやりの心を育むことという。

ただし、「基礎や書道に対する態度を正しく学ぶには、専門家の力が…

私語をかわすことなく集中して書道に取り組む1年生の児童ら=12月8日、静岡県伊東市の伊東市立南小で

小中一貫教育校 小中の9年間を一体的にとらえ、連続性を持たせて行う教育のこと。従来の6・3制を4・3・2制に組み替え

「来校者からは『しっとりとして落ち着きがある』と評される。ほかの授業でも、1年生の態度に問題はない」と道下幸夫校長(54)は話す。

その教育効果を見て、市内の他の小学校や、同県長泉町、裾野市などにも、低学年の書道教育は拡大している。課題…茶道と剣道の両方を学ぶ。

同校小学部の杉山俊朗校長(56)は、「男子も女子も、実技を楽しみにしている。目上に対する言葉遣いが良くなった」と話す。

新教科が導いて、子どもたちは少し大人の顔になる。

(関仁巳、写真も)

世界教育事情 19 香港

「授業は英語」の学校増加

香港・九竜半島の住宅街にある鉄鋼書院中学。中学3年生の英語の授業をのぞくと、教師が滑らかな英語で生徒の発言を促していた。案内した楊明倫校長は、「来年度からは基本的に全授業が英語で行われる。教師の質を含めて本校の準備は万端だ」と胸を張った。

香港政府は昨年、約400校ある中学の教育改革案を公表、来年度から英語教育を強化する方針を打ち出した。これにより、英語で授業を行う学校が大幅に増加、同校もその一つとなる。

英国の植民地だった香港は1997年の中国返還時、「中学の授業は原則、母語の中国語で行う」という方針を決めた。多くの中学の使用言語が英語から中国語に切り替わり、英語で授業を行う中学は100校ほどに限られた。

しかし、保護者の反発は大きかった。英語力は入試だけでなく、就職や留学の成否に直結。また、香港の大学は通常、英語で授業が行われ、市民は英語力を社会的成功への必須能力と考えているからだ。同校に次女(13)を通わせる主婦、荘綺雯さん(50)も、「香港は国際都市。中国本土とのビジネスが増えても英語の重要性は変わらない」と力説する。

改革案には学校側も大賛成だ。香港の合計特殊出生率は1・06。少子化で生徒不足に悩む学校は、英語で授業をすることで人気を集め、生徒数を確保しようと躍起だ。ある中学の校長は「我が校も含め、ほとんどの学校が英語での授業に切り替えたいと思っているはずだ」と打ち明ける。

ただ、識者からは「英語ばかりが優先され大切な母語教育がなおざりになる」など批判の声も上がる。こうした声を意識してか、香港政府も「母語中心の教育方針は変わらない」との立場を強調している。

中国返還から13年。英語か中国語かを巡り、香港の教育界は現在も揺れている。

(香港 槙野健、写真も)

鉄鋼書院中で、英語の授業を英語で受ける生徒

くらし 学び

健康プラス

酸の強い飲み物に注意

歯を白く 3

酸蝕症という症状がある。炭酸飲料や果物などが含む酸で歯が溶け、冷たいものを食べた時などに歯がしみる知覚過敏が起こる。さらに歯のエナメル質が変化して透明度が増したり、エナメル質が溶けて、その下の黄色い象牙質がむき出しになったりし、歯の色が黄ばんでいく。

一度溶けた歯を元には戻せない。東京医科歯科大教授の田上順次さんは、「歯は毎日の食事で酸にさらされ、ある程度の酸蝕は仕方がありません。酸性の強い飲食物でも、そのとり方を工夫すれば、症状の進行を緩やかにできます」と話す。

まず、控えたいのは「ながら飲み」。仕事や運転をしながら、だらだら飲み続けるのは、歯が常に酸にさらされていることになり、歯が溶けやすくなる。ジョギングなど運動後の水分補給も注意したい。口の中が乾いて、口の中を中性に戻す唾液が出にくい状態では、さらに酸蝕されやすくなる。

エナメル質が溶けだすのはPHが5・5より低く、酸性度が強くなった時。主な飲食物のPHを<表>で示した。

酸の強い飲食物をとった後、すぐの歯磨きは控えた方がよい。酸にさらされた直後の歯は軟らかい。ここで、歯を磨くと、さらに表面が削れやすいからだ。歯磨きの目安は唾液の働きで口の中が中性に戻るまで、食後30分程度おくこと。この間、唾液が含むカルシウムやリンが、溶けた歯を元に戻す再石灰化の働きもしてくれる。

田上さんは「酸性の強い飲食物をとったらすぐ、お茶や水で口の中を中和させるのも有効です。赤ワインにチーズ、紅茶に牛乳など、再石灰化を促すカルシウムが豊富な乳製品を合わせるのも良いかもしれません」とアドバイスする。

主な飲み物のPH値

飲み物	PH
コーラ	2.2
梅酒	2.9
黒酢ドリンク	3.1
赤ワイン	3.4
スポーツ飲料	3.8
100%オレンジジュース	4.0
ビール	4.3
日本酒	4.9
緑茶	6.2
牛乳	6.8
ミネラルウオーター	7.0

歯が溶けやすい ↑ 5.5(エナメル質が溶け始める) 7.0(中性)

※PH値は商品により違いがある。東京医科歯科大助教の北迫勇一さんによる

今週は医療情報部の館尾の担当です。

中日新聞(夕刊) 2010年(平成22年)4月13日(火曜日) 2

科学

微聞積聞

食物の酸から歯守る

田上順次さん ■東京医科歯科大歯学部長

歯をむしばむのは虫歯菌だけではない。酸性の食品によって歯の表面のエナメル質が溶けてしまう「酸蝕症」が注目されているという。よい歯の日(四月十八日)を前に、東京医科歯科大大学院の田上順次教授に歯を守るためにはどうすればいいかを聞いた。 (永井理)

―酸蝕症とは。

酸性の食品を食べると歯のエナメル質の結晶からリン酸カルシウムがとけ出てしまう。虫歯は虫歯菌の作る酸で溶けますが、酸蝕症は食品の酸で溶けてしまうのです。

―なぜ注目されるようになったのでしょう。

虫歯や歯周病が治療されて、高齢者も歯が残るようになったため目立つようになってきたのでしょう。欧州ではすでに二、三十年前、グレープフルーツを食べた後、すぐに歯磨きをしてはだめだと言われていたようです。

―歯を溶かす酸性の食べ物とはどんなものでしょうか。

酸っぱいものはたいてい該当します。酸に長時間接触させるのはよくありません。たとえばレモンジュースなどをちびちび飲むと、体には酸も必要なんですが、歯にはよくない。酸で溶けて軟らかくなった部分は唾液によって再石灰化して修復される。酸っぱいものを食べると唾液が出るのは防御反応かもしれません。唾液で修復される前に歯を磨くとエナメル質が削れてしまう。

―普段の生活でどんなことに注意すればいいでしょうか。

ワインも酸性ですが、飲むときに例えばおつまみを食べる。すると唾液が分泌されて酸蝕を防ぎます。長いこと酸性にしておかないことです。食べた後で、お茶を飲んだりするのもいいかもしれません。リン酸カルシウムがあると再石灰化しやすい。積極的に、牛乳やジャガイモから採ったリン酸カルシウムを加えているガムなどもあります。

―自分で発見するには、どんなところに注意すればいいですか。

歯が平らになってきたり、黄色っぽくなったりしたら要注意。虫歯は歯に付着した汚れの下で起きる。酸蝕症は汚れておらず歯がむき出しになったところで起こります。

―酸蝕症だと分かった場合、どんな治療法がありますか。

歯科医師にチェックしてもらい生活習慣を改善することが必要です。ただし、進行を止めるだけで溶けた部分は元に戻せないので、予防が大切です。再石灰化を促進する成分を含んだペーストを自分で歯に塗るという方法も一定の効果があります。歯科医院でフッ素を塗るというのも効果の高い方法でしょう。

たがみ・じゅんじ 1955年、三重県生まれ。東京医科歯科大学歯学部卒業。同大助手、奥羽大教授などを経て、現在は、東京医科歯科大大学院医歯学総合研究科教授(う蝕制御学分野)、同研究科長、同大歯学部長。

天体観測、南極が熱い

天文台開設へ調査 筑波大など

南極大陸に天文台をつくる計画を筑波大や東北大などのグループが進めている。極寒で乾燥した南極は天文観測に適し「宇宙に開かれた最後の窓」ともいわれる。三月に帰国した五十一次南極観測隊にグループの研究者が同行し、初めて事前調査をした。十一月に出発する五十二次隊にも研究者が参加し、小型望遠鏡を使って試験観測を始める。将来は大型の赤外線望遠鏡や電波望遠鏡をつくる方針だ。 (榊原智康)

地上から星を観測するとき問題になるのが地球の大気だ。光を吸収したり乱したりして、天体を暗くぼやけた姿にしてしまう。

このため天文観測に適した場所として、すばる望遠鏡があるハワイのマウナケア山(標高約四、二〇〇㍍)や世界最大の電波望遠鏡をつくる「アルマ計画」が進むチリのアタカマ高地(標高約五、〇〇〇㍍)など、大気の薄い高地が選ばれてきた。ともに世界各国の巨大な望遠鏡が集まり、成果を競い合っている。

■好条件

今、新たな観測地として南極が注目されている。沿岸の昭和基地より約千㌔内陸にある日本の観測拠点「ドームふじ」基地。標高が三、八一〇㍍と高いうえ、平均気温が氷点下五五度と低いのが大きなポイントだ。

気温が下がれば空気中の水蒸気量が減って乾燥する。乾燥した空気は電波や赤外線を吸収しにくい。このドームふじに、筑波大は電波望遠鏡を、東北大は赤外線望遠鏡をそれぞれつくる計画だ。

さらに一年の七割以上が晴れ。大気も安定しているため星の瞬きも少ない。

好条件がそろうドームふじに天文台をつくろうと呼び掛けたのは筑波大の中井直正教授。二〇〇五年に結成した「南極天文コンソーシアム」には東北大や国立天文台、名古屋大の研究者が加わる。

〇六年には四十八次南極観測隊に、電波がどれぐらい大気に吸収されずに透過するかなどの観測を委託。その結果、ドームふじはアタカマ高地より観測環境が良いことが分かった。

三月までの五十一次隊に同行したのは、筑波大講師の瀬田益道さん(四三)。七人の隊員とともに昭和基地から雪上車で約三週間かけてドームふじへ。約二週間滞在し、電波の大気透過率や大気の水蒸気量を測ったほか、魚眼レンズを付けた「全天カメラ」で雲の発生状況を記録した。

「電波の大気透過率は以前の調査とほぼ同等の結果が得られるなど観測環境の良さを確認できた」と瀬田さん。「望遠鏡を運ぶルートを自分の目で確かめられたことも大きな成果」という。

筑波大が開発して、

低温に強い部品を選んで用いたうえ、アンテナを回すモーター部分などにはヒーターを設置。持ち運びを考え、本体は十数個の部品に分割できるよう工夫した。この望遠鏡で観測経験を積み、口径十㍍級の電波望遠鏡につなげる。

一方、赤外線を観測する東北大は最初に口径四十㌢、続いて二㍍級へと望遠鏡を発展させる構想を描く。南極では二㍍級でも、すばる望遠鏡(口径八・二㍍)と同程度の性能を実現できる可能性があるという。

試験観測は赤外線望遠鏡から始め、一二年度に電波望遠鏡を持ち込む方向で調整中。大型望遠鏡の設置は五年後を目標としており、日本から遠隔操作してデータを集める。

赤外線や電波は、遠くの天体や宇宙空間にあるちりやガスを調べるのに向いている。星はチリやガスから誕生すると考えられており、瀬田さんは「南極での観測で、生まれての銀河の姿が見えてくる可能性がある」と期待する。

■米欧中も

南極ではすでに、ドームふじより約千㍍標高が低い極点付近に米国が電波望遠鏡を建設し、〇七年に観測を開始。中国や欧州も標高三千㍍以上の高地で天文台の開設を目指しており、南極での天体観測は熱い国際競争が繰り広げられることになりそうだ。

大気中の水蒸気を測る機器を調整する瀬田講師(後ろは基地で使う燃料を保管するドラム缶)=南極のドームふじ基地で

↑天文台の開設が計画されているドームふじ基地 ↓ドームふじ基地に設置するため、筑波大が開発したアンテナ口径30㌢の電波望遠鏡(写真はいずれも瀬田講師提供)

●記者のつぶやき

ドームふじは越冬隊が滞在した時期もあるが、現在は無人。基地の電源を入れる作業などに時間を要すため、今回はベッドを備えた雪上車で寝泊まりしたという。天文学と南極観測の双方に新しい展開をもたらすことができるのか。「南極天文台」の今後の進展に期待したい。

東京新聞　2010年(平成22年)4月13日(火曜日)　☆　科学　20

微間積間

食物の酸から歯守る

田上順次さん
■東京医科歯科大歯学部長

歯をむしばむのは虫歯菌だけではない。酸性の食品によって歯の表面のエナメル質が溶けてしまう「酸蝕症」が注目されているという。よい歯の日(四月十八日)を前に、東京医科歯科大大学院の田上順次教授に歯を守るためにはどうすればいいかを聞いた。(永井理)

—酸蝕症とは。

酸性の食品を食べると歯のエナメル質の結晶からリン酸カルシウムが溶け出してしまう。虫歯は虫歯菌の作る酸で溶けますが、酸蝕症は食品の酸で溶けてしまうのです。

—なぜ注目されるようになったのでしょう。

虫歯や歯周病が克服されて、高齢者も歯が残るようになったため目立つようになってきたのでしょう。欧州ではすでに二、三十年前、グレープフルーツを食べた後、すぐに歯磨きをしてはだめだと言われていたようです。

—歯を溶かす酸性の食べ物とはどんなものでしょうか。

酸っぱいものはたいてい[illegible]

[illegible]唾液が出るのは防御反応かもしれません。唾液で修復される前に歯を磨くとエナメル質が削れてしまう。

—普段の生活でどんなことに注意すればいいでしょうか。

ワインも酸性ですが、飲むときに例えばおつまみを食べる。すると唾液が分泌されて酸蝕を防ぎます。長いこと酸性にしておかないことです。食べた後で、お茶を飲んだりするのもいいかもしれません。リン酸カルシウムがあると再石灰化しやすい。積極的に、牛乳やジャガイモから採ったリン酸カルシウムを加えているガムなどもあります。

—自分で発見するには、どんなところに注意すればいいですか。

歯が平らになってきたり、黄色っぽくなったりしたら要注意。虫歯は歯に付着した汚れの下で起きる。酸蝕症は汚れておらず歯がむき出しになったところで起こります。

—酸蝕症だと分かった場合、どんな治療法がありますか。

歯科医師にチェックしてもらい生活習慣を改善することが必要です。ただし、進行を止めるだけで溶けた部分は元に戻せないので、予防が大切です。再石灰化を促進する成分を含んだペーストを自分で歯に塗るという方法も一定の効果はあります。歯科医院でフッ素を塗るというのも効果の高い方法でしょう。

たがみ・じゅんじ　1955年、三重県生まれ。東京医科歯科大学歯学部卒業。同大助手、奥羽大教授などを経て、現在は、東京医科歯科大大学院医歯学総合研究科教授(う蝕制御学分野)、同研究科長、同大歯学部長。

天体観測、南極が熱い

天文台開設へ調査　筑波大など

[illegible]

2010年4月11日発行(毎月1回11日発行) Vol.70(4)／通刊第810号(再刊第708号)

日本歯科評論　4

APR.2010
No.810
Vol.70(4)

THE NIPPON Dental Review　http://www.hyoron.co.jp

愛知学院大学歯学部 歯周病学講座
[illegible]（私の研究室から）本文9頁

小特集Ⅰ
機能水の歯科臨床への応用——可能性を求めて
／田上順次・佐藤　勉・中村裕子・花田信弘 ほか

小特集Ⅱ
「歯科保健条例」の制定で何ができるのか，そのプロセスは？
／石井拓男・佐藤　徹・清田義和・川原敏幸・秋野憲一・岡田東洋志・山田　真

Point of View
私の"専門医"への道のり——日本補綴歯科学会①
●「日本補綴歯科学会専門医」制度の概要について／豊田　實
●咬合再構成に取り組んだ症例を中心に／左海孝昌

"DH" あなたの出番です！
[Advanced Edition：たのしい だいすき 歯科衛生士]
プラーク性歯肉炎——歯肉炎患者に歯科医師と歯科衛生士が協同して対応するために
／飯田しのぶ・柴田浩子・金子　愛・歌山正登
【Prof.ITOの歯周病学講座】プラーク性歯肉炎とは／伊藤公一

臨床理工講座
初期超親水性ビニルシリコーン印象材「パナジルイニシャルコンタクト」について／阿部泰彦

平成22年度診療報酬改定特別企画
在宅歯科医療の何が変わったか？／寺谷　武・前野　純

Journal of Dental Research
http://jdr.sagepub.com/

CO_2 Laser Improves 45S5 Bioglass Interaction with Dentin

A. S. Bakry, H. Takahashi, M. Otsuki, K. Yamashita and J. Tagami

J DENT RES published online 17 November 2010
DOI: 10.1177/0022034510387793

The online version of this article can be found at:
http://jdr.sagepub.com/content/early/2010/11/16/0022034510387793

Published by:
SAGE
http://www.sagepublications.com

On behalf of:
International and American Associations for Dental Research

Additional services and information for *Journal of Dental Research* can be found at:

Email Alerts: http://jdr.sagepub.com/cgi/alerts

Subscriptions: http://jdr.sagepub.com/subscriptions

Reprints: http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav

Permissions: http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

RESEARCH REPORTS
Biomaterials & Bioengineering

A.S. Bakry[1]*, H. Takahashi[2], M. Otsuki[3], A. Sadr[4], K. Yamashita[5], and J. Tagami[6]

[1]Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8549, Japan, and Conservative Dentistry Department, Faculty of Dentistry, Alexandria University, Egypt; [2]Advanced Biomaterials, Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8549, Japan; [3]Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8549, Japan; [4]Department of Cariology and Operative Dentistry, Global Center of Excellence Program, ICTB at Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. [5]Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2–3–10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101–0062, Japan; and [6]Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8549, Japan, and Global Center of Excellence Program, ICTB at Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; *corresponding author, drahmedbakry@gmail.com.

J Dent Res X(X):xx-xx, XXXX

CO_2 Laser Improves 45S5 Bioglass Interaction with Dentin

ABSTRACT

Bioglass 45S5 is a bioactive glass that can create a layer of calcium-phosphate crystals on mineralized hard tissues. In this study, 45S5 bioglass was mixed with phosphoric acid and irradiated with CO_2 laser and examined as a possible aid in the treatment of dentin hypersensitivity. The dentinal surface modified by the aforementioned technique was chemically and micro-morphologically examined with a field emission scanning electron microscope (FE-SEM) equipped with an energy-dispersive x-ray spectroscope (EDS), and the crystalline structures of the examined dentinal surfaces were examined by x-ray diffraction (XRD). Moreover, the mechanical properties of the newly formed layer were examined by nanoindentation. The results showed that 45S5 bioglass could occlude the dentinal tubule orifices with calcium-phosphate crystals. The application of CO_2 laser potentially improved the mechanical organization of these crystals.

KEY WORDS: 45S5 bioglass, CO_2 laser, bioactive glass.

DOI: 10.1177/0022034510387793

Received April 20, 2010; Last revision September 9, 2010; Accepted September 9, 2010

© International & American Associations for Dental Research

INTRODUCTION

Dentin hypersensitivity is one of the major challenges in dental practice (Orchardson and Gillam, 2006) that affects from 4% (Rees and Addy, 2002) to 57% of the world population (Chabanski *et al*., 1996; Irwin and McCusker, 1997). The hydrodynamic theory (Brännström *et al*., 1968; Brännström, 1986) explains the phenomenon of dentin hypersensitivity as an increase in the flow of the fluids present in dentinal tubules that have patent orifices, thereby activating nerves situated in the outer layers of the pulp. Exposure of dentinal tubule orifices may be caused by many factors, such as acid erosion (Brunton *et al*., 2000; Prati *et al*., 2003), attrition, abrasion (West *et al*., 1998), parafunctional habits, or gingival recession. These dentinal tubule orifices require permanent occlusion as a treatment approach (Orchardson and Gillam, 2006; Markowitz and Pashley, 2008; Pashley *et al*., 2008).

Agents used for the treatment of dentin hypersensitivity show only temporary success clinically, because they are gradually removed by daily brushing, food friction, and changes in the pH in the oral cavity (Brunton *et al*., 2000).

Bioactive glasses such as 45S5 bioglass can interact with hard tissues by forming a calcium-phosphate-rich layer that can bond chemically to these hard tissues (Hulbert *et al*., 1987; Yamamuro *et al*., 1990; Hench, 1991). Moreover, the energy available in a CO_2 laser is absorbed by the hydrated calcium-phosphate crystals (Sasaki *et al*., 1998). The thermal effects of the CO_2 laser remove the water of crystallization and subsequently improve the physical properties of the calcium-phosphate crystals. The aim of this study was to examine the micro-morphological features and chemical changes that take place on the dentinal surface after 45S5 bioglass application before and after CO_2 laser treatment, by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) coupled with energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS). The crystalline structures of the tested dentinal surfaces were examined by x-ray diffraction (XRD). Moreover, the hardness and the modulus of elasticity of the newly formed interaction layer were evaluated by nanoindentation.

The hypothesis in this study was that CO_2 laser irradiation will modify the calcium-phosphate "interaction layer" formed on the dentin surface.

MATERIALS & METHODS

Dentin Specimens' Preparation

Seventy-six freshly extracted non-carious third molars were used following guidelines approved by the Tokyo Medical and Dental University Ethical

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

Table 1. Summary for the Experimental Groups

	Group I	Group II	Group III	Group IV
45S5 bioglass application	–	–	+	+
CO_2 laser application	–	+	–	+

(–) Not applied, (+) Applied

Committee. We sectioned the teeth to obtain their buccal surfaces, which were ground flat to expose dentin at the cervical region (Paes Leme *et al*., 2004). All the dentin surfaces were utlrasonicated in de-ionized water for 30 sec, then etched in 0.5 M EDTA (pH 7.4) for 2 min and rinsed with water spray for 30 sec (Paes Leme *et al*., 2004).

The teeth were divided into 4 groups (Table 1): Group I, no bioglass was applied and no laser irradiation was done; Group II, no bioglass was applied, but the dentin surface was irradiated with a CO_2 laser; Group III, bioglass was applied, but there was no CO_2 laser irradiation; and Group IV, bioglass was applied followed by CO_2 laser irradiation. All specimens were stored in de-ionized water for 24 hrs after the experimental procedures.

45S5 Bioglass Application

One-tenth of a gram of 45S5 bioglass powder (NovaMin®, 5 µm average particle, NovaMin Technology, Alachua, FL, USA), composed of 24.5 wt% Na_2O, 24.4 wt% CaO, 6 wt% P_2O_5, and 45 wt% SiO_2, was mixed on a glass slab for 1 min by spatula with 0.2 mL of 50 wt% phosphoric acid that was prepared by the dilution of 85 wt% phosphoric acid (Wako Chemicals, Osaka, Japan) in distilled water to form a gel (pH 2). The acidic gel was immediately applied to the dentin surfaces of group III and IV specimens by microbrush (Microbrush International, Grafton, WI, USA). A layer of bonding agent (Clearfil SE Bond, Kuraray-Medical, Tokyo, Japan) was immediately applied over the 45S5 bioglass-phosphoric-acid gel and then light-cured (Table 2).

After storage in de-ionized water for 24 hrs, the thin layer of the bonding agent was gently removed by means of an excavator, then rinsed with water spray for 30 sec.

CO_2 Laser Application

We used a pulsed CO_2 laser system (Lasery 15 Z-Niic, Tokyo, Japan), with a wavelength of 10.6 µm, and having a non-contact handpiece (F50, Niic), to irradiate the dentin surfaces of group II specimens and the newly formed layer of group IV specimens. The output energy used was 0.5 W, with pulse width of 0.12 msec and pulse rate of 100 Hz. The distance between the target area and the laser beam source was 50 mm, and the diameter of the CO_2 laser beam at this distance was 5.3 mm. The time for laser irradiation/specimen was 1 min, and a sweeping motion was used to ensure irradiation of all treated surfaces; thus, the calculated energy density according to the aforementioned parameters was 136 J/cm^2.

SEM Examination for Tubule Orifice Closure

Five specimens from each group were dehydrated in ascending concentrations of ethanol, then gold-coated. The specimens' surfaces were evaluated by SEM (SEM JSM-5310LV, JEOL, Tokyo, Japan).

XRD Examination of the Dentin Surfaces

Five specimens from each group were examined by x-ray diffractometry (RAD IIA, Rigaku Denki, Tokyo, Japan) with CuKα radiation of 40 KV and Ni filter. The diffraction intensities were measured 4 times for each specimen by a scanning technique in the range of 2θ = 10°- 60° by a 0.1° step for 2 sec/point.

FE-SEM/EDS Interface Examination

Five specimens from each group were conditioned for 20 sec by the self-etching primer of Clearfil SE-Bond, bonded according to manufacturer's instructions, and then light-cured. Building up of light-curing resin composite (Clearfil AP-X, Kuraray-Medical) was carried out. The specimens were stored in de-ionized water for 24 hrs, then sectioned perpendicular to the interface to give 1.5-mm-thick slabs. The cut surfaces were polished, etched (Bakry *et al*., 2007), gold-coated, and then examined by FE-SEM/EDS (S-4500, Hitachi, Hitachinaka, Japan). Line scans were done across the treated dentinal surfaces with an EDS attachment for

Table 2. Materials Used in This Study

Materials		Composition	Procedures
45S5 Bioglass (NovaMin® Technology, USA)		SiO_2 (45 wt%), Na_2O (24.5 wt%), CaO (24.4 wt%), P_2O_5 (6 wt%)	Mix 0.1 g of 45S5 bioglass with 0.2 mL of phosphoric acid
Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan)	Primer:	MDP,HEMA, Water, PI, accelerators, CA.	Apply self-etching primer (20 sec)
	Bond:	MDP, HEMA, MFM, PI, accelerators, CA. microfiller	Apply adhesive, gently air dry, light cure (10 sec)
Clearfil AP-X (Kuraray, Osaka, Japan)		Bis-GMA, TEG-DMA barium glass filler (85 wt%), PI, accelerators	Apply and light cure for (40 sec)

Abbreviations: HEMA = 2-Hydroxyethyl methacrylate; bis-GMA = bisphenyl glycidyl methacrylate; MDP = 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate; TEG-DMA = Triethylene glycol dimethacrylate; MFM = Multifunctional methacrylate; PI = Photoinitiator; CA = Catalyst.

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

the following elements: phosphate, calcium, and silicon.

Nanoindentation Test

Four specimens were selected from each group. The specimens were treated with bonding system (Clearfil SE-Bond, Kuraray-Medical), and then built up with light-curing resin composite (Clearfil AP-X, Kuraray-Medical). The hardness and the modulus of elasticity for the "interaction layer" in addition to dentin with/without laser irradiation were measured with a nanoindentation device (ENT-1100a, Elionix, Tokyo, Japan). A minimum of 10 indentations was performed across the polished cross-section (Paital *et al*., 2009) of the interaction layer in groups III and IV, and on the superficial 10 μm of the cross-section of dentin with/without CO_2 irradiation in groups I and II. The maximum load used was 5 mN, with a loading rate of 0.5 mN/sec. The maximum load was held constant for 1 sec for each indentation.

Statistical Analysis

Student's *t* test was used to compare hardness and modulus of elasticity for the dentin with/without laser irradiation, and the interaction layer with/without laser irradiation ($p < 0.05$).

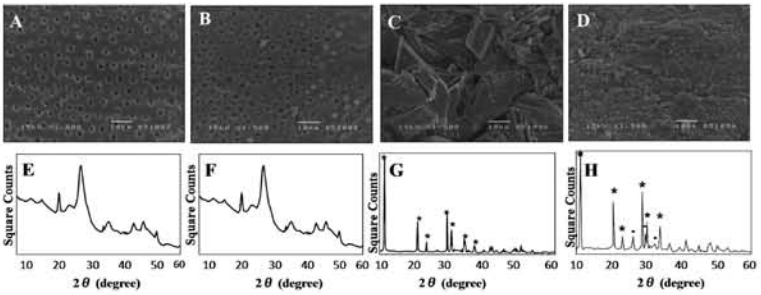


Figure 1. FE-SEM top surface examination and XRD analysis. **(A)** Top surface view for group I (no bioglass, no laser treatment) specimens, showing patent dentinal tubules with complete absence of any smear layer. **(B)** Top surface view of dentin of group II (no bioglass, but laser treatment), showing obliteration of some dentinal tubule orifices; however, no cracking was observed. **(C)** Top surface view of dentin of group III (bioglass application, but no laser irradiation), with complete coverage of the whole dentin surface with large crystalline structures. **(D)** Top surface view of dentin of group IV (bioglass and laser application), with complete coverage of the whole dentin surface with a compact layer of smaller crystalline structures. **(E,F)** XRD diffraction of the top dentin surfaces for groups I and II, showing normal hydroxyapatite crystal diffraction patterns. **(G)** XRD diffraction of the top dentin surface for group III, showing brushite crystal diffraction patterns; peaks are demarcated with (*). **(H)** XRD diffraction of the top dentin surface for group IV, showing brushite crystal diffraction patterns demarcated with (*) and monetite crystals diffraction patterns demarcated with (■).

RESULTS

SEM Examination for Dentinal Orifice Closure

Group I specimens (control) that did not receive bioglass or laser treatment (Fig. 1A) showed patent dentinal tubules with the absence of a smear layer due to the etching effect of EDTA. Specimens of group II (Fig. 1B) that had received laser treatment but no bioglass showed occlusion of a few dentinal tubules; however, most of the dentinal surfaces showed micro- morphological features similar to those of the control group.

The interaction layer covered 100% of the dentin surfaces of all of the bioglass-treated dentinal surfaces in groups III and IV. The interaction layer formed on dentinal surfaces of group III specimens showed that this layer is composed of flat crystal plates as large as 10 x 50 μm. However, the layer formed on top of the dentinal surfaces of laser-treated group IV seemed to be more compact, in contrast to the layer formed on specimens of group III, which did not receive laser treatment (Figs. 1C, 1D) and exhibited smaller crystals.

XRD Examination of Dentinal Surfaces

The crystalline structure of dentin surfaces in groups I and II showed the x-ray diffraction pattern typical of hydroxyapatite crystals, confirming the minimal effect of the CO_2 laser on the dentin when operated with the parameters used in this study (Figs. 1E, 1F).

The crystalline structure of the interaction layer formed in group III specimens (bioglass only) showed the formation of ($CaHPO_4$. $2H_2O$) brushite crystals (Fig. 1G).

The crystalline structure of the interaction layer formed in group IV (bioglass and CO_2 laser) was assigned as brushite ($CaHPO_4$.$2H_2O$) and monetite ($CaHPO_4$) crystals (Fig. 1H).

FE-SEM/EDS Interface Examination

Specimens in groups I and II (Figs. 2A, 2B) showed good adaptation between dentin and the bonding agent. Specimens of group II (laser treatment but no bioglass) showed no cracks in dentin. EDS line-scan analysis in groups I and II showed a drop in the calcium and phosphate contents as line scans crossed from the dentin to the bonding agent. Specimens of group III (bioglass but no laser) showed a precipitated layer extending over the whole surface of the dentin which penetrated about 4 μm into the dentinal tubules (Fig. 2C). Specimens of group IV (bioglass with laser treatment) showed a compact layer (Fig. 2D) formed on the dentinal surface, having a thickness of approximately 5 μm, covering the dentin and penetrating about 3 μm into the dentinal tubules. EDS line-scan analysis for groups III and IV showed that the interaction layer covering the dentinal surfaces was a calcium-phosphate-rich layer with trace amounts of silica.

Nanoindentation Examination

Student's *t* test showed that treatment of the interaction layer with the CO_2 laser significantly increased the hardness and the modulus of elasticity for that layer ($p < 0.05$), while it did not significantly affect the dentin hardness or its modulus of elasticity ($p > 0.05$). The means and standard deviations of hardness and modulus of elasticity for all groups are presented in Fig. 2E.

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

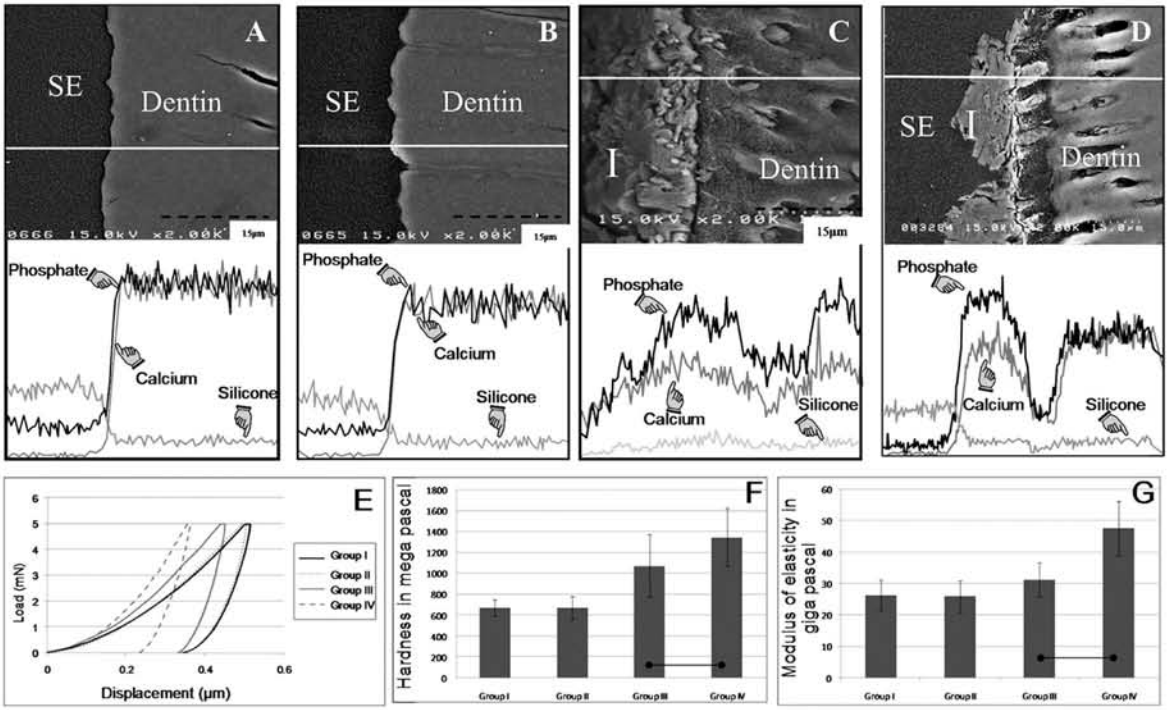


Figure 2. FE-SEM/EDS interface examination and nanoindentation results. **(A,B)** Interface between dentin (Dentin) and bonding agent (SE). EDS analysis for A and B shows the increase in calcium and phosphate peaks and the decrease in silicon peak as the line scans cross the interface. **(C,D)** Complete coverage of the whole dentin surface (Dentin) by a calcium-phosphate-rich "interaction layer" (I) that penetrated into the dentinal tubules. **(E)** Characteristic loading and unloading curves for the nanohardness of all groups. **(F)** The hardness results for all groups. Connected bars are statistically significant ($p < 0.05$). **(G)** Results of the modulus of elasticity for all groups. Connected bars are statistically significant ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The results showed that the application of 45S5 bioglass can create particles that occlude and penetrate the dentinal tubule orifices, suggesting the use of this technique to diminish the dentinal tubule fluid movement responsible for pulpal nerve irritation. These calcified plugs are not remnants of the smear layer, because, prior to 45S5 bioglass application, all of the specimens' dentinal surfaces were ultrasonicated and acid-conditioned to simulate the micro-morphological features of hypersensitive dentin clinical cases (Paes Leme *et al*., 2004).

The current technique provided a way for applying 45S5 to be in contact with hypersensitive dentin surfaces for 24 hrs to complete bioactive reactions that have been recorded as taking at least 2 hrs (Hench, 1991).

It is suggested that the mechanism of calcium-phosphate crystal formation on dentinal surfaces by the current technique is as follows: 45S5 bioglass powder, upon being mixed with the aqueous solution of 50% phosphoric acid, will leach out calcium, phosphate, and sodium crystals into the aqueous acidic media (Bunker *et al*., 1988). Simultaneously, the acidic gel may mobilize calcium and phosphate ions from the underlying dentin. The phosphate ions released from 45S5 bioglass and those abundant in the phosphoric acid solution will react with the calcium ions from bioglass and dentin to form acidic calcium-phosphate salts (*i.e*., brushite). These inorganic salts will precipitate on top of the dentinal surface, with smaller crystals penetrating the dentinal tubules. The silica network of the 45S5 bioglass is thought to react with hydroxyl ions released from aqueous storage media to form silanol compounds (Beletskii and Sventskaya, 2009), which are soluble in water. It is speculated that the silica network formed silanol compounds upon being exposed to water, which was easily washed out upon application of an air-water jet.

This explains why only trace amounts of silica were detected upon elemental analysis of the interaction layer by FE-SEM/EDS.

XRD analysis of the calcium-phosphate salts in group III showed the formation of brushite crystals ($CaHPO_4.2H_2O$), due to the low pH of 45S5 bioglass-phosphoric-acid gel. The pH of the gel directly after being mixed was measured in a pilot study to be 2.0; this low pH is suitable for the rapid formation of brushite crystals (Kani *et al*., 1983; Abraham *et al*., 2005).

Water-free monetite crystals ($CaHPO_4$) appeared with brushite crystals in group IV specimens, which may be attributed to irradiation of group IV samples by the CO_2 laser. Brushite crystals lose water abundant between its crystals at temperatures > 50°C, to form anhydride monetite ($CaHPO_4$) (Klammert *et al*., 2009). Apparently, CO_2 laser irradiation may have raised the temperature

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

of the interaction layer of group IV specimens above 50°C, allowing for partial conversion of brushite crystals into monetite crystals. The CO_2 laser parameters used in this study were reported to be safely used on dentin *in vivo* (Moritz *et al*., 1998), and thus the hypothesis in this study was accepted.

Moreover, this temperature increase might have caused some water to evaporate from the interaction layer, causing some improvement in its hardness and modulus of elasticity. This was evident in the results of a nanoindentation experiment which showed that group IV specimens recorded higher mechanical properties when compared with group III. Moreover, it was recently reported that the interaction layer was able to resist abrasion challenge (Bakry *et al*., 2009).

The observation of less stable forms of the calcium-phosphate crystals, *i.e*., brushite and monetite, and the absence of hydroxyapatite crystals, which are considered a more stable form of calcium-phosphate crystal, may be attributed to absence of any storage period for the specimens after removal of the residues of 45S5 bioglass. We speculate that a storage medium rich in calcium and fluoride, instead of the water storage used in this study, would have helped in the transformation of brushite crystals into hydroxyapatite crystals (Kani *et al*., 1983; Monma and Kamiya, 1987; Kumar *et al*., 1999; Abraham *et al*., 2005; Štulajterová and Medvecký, 2008).

The application of white 45S5 bioglass gel by the current technique simulates the application of temporary filling materials in conservative dentistry procedures. However, further studies are needed to determine the acceptance of this technique by patients. Moreover, studies are needed to examine the hydraulic conductance of dentin after bioglass application.

Application of 45S5 bioglass to dentin was able to occlude patent dentinal tubule orifices with a layer of calcium phosphate crystals to create what we call an 'interaction layer'. The application of a CO_2 laser to the interaction layer modified the crystals by removing the hydration water and improved its quality.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Japan Society for the Promotion of Sciences (Number 21.09146) and the GCOE program at TMDU. A preliminary report about this research work was presented at the General Session of the International Association for Dental Research, Toronto, ON, Canada, in 2008 (abstract number 2867, http://iadr .confex.com/iadr/2008Toronto/techprogram/abstract_103050.htm).

REFERENCES

Abraham J, Grenon M, Sanchez HJ, Perez C, Barrea R (2005). A case study of elemental and structural composition of dental calculus during several stages of maturation using SRXRF. *J Biomed Mater Res A* 75:623-628.

Bakry AS, Sadr A, Inoue G, Otsuki M, Tagami J (2007). Effect of Er:YAG laser treatment on the microstructure of the dentin/adhesive interface after acid-base challenge. *J Adhes Dent* 9:513-520.

Bakry AS, Matin K, Tanaka Y, Otsuki M, Takahashi H, Yamashita K, *et al*. (2009). Evaluating the durability of phosphoric acid promoted bioglass-dentin interaction layer (abstract). *J Dent Res* 88(Spec Iss A): http://iadr.confex.com/iadr/2009miami/webprogram/Paper117977.html (URL accessed 09/14/2010).

Beletskii BI, Sventskaya NV (2009). Silicon in living organisms and new-generation biocomposite materials (review). *Glass and Ceramics* 66:104-108.

Brännström M (1986). The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod* 12:453-457.

Brännström M, Linden LÅ, Johnson G (1968). Movement of dentinal and pulpal fluid caused by clinical procedures. *J Dent Res* 47:679-682.

Brunton PA, Kalsi KS, Watts DC, Wilson NH (2000). Resistance of two dentin-bonding agents and a dentin desensitizer to acid erosion *in vitro*. *Dent Mater* 16:351-355.

Bunker BC, Tallant DR, Headley TJ, Turner GL, Kirkpatrick RJ (1988). The structure of leached sodium borosilicate glass. *Physics and Chemistry of Glasses* 29:106-120.

Chabanski MB, Gillam DG, Bulman JS, Newman HN (1996). Prevalence of cervical dentine sensitivity in a population of patients referred to a specialist periodontology department. *J Clin Periodontol* 23:989-992.

Hench LL (1991). Bioceramics—from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 74:1487-1510.

Hulbert SF, Hench LL, Wilson J, Heimke G (1987). Ceramics in clinical applications: past, present, and future. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers.

Irwin CR, McCusker P (1997). Prevalence of dentine hypersensitivity in a general dental population. *J Ir Dent Assoc* 43:7-9.

Kani T, Kani M, Moriwaki Y, Doi Y (1983). Microbeam x-ray diffraction analysis of dental calculus. *J Dent Res* 62:92-95.

Klammert U, Reuther T, Jahn C, Kraski B, Kubler AC, Gbureck U (2009). Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. *Acta Biomater* 5:727-734.

Kumar M, Dasarathy H, Riley C (1999). Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions. *J Biomed Mater Res* 45:302-310.

Markowitz K, Pashley DH (2008). Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. *J Oral Rehabil* 35:300-315.

Monma H, Kamiya T (1987). Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite. *J Mater Sci* 22:4247-4250.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Aoid M, Reichenbach P, Lothaller MA, *et al*. (1998). Long-term effects of CO_2 laser irradiation on treatment of hypersensitive dental necks: results of an *in vivo* study. *J Clin Laser Med Surg* 16:211-215.

Orchardson R, Gillam DG (2006). Managing dentin hypersensitivity. *J Am Dent Assoc* 137:990-998.

Paes Leme AF, dos Santos JC, Giannini M, Wada RS (2004). Occlusion of dentin tubules by desensitizing agents. *Am J Dent* 17:368-372.

Paital SR, Balani K, Agarwal A, Dahotre NB (2009). Fabrication and evaluation of a pulsed laser-induced Ca-P coating on a Ti alloy for bioapplication. *Biomed Mater* 4:015009.

Pashley DH, Tay FR, Haywood VB, Collins MA, Drisko CL (2008). Consensus-based recommendations for the diagnosis and management of dentin hypersensitivity. *Comp Contin Educ Dent* 29:1-36.

Prati C, Montebugnoli L, Suppa P, Valdre G, Mongiorgi R (2003). Permeability and morphology of dentin after erosion induced by acidic drinks. *J Periodontol* 74:428-436.

Rees JS, Addy M (2002). A cross-sectional study of dentine hypersensitivity. *J Clin Periodontol* 29:997-1003.

Sasaki KM, Aoki A, Masuno H, Ichinose S, Yamada S, Ishikawa I (2002). Compositional analysis of root cementum and dentin after Er:YAG laser irradiation compared with CO_2 lased and intact roots using Fourier transformed infrared spectroscopy. *J Periodontal Res* 37:50-59.

Štulajterová R, Medvecký L (2008). Effect of calcium ions on transformation [of] brushite to hydroxyapatite in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* 316:104-109.

West N, Addy M, Hughes J (1998). Dentine hypersensitivity: the effects of brushing desensitizing toothpastes, their solid and liquid phases, and detergents on dentine and acrylic: studies *in vitro*. *J Oral Rehabil* 25:885-895.

Yamamuro T, Wilson-Hench J, Wilson J (1990). CRC handbook of bioactive ceramics. Vol II: Calcium phosphate and hydroxylapatite ceramics. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press.

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 2, 2011

分子情報伝達学分野

高柳　広

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
分子情報伝達学・教授

1）研究の課題名

研究の題目

骨代謝制御ネットワークの解明: Elucidation of novel regulatory mechanisms in bone metabolism

研究内容

骨代謝は、骨自身だけではなく他臓器や組織の恒常性維持にも重要である事が明らかにされている。しかしながら、骨による全身へのマクロな制御機構だけでなく、破骨細胞や骨芽細胞といった骨構成細胞間や細胞内シグナルのようなミクロな制御機構も依然として不明な点が多い。本研究は骨代謝制御ネットワークを、骨を構成する個々の細胞間から最終的に全身の組織、臓器レベルで解明する。この実現の為に、研究内容は3つの項目から構成され、段階的に遂行することになっている。A）骨構成細胞に発現する遺伝子・タンパク質の網羅解析;B）コンディショナル遺伝子改変マウスを用いた骨代謝制御遺伝子の機能解析; C）骨による全身性制御機構の解明である。本年度は、昨年度から作製している各候補遺伝子のコンディショナル遺伝子改変マウスの解析を行った。候補分子のうちいくつかのマウスは胎生致死であった。そこで現在、骨構成細胞特異的にCreを発現するマウスと交配している。マウスが樹立され次第、各候補分子の骨代謝における役割を、生体レベルで解析する。また、候補遺伝子は免疫担当細胞にも高発現しているものを選別しているため、各免疫細胞特異的にCreを発現するマウスとも交配しており、骨と免疫系の両方において解析が可能になるように準備を進めている。

拠点内イノベーション研究

研究の題目

光メージングと分子生物学の融合によるオステオネットワークの解明を目指したフロンティア研究拠点
New frontier of osteonetwork research by combinational approaches of optical imaging and molecular biology

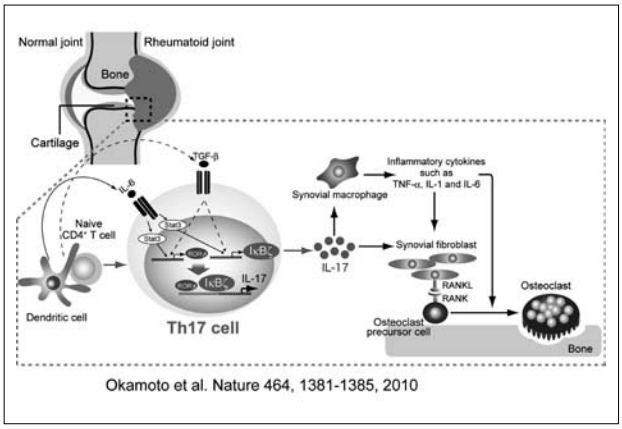
研究内容

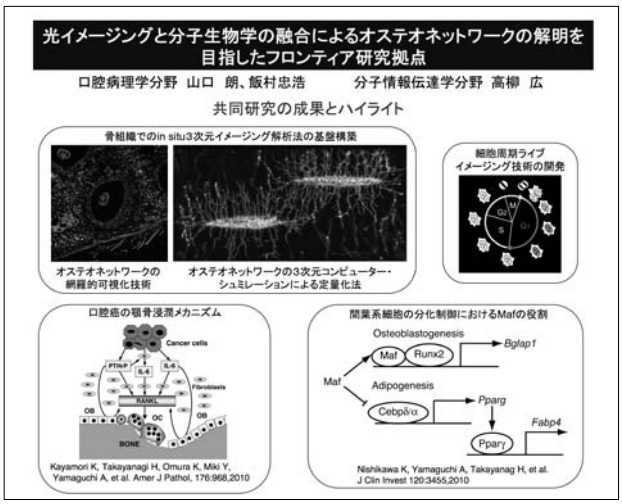
骨のホメオスタシスは骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスで維持されており、これらの細胞系の分化・機能の制御機構を明らかにすることは骨生物学の大きな目標の一つである。近年では、骨組織に埋もれている骨細胞の機能が注目され、骨リモデリングにおける骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞間の相互作用の解明も重要な研究課題となっている。また、骨組織の内部には、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞以外に間葉系幹細胞、造血・免疫系細胞、血管系細胞、脂肪細胞などの多くの細胞系が混在しているため、骨髄環境に存在する多くの細胞系の相互作用を明らかにすることも重要課題となっている。さらに、骨組織のホメオスタシスは、ホルモン、メカニカルストレスなどのバイオモデュレーターにより骨の外部から入力された刺激で制御されているので、骨組織と骨外の臓器・組織との相互作用を解析することも重要となる。

このように臓器としての骨組織の重要性は広がりつつあり、骨組織のホメオスタシスを生物学的に理解するには、これら多くの細胞系の動的な相互作用を明らかにすることが極めて重要である。本研究グループでは、骨内外の細胞間の緊密なコミュニケーションをオステネットワークという新たな骨生物学のパラダイムとして捉え、ネットワークを構成する分子・細胞群を統合的かつ動的に解析することにより、骨をさらに深く理解することを目標とする。具体的には、骨組織に対する光イメージングの応用と遺伝子改変マウス作製を含めた網羅的分子生物学のテクニックを有機的に結合させ、研究を推進する。こ

れら異分野として発展しつつある2つの先端科学的なアプローチを統合し、オステオネットワーク構成分子群の同定とその機能解明にチャレンジする。

2)





3）研究内容の英文要約

(1) Elucidation of the molecular mechanism of TH17 development: We identified a nuclear I κ B family member, I κ B ζ , as a transcription factor required for TH17 development in mice. The ectopic expression of I κ B ζ in naïve $CD4^+$ T cells together with ROR γ t or ROR α potently induces TH17 development, even in the absence of IL-6 and TGF- β . I κ B ζ -deficient mice have a defect in TH17 development and a resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. In cooperation with ROR γ t and ROR α , I κ B ζ enhances IL-17A expression by binding directly to the regulatory region of the Il17a gene. This study provides evidence for the transcriptional mechanism underlying TH17 development (ref. 2).

(2) Elucidation of the molecular mechanism of mesenchymal cell bifurcation into osteoblasts and adipocytes: We found the expression of Maf in mouse mesenchymal cells was decreased in an age-dependent manner. Maf regulates mesenchymal cell bifurcation into osteoblasts and adipocytes by cooperating with the osteogenic transcription factor Runx2 and inhibiting the expression of the adipogenic transcription factor PPAR γ . We also found bone formation was delayed in perinatal Maf-deficient mice and the formation of fatty marrow associated with bone loss was accelerated in aged Maf-heterozygous mice. This study identifies a transcriptional mechanism for an age-related switch in cell fate determination. (ref. 1).

(3) Elucidation of the transcriptional repression mechanism of anti-osteoclastgenic genes: We found that mice with an osteoclast-specific deficiency in the Prdm1 gene exhibit a high bone mass phenotype caused by a decreased number of osteoclasts. We revealed that Blimp1, encoded by Prdm1, represses expression of the Irf8 and Mafb genes, which are negative regulators of osteoclastgenesis (ref. 4).

(4) Elucidation of roles of ITIM-bearing receptors in osteoclast differentiation: We found Ly49Q, an Ly49 family member possessing an ITIM motif, is selectively induced by RANKL stimulation in bone marrow-derived monocyte/macrophage precursor cells. We revealed that osteoclastogenesis was significantly impaired in Ly49Q-deficient cells in vitro. This study provides an example in which an ITIM-bearing receptor functions as a positive regulator of osteoclast differentiation (ref. 3).

(5) Elucidation of roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: We found that some of oral cancer cell lines produce both PTHrP and IL-6 and induce the expression of Rankl in stromal cells. We revealed that oral squamous cell carcinoma provides a suitable microenvironment for osteoclast formation (ref. 5).

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

他分野（特に免疫学）の学外研究者との協力し、世界的な成果を責任著者として4本の論文を発表できた。さらに拠点内共同研究の成果を論文として発表した。

B（研究教育環境）

GCOE AISS学生の博士号取得に向けた確実な研究指導を行った結果、GCOE AISS学生1人が博士号を取得し、残る3人も論文作成に向け順調に研究を進めている。

C（人材確保）、D（人材育成）

昨年度に比べ、国内外から他分野に精通したポスドク、大学院生、技術補佐員をさらに増員し、学際的環境下で骨代謝研究を推進できる環境を整備した。

E（国際化）

国際学会である第3回国際骨免疫学会議を主催した。また、海外において多数の講演を行った。さらに当研究室では、海外からのポスドクが常時研究に参画しており、ラボ内セミナーでの公用語は英語としている。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

GCOEシンポジウムや国際学会を積極的に活用して、世界の一線級の研究者と意見交換を行い、世界トップレベルの研究を意識した研究推進を行った。本年度も引き続き、GCOE拠点内にとどまらず東京医科歯科大学や他大学の研究者と広く密接な連携を行うことで、各分野の先端的な発想を自分の研究領域と融合させ、研究成果として結実させることを心がけた。

6）英文原著論文

◎1. Nishikawa, K., Nakashima, T., Takeda, S., Isogai, M., Hamada, M., Kimura, A., Kodama, T., Yamaguchi, A., Owen, MJ., Takahashi, S. and Takayanagi, H.: Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation.
J Clin Invest. 120（10）:3455-3465, 2010

◎2. Okamoto, K., Iwai, Y., Oh-hora, M., Yamamoto, M., Morio, T., Aoki, K., Ohya, K., Jetten, AM., Akira, S., Muta, T. and Takayanagi, H.: IκBζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors.
Nature. 464（7293）:1381-1385, 2010

◎3. Hayashi, M., Nakashima, T., Kodama, T., Makrigiannis, AP., Toyama-Sorimachi, N. and Takayanagi, H.: Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor positively regulates osteoclast differentiation.
Biochem Biophys Res Commun. 393（3）:432-438, 2010

◎4. Nishikawa, K., Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kato, S., Kodama, T., Takahashi, S., Calame, K. and Takayanagi, H.: Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation.
Proc Natl Acad Sci USA. 107（7）:3117-3122, 2010

◎5. Kayamori, K., Sakamoto, K., Nakashima, T., Takayanagi, H., Morita, K., Nguyen, S.T., Omura, K., Miki, Y., Akashi, T., Ogata, E. and Yamaguchi, A.: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells.
Am J Pathol. 176（2）:968-980, 2010

7）総説並びに著書

（英文）

1. Kazuo Okamoto and Hiroshi Takayanagi: Osteoclasts and interleukin-17-producing helper T cells in rheumatoid arthritis Arthritis: Pathophysiology, Prevention and Therapeutics、2010（in press）
2. Okamoto, K. and Takayanagi, H.: Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development.
Int Immunopharmacol.（in press）
3. Takayanagi, H.: New immune connections in osteoclast formation.
Ann N Y Acad Sci. 1192:117-123（7 pages）, 2010
4. Takayanagi, H.: The unexpected link between osteoclasts and the immune system.
Adv Exp Med Biol. 658:61-68（8 pages）, 2010
5. Joseph Lorenzo, Yongwon Choi, Mark Horowitz, Hiroshi Takayanagi（Editors）: Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2010
6. Joseph Lonrenzo, Yongwon Choi, Mark Horowitz,and Hiroshi Takayanagi. Overview: The Developing Field of Osteoimmunology. Joseph Lorenzo, Yongwon Choi, Mark Horowitz, Hiroshi Takayanagi（Editors）
Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, p1-5（5 pages）, 2010
7. Roberta Faccio, Yongwon Choi, Steven L. Teitelbaum, and Hiroshi Takayanagi. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems.
Joseph Lorenzo, Yongwon Choi, Mark Horowitz, Hiroshi Takayanagi:
Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, p141-185（45 pages）, 2010

（和文）

1. 岡本一男、高柳広:自己免疫疾患を引き起こすT細胞の運命を決定する遺伝子を同定
－新たな関節リウマチ治療薬の可能性－
整形外科61（13）:1410（1ページ）, 2010
2. 岡本一男、高柳広:骨代謝とサイトカイン－関節リウマチにおける免疫系により骨代謝制御
実験医学増刊28（12）:196-202（7ページ）, 2010
3. 高柳広:運動器の基礎研究2 – 骨免疫学
特集:ロコモティブシンドローム
治療学44（7）（7月号）: 23-31（9ページ）, 2010
4. 高柳広:Bone immunology update
感染・炎症・免疫 40（2）:26-35（10ページ）, 2010

5. 篠原正浩、高柳広:新規分子を標的とした抗破骨細胞療法
   特集I 歯と骨の炎症制御の新規標的
   炎症と免疫18（4）（7月号）: 26-34（9ページ）, 2010
6. 高柳広:『注目されるサイトカイン』各論 － 骨代謝とサイトカイン
   臨床検査54（6）（6月号）:651-658（8ページ）, 2010
7. 古賀貴子、高柳広:第4章 － 骨吸収のメカニズム－破骨細胞の分化と活性化機構-
   わかる実験医学シリーズ　骨研究がわかる　シグナル研究から広がる骨代謝と生体制御のクロストーク: 49-57（9ページ）, 2010
8. 高柳広:概論 － ポストゲノム時代の生体高次機能解析で脚光を浴びる骨研究
   わかる実験医学シリーズ　骨研究がわかる　シグナル研究から広がる骨代謝と生体制御のクロストーク: 12-20, 2010
9. 高柳広:＜編集＞シグナル研究から広がる骨代謝と生体制御のクロストーク
   わかる実験医学シリーズ　骨研究がわかる , 2010
10. 岡本一男、高柳広:Th17細胞と転写制御因子IκBζ
    生物の科学　遺伝、2011（2011.2.18 発行予定）
11. 岡本一男、高柳広:Th17細胞分化に必須の転写制御因子IκBζ
    医学のあゆみ、2011（2011.2.19 発行予定）
12. 岡本一男、高柳広:転写制御因子IkBzを標的としたTh17細胞制御
    最新医学、2011（2011.2 発行予定）
13. 中島友紀、高柳広:免疫系と破骨細胞
    細胞工学、2011（2011.2.22 発行予定）
14. 中島友紀、高柳広:骨免疫学からみた生物学的製剤療法の新展開
    骨粗鬆症治療、2011（2011.1 発行予定）
15. 小松紀子、高柳広:骨免疫学と関節炎動物モデル
    Clinical Calcium、8ページ、2011（2011.1 発行予定）

8）平成22年度までの自己評価

本年度は、破骨細胞の機能においても重要な役割を果たすIκBζが、関節リウマチ等の自己免疫疾患や炎症疾患において重要な役割を果たすTH17細胞の分化に必須であることを発見した。また、転写因子MafがRunx2と協調して間質系幹細胞から骨芽細胞への分化に必須であり、C/EBP αやC/EBP δを介したPPAR γの発現を抑制することによって脂肪細胞への分化を抑制していることを明らかにし、Mafの欠損によって骨髄の脂肪化が進むことを発見した。さらに、NFATc1依存性に転写抑制因子Blimp1の発現が上昇し、Blimp1が破骨細胞分化を抑制するIRF8やMafbの発現を抑制することによって、破骨細胞分化を促進することを明らかにした。これらに加えて、ITIMモチーフを持つLy49Qがin vitroにおいて破骨細胞分化を性に制御していることを明らかにした。以上、本年度は骨と免疫系が密接に関与している事を多数発見でき、主著論文4本（うち1本はNature誌）と共著論文1本、計5本の論文として発表した。また本年度は、各骨構成細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によって同定した骨代謝系と免疫系に関わる有望な候補遺伝子のコンディショナル遺伝子改変マウスのうち、いくつかのマウスの解析を行った。その結果、興味深い結果が得られており、今後、これらの遺伝子改変マウスの解析を進め、骨と免疫の相互作用の解明に取り組む予定である。

9）学会発表（英文）

◎Authors: Masatsugu Oh-hora, Hiroshi Takayanagi, Anjana Rao.
Title: Different Ca^{2+} sensitivity of the development of T-lineage cells
Keystone Symposia
Poster Presentation
Colorado USA, 2010 February 27 – March 4

◎Authors: Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Noriko Toyama-Sorimachi, Hiroshi Takayanagi.
Title: Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation.
3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeltal Systems.
Poster Presentation
Fira, Santorini, Greece, 2010 June 20 – 25

◎Authors: Takako Negishi-Koga, Hans-Jurgen Gober, Toshiyuki Takai, Hiroshi Takayanagi.
Title: The regulation of osteoclastgenesis by Fc γ receptors.
3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeltal Systems.
Poster Presentation
Fira, Santorini, Greece, 2010 June 20 – 25

◎Authors: Kazuo Okamoto, Masatsugu Oh-hora, Masahiro Yamamoto, Sizuo Akira, Tatsushi Muta, Hiroshi Takayanagi.

Title: An essential role of IκBζ in the development of osteoclastogenic helper T cells – Th17 cells.
3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeltal Systems.
Poster Presentation
Fira, Santorini, Greece, 2010 June 20 – 25

◎Authors: Kaori Takechi, Takako Negishi-Koga, Takahiro Maeda, Pier Paolo Pandolfi, Keiji Moriyama, Hiroshi Takayanagi.
Title: Transcriptional repressor, LRF regulates NFATc1 expression in osteoclastogenesis
3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeltal Systems.
Poster Presentation
Fira, Santorini, Greece, 2010 June 20 – 25

◎Authors: Kazuo Okamoto, Masatsugu Oh-hora, Masahiro Yamamoto, Sizuo Akira, Tatsushi Muta, Hiroshi Takayanagi.
Title: An essential role of IκBζ in Th17 development.
The second International Conference on Regulatory T Cells and Th17 Cells and Clinical Application in Human Disease.
Oral Presentation
Shanghai, China, 2010 July 17

◎Authors: Masatsugu Oh-hora, Noriko Komatsu, Anjana Rao, Hiroshi Takayanagi.
Title: Lineage-specific requirement of store-operated calcium entry in T-lineage development.
14th International Congress of Immunology
Oral Presentation
Kobe, Japan, 2010 August 22 - 25

◎Authors: Kazuo Okamoto, Yoshiko Iwai, Masatsugu Oh-hora, Masahiro Yamamoto, T omohiro Morio, Anton M Jetten, Sizuo Akira, Tatsushi Muta, Hiroshi Takayanagi.
Title: IκBζ is required for the transcriptional program in Th17 development.
14th International Congress of Immunology
Oral Presentation
Kobe, Japan, 2010 August 22 - 25

10）学会発表（和文）

著者名:　岡本一男
演題名: 転写制御因子IκBζによる骨代謝と免疫システムの制御
学会名: 第28回日本骨代謝学会学術集会
東京、平成22年7月21日

著者名:　篠原正浩、高柳広
演題名: 破骨細胞の分化・機能を制御するシグナル伝達経路
学会名: 高遠シンポジウム
長野県高遠町、平成22年8月19日

著者名:　篠原正浩、永井裕介、中村正樹、田中栄、高柳広
演題名: PI3K-Akt経路はPlekhm1のリン酸化を介して破骨細胞の骨吸収を制御する
学会名: 第33回日本分子生物学会年会
神戸、平成22年12月10日

11）受賞

大洞将嗣
第5回日本免疫学会研究奨励賞　平成22年12月3日

12）外部資金の獲得状況

（独）科学技術振興機構（JST）　戦略的創造研究推進事業（ERATO型研究）　平成21年度発足
研究題目:ERATO　高柳オステオネットワークプロジェクト
代表:高柳　広
期間:平成21年度～平成26年度
研究費総額:169,900万円

文部科学省科学研究費補助金　若手研究（A）
研究題目:骨破壊性疾患における非ヒストンタンパク質のメチル化修飾の意義
代表:古賀　貴子
期間:平成20年度～平成22年度
研究費総額:2,548万円

文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽研究
研究題目:骨代謝を制御するカップリング因子の同定と機能解析
代表:中島　友紀
期間:平成21年度～平成23年度
研究費総額:320万円

文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽研究
研究題目:軸策ガイダンス、セマフォリン分子による硬組織代謝細胞間制御の解明
代表:古賀　貴子

期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額: 310万円

文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽研究
研究題目:破骨細胞分化に関与するリン酸化シグナル伝達機構のプロテオーム解析
代表:春宮　覚
期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額:310万円

文部科学省科学研究費補助金　若手研究（A）
研究題目:破骨細胞特異的システムの解明―歯の革新的保存法の確立を目指して
代表:篠原　正浩
期間:平成22年度～平成24年度
研究費総額:2,186万円

特定領域　公募研究
研究題目:T系列細胞系列群の分化・機能におけるカルシウム流入制御機構の解明
代表:大洞　将嗣
期間:平成22年度～平成23年度
研究費総額:960万円

文部科学省科学研究費補助金　特別研究員奨励費
研究題目:性ホルモンを介した骨代謝制御における制御性T細胞の意義
代表:高柳　広
期間:平成20年度～平成22年度
研究費総額:180万円

文部科学省科学研究費補助金　特別研究員奨励費
研究題目:p62結合蛋白KFB14の破骨細胞分化における役割の研究
代表:高柳　広
期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額:200万円

文部科学省科学研究費補助金　特別研究員奨励費
研究題目:RANK/RANKLシグナルの新規機能の解明
代表:高柳　広
期間:平成22年度～平成23年度
研究費総額:300万円

文部科学省科学研究費補助金　基盤研究（B）
研究題目:生理的骨改造および炎症性骨破壊における転写因子IRF-8の機能解析
代表:高見　正道（分担:高柳　広）
期間:平成20年度～平成22年度
研究費総額:40万円

（財）内藤記念科学振興財団研究助成金　第41回（2009年度）内藤記念科学奨励費
研究題目:破骨細胞におけるイノシトールリン脂質シグナルの解明
代表:篠原　正浩
期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額:300万円

（財）武田科学振興財団
研究題目:T細胞におけるカルシウム流入機構を介した自己免疫疾患発症機序の理解と解析
代表:大洞　将嗣
期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額:300万円

（財）上原記念生命科学財団　研究奨励金
研究題目:骨構成細胞が産生する細胞外分泌因子の同定と生理機能の解明
代表:篠原　正浩
期間:平成21年度～平成22年度
研究費総額:200万円

公益財団法人　持田記念医学薬学振興財団
研究題目:カルシウムシグナルを介した自己免疫疾患における胚中心形成機構の解明
代表:大洞　将嗣
期間:平成22年度～平成23年度
研究費総額:300万円

基礎研究支援プロジェクト　（中外製薬）
研究題目:骨リモデリング制御因子の同定とその機能解析
代表:中島　友紀
期間:平成22年度～平成26年度
研究費総額:1,000万円

13）特別講演、招待講演、シンポジウム

（本人分）

Hiroshi Takayanagi
ENS de Lyon – Todai Workshop, Mineralised Tissues Session 2010. 11.10, Lyon, France

Hiroshi Takayanagi
ACR/ARHR Annual Scientific Meeting,Special Sessions – ACR REF 2010. 11.8, Atlanta, USA
Hiroshi Takayanagi
ASBMR 2010 Annual Meeting 2010.10.15, Toronto, Canada

Hiroshi Takayanagi
EMBO 2010: Anatomy and embryology of the mouse 2010.9.15, Split, Croatia

Hiroshi Takayanagi:Workshop:Osteoimmunoloty - Chair
14th International Congress of Immunology 2010.8.26, Kobe, Japan

Hiroshi Takayanagi:Lunch Time Lecture
14th International Congress of Immunology 2010.8.25, Kobe, Japan

Hiroshi Takayanagi
14th Congress of Asia Pacific League of Associations for Rheumatology 2010.7.15, Hong Kong, China.

Hiroshi Takayanagi
3rd International Conference on Osteoimmunology, 2010.6.24, Santorini, Greece

Hiroshi Takayanagi
Annual European Congress of Rheumatology（EULAR 2010）, 2010.6.19, Rome, Italy

Hiroshi Takayanagi: Raine Visiting Professorship Lecture Series at University of Western Australia, 2010.5.05, Perth, West Australia.

Hiroshi Takayanagi:The Forth Margaret River Region Forum: Pathways toward Molecular and Cellular Therapy, 2010.4.29, Margaret River, West Australia.

（和文）

発表者：高柳広
学会名：京都大学再生医科学研究所
　　「再生医学・再生医療の先端融合的共同研修拠点」
　　平成22年度　学術講演会
開催地：京都、平成22年12月13日
発表者：高柳広
学会名：第12回日本骨粗鬆学会/骨ドック・
　　健診分科会　イブニングセミナー
開催地：大阪、平成22年10月22日

発表者：高柳広
学会名：第12回日本骨粗鬆学会/骨ドック・
　　健診分科会　特別講演
開催地：大阪、平成22年10月22日

発表者：高柳広
学会名：第83回日本整形外科学会学術総会
開催地：東京、平成22年5月29日

発表者：高柳広
学会名：第54回日本リウマチ学会総会・学術集会、
　　第19回国際リウマチシンポジウム
開催地：神戸、平成22年4月24日

発表者：高柳広
学会名：第54回日本リウマチ学会総会・学術集会、
　　第19回国際リウマチシンポジウム
開催地：神戸、平成22年4月23日

（研究室員分）

篠原正浩
第54回日本リウマチ学会学術集会、2010.4.24、神戸

大洞将嗣
第87回日本生理学会大会、2010.5.21、盛岡

岡本一男
京都大学大学院生命科学研究科　生命科学セミナー、2010.5.24、京都

中島友紀
第28回日本骨代謝学会、2010.7.23、東京

古賀貴子
第28回日本骨代謝学会、2010.7.23、東京

中島友紀
第31回日本炎症・再生医学会、2010.8.6、東京

岡本一男
第31回日本炎症・再生医学会、2010.8.6、東京

岡本一男、高柳広
第22回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、
2010.8.19、長野

Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi
7th Meeting of Bone Biology Forum、2010.8.21、静岡

岡本一男、高柳広
第13回骨発生・再生研究会、2010.11.13、東京

林幹人
第6回骨免疫ワークショップ、2010.11.26、東京

14）主催学会

第3回国際骨免疫学会議、6月20日－25日、ギリシャ

15）新聞、雑誌、TV報道

高柳　広:医療研究最先線　未来医療を拓く
骨免疫学的アプローチで関節リウマチの骨破壊を制御
日経サイエンス2011年3月号, p10-13 January 2011

高柳　広:医療研究最先線　未来医療を拓く
骨免疫学的アプローチで関節リウマチの骨破壊を制御
Bloom! 医科歯科, No.11, p10-11 December 2010

高柳　広:第21回日本整形外科学会基礎学術集会
炎症性サイトカイン,破骨細胞関連因子,骨基質蛋白質の遺伝子発現が亢進
Medical Tribune Special Issue, p93 12/2/2010

岡本一男、高柳　広:第31回日本炎症・再生医学会
ミニシンポジウム『新規分子標的治療薬』
～カテプシンK阻害薬～炎症と骨破壊を同時に治療可能
Medical Tribune, 43（38）: 18, 9/23/2010

高柳　広:リウマチなどの原因物質特定
朝日新聞4/30/2010

高柳　広:関節リウマチ原因遺伝子
東京医科歯科大チーム発見
読売新聞4/13/2010

高柳　広:リウマチ起こす遺伝子
東京医科歯科大治療法開発に道
日本経済新聞4/12/2010

高柳　広:関節リウマチ原因遺伝子
東京医科歯科大チーム発見
読売新聞4/13/2010

高柳　広:自己免疫疾患　誘因の遺伝子発見
東京医科歯科大　治療法開発に道
日本産業新聞4/13/2010

高柳　広:免疫細胞の自己攻撃、仕組み解明
リウマチ新薬開発に期待も
共同通信4/12/2010（ウェブニュース）

高柳　広:免疫細胞の制御遺伝子特定＝難病の治療法に道　東京医歯大など
時事通信4/12/2010（ウェブニュース）

高柳　広:「自己免疫疾患を引き起こすＴ細胞の運命を決定する遺伝子を同定」
－免疫難病の新規治療法へ道－
東京医科歯科大学4/12/2010（ウェブサイト/プレスリリース）

高柳　広:IκBζ and TH17 development
Nature Immunology（11）, 469 Research Highlights
（ウェブニュース）
http://www.nature.com/ni/journal/v11/n6/full/ni0610-469.html

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授	本郷敏雄
特任准教授	大洞将嗣
助教	篠原正浩
	中島友紀
	岡本一男
	春宮覚
客員助教	古賀貴子
特別研究員	Ling Wang
	Feng Haotian

Matteo Guerrini
ポスドク　林幹人
永井祐輔
寺島明日香
指導を受けた大学院生　○Erik Idrus、○武智香織、○Abdul Alim Al-Bari

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など自由形式で記載

シャペロン教官以外にも、ポスドク研究者の配置を増員できることが望ましい。病理組織作成と解析、ノックアウトマウス作成、トランスクリプトーム・プロテオーム解析、セルソーティング等にあたって、専門の技術補佐員の増員、あるいは共同研究施設と専属の技術員による管理・支援があると有益である。

Number.02 | Research Worker | Takayanagi Hiroshi

医療研究★最前線　未来医療を拓く

骨免疫学的アプローチで関節リウマチの骨破壊を抑制

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 分子情報伝達学分野　高柳　広 教授

研究領域への挑戦

骨と免疫をつなぐ

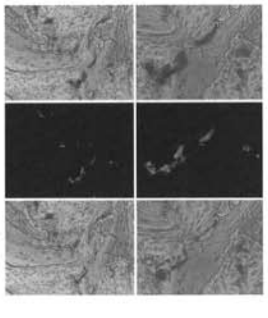


図1 関節リウマチの骨破壊部 NFATc1発現の様子

骨免疫学を追求し治療薬の開発を目指す

骨代謝のネットワークと全身組織との関係

11 Bloom! 医科歯科 No.11　　Bloom! 医科歯科 No.11 10

Medical Tribune Special Issue　2010年12月2日

RAの病態解明と治療に新展開

～骨免疫学の視点でアプローチ～

日経産業新聞
2010年(平成22年)4月13日(火曜日)

自己免疫疾患

誘因の遺伝子発見

東京医科歯科大 治療法開発に道

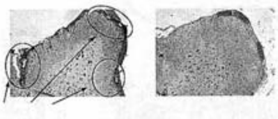
東京医科歯科大学の高柳広教授らの研究チームは、関節リウマチなどの自己免疫疾患を引き起こす遺伝子を発見した。この遺伝子を壊すと症状が改善することをマウスで確認しており、治療法の開発につながる成果としている。研究成果は英科学誌ネイチャー(電子版)に掲載された。

関節リウマチや神経難病の多発性硬化症は自己免疫疾患と呼ばれ、免疫細胞の一種であるT細胞が誤って自分の体を攻撃して起こる。T細胞が体を攻撃するタイプに変わる仕組みは解明されていなかった。

研究チームは、免疫細胞の活性化にかかわる「Iカッパ-Bゼータ」という遺伝子に注目した。この遺伝子を壊したマウスでは、攻撃型のT細胞が5分の1程度に減った。また、多発性硬化症を発症しても、脊髄(せきずい)の神経細胞の損傷が少なく、運動まひの症状も軽かった。

遺伝子の働きを人為的に抑えたが、マウスの実験では生体への悪影響は確認されていない。免疫細胞を活性化する作用も、ほかの仕組みで補っているとみられる。

高柳教授は「この遺伝子の働きを抑えることで効率良く病気を治せ、副作用も起こりにくいと考えられる」と話している。



遺伝子を壊したマウス㊧の脊髄では、神経細胞の損傷が抑えられた(矢印は損傷部位、高柳教授提供)

日本経済新聞（夕刊）

2010年（平成22年）4月12日（月曜日）

リウマチ起こす遺伝子

東京医科歯科大　治療法開発に道

東京医科歯科大学の高柳広教授らの研究チームは、関節リウマチなどの自己免疫疾患を引き起こす遺伝子を発見した。この遺伝子を壊すと症状が改善することをマウスで確認した。

治療法の開発につながる成果と説明している。

英科学誌ネイチャー（電子版）に12日掲載される。

関節リウマチや神経難病の多発性硬化症は自己免疫疾患と呼ばれ、ウイルスなどから体を守る免疫細胞のT細胞が誤って体を攻撃して起こる。通常のT細胞が体を攻撃するタイプに変わる仕組みは分かっていなかった。

研究チームは、免疫細胞の活性化にかかわる「IカッパーBゼータ」という遺伝子に注目。この遺伝子を壊したマウスを作ったところ、攻撃型のT細胞が5分の1程度に減った。

このマウスに特殊な薬で多発性硬化症を発症させると、遺伝子を壊していないマウスに多発性硬化症を発生させた場合と比べて脊髄（せきずい）の神経細胞の損傷が抑えられ、運動まひの症状が改善することが分かった。

高柳教授は「この遺伝子の働きを抑えることで効率良く病気を治せ、副作用も起こりにくいと考えられる」と話している。

讀賣新聞

2010年（平成22年）4月13日（火曜日）

関節リウマチ 原因遺伝子

東京医科歯科大チーム発見

関節リウマチや多発性硬化症などの原因となる〝悪玉〟免疫細胞を作る遺伝子を、東京医科歯科大学などのチームが突き止めた。この遺伝子の働きを抑えれば、関節リウマチなどの新しい治療法になると期待される。英科学誌ネイチャーに12日発表した。

免疫細胞は通常、ウイルスなど体内に侵入した異物を採知して攻撃するが、悪玉細胞は自分自身の体も攻撃。神経細胞が傷つけば多発性硬化症、骨なら関節リウマチを引き起こす。

同大の岡本一男助教らは、関節リウマチ患者の悪玉細胞で「IカッパーBゼータ」という遺伝子が働いているのを発見。マウスでこの遺伝子を働かないようにすると、悪玉細胞の数が通常の5分の1以下に減り、多発性硬化症を起こす薬剤を注射しても発症しなかった。

関節リウマチは国内に約70万人、多発性硬化症は約1万2000人の患者がいる。高柳広・同大教授は「IカッパーBゼータを狙い撃ちする薬を開発できれば、副作用が少ない治療法になる」と話している。

朝日新聞

2010年（平成22年）4月30日　金曜日

リウマチなどの原因物質特定

免疫の過剰反応を引き起こす主な原因物質を東京医科歯科大学の高柳広教授らの研究グループが特定した。財団法人リウマチ情報センターによると、免疫の過剰反応のうち、関節リウマチの患者だけでも日本で70万人いるとされる。特定したのは「IκBζ（アイ・カッパー・ビー・ゼータ）」というたんぱく質で、自分の体を攻撃する特殊なリンパ球をつくっていた。

（ネイチャー電子版）

挑む
Front Runner

高柳 広

東京医科歯科大学大学院教授

第3回
写真：橋本 哲

骨を中心に病気を見直す 新しい概念の提唱へ

運動機能を支える硬い組織の骨と体内を縦横に巡る免疫細胞
この2つの密接な結びつきを明らかにした骨免疫学の第一人者が
骨を中心とした全身制御系という新たな概念を提唱する

骨といえば，身体を支える硬い組織。一方，免疫はというと，体内をパトロールする免疫細胞たちが担っており，機能はあっても形はない。イメージとしては両極的な骨と免疫系だが，互いに深く影響しているとみなすのが「骨免疫学」だ。骨と免疫系の関連性は以前から漠然とは知られていたが，それを分子レベルで打ち出したのは東京医科歯科大学の高柳広だ。高柳はさらに，骨の細胞の異常が肝臓や腎臓などの臓器不全につながるという新しい疾病観を確立しようとしている。（文中敬称略）

「骨は内分泌器官」と高柳は言う。骨からさまざまなホルモンなどが出ており，その量が不足したり過剰になると，身体中の臓器に異変が生じるというのだ。こうした骨を司令塔にした全身の制御系を「オステオネットワーク」，骨の細胞が出すホルモンなどを総称して「オステオカイン」と名付けた（osteo-は骨の意味）。骨免疫学もオステオネットワークの一部とみなすわけだ。もちろん，一足飛びにこうした概念にたどりついたわけではない。まずは，出発点となった骨と免疫系を結びつけた仕事から見ていこう。

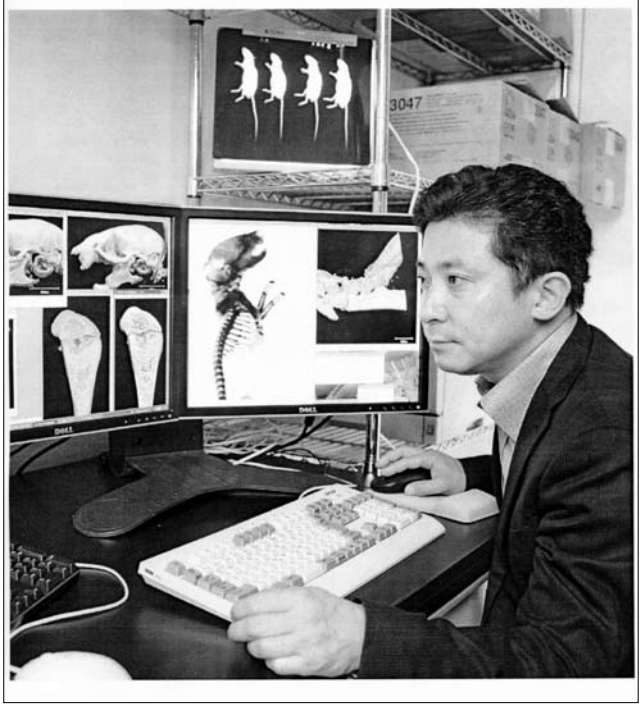
高柳が骨と免疫系のかかわりに関心を持つようになったのは，臨床医としての経験からだ。手塚治虫の『ブラック・ジャック』に憧れて「手術で患者を治せる医師になりたかった」と言う高柳は，医学部を卒業後，整形外科医として多くのリウマチ患者の手術を手がけた。リウマチは自己免疫疾患の一種で，関節が冒され，強い痛みがある。やがて骨が壊され，手術が必要となる。

「当時の治療は炎症や痛みを抑えることが中心でした。けれど，それでは骨が壊されていくのを止めることができなかった」。このため，膝の手術をした患者が，今度は股関節，次はひじというように何度も手術を重ねていく。何とかしたいと思い，大学院に戻った。

リウマチではなぜ骨が壊れるのか？身体のほかの部分と同じように，骨にも新陳代謝がある。「破骨細胞」が骨を壊す一方で，「骨芽細胞」が新しい骨細胞となっていく。この2つのバランスが狂うと骨にさまざまな不具合が生じる。リウマチは関節にある滑膜を免疫系が攻撃することで起きるが，患者の関節では破骨細胞が過剰に働いていることがわかっていた。でも，なぜ？

高柳は学位論文としてこのテーマに取り組み，その答えを突き止めた。免疫細胞のT細胞はインターフェロンγ（INF-γ）を分泌しており，それには破骨細胞を抑える働きがあるが，リウマチでの異常なT細胞はINF-γを分泌できなくなっていた。さらに，やはりT細胞が出すRANKLという因子には破骨細胞が生まれてくるのを促す作用があった。つまり，リウマチで関節に集まってくるT細胞は破骨細胞を増やす作用があり，そのうえ，骨を壊す働きを抑えることができない。

この研究は，2000年の*Nature*誌に掲載される。同じ号の解説記事で高柳の研究は「骨免疫学（osteoimmunology）」の幕開けだと評価された。



（たかやなぎ・ひろし）1965年東京生まれ。90年に東京大学医学部を卒業し，同大附属病院，東京都老人医療センターなどで臨床医を勤める。1997年に東大の大学院に戻り，免疫のサイトカイン研究の第一人者である谷口維紹教授の研究室に。2001年に博士課程修了，東大助手，科学技術振興事業団さきがけ研究21の領域研究者などを経て，2003年より東京医科歯科大学大学院の特任教授，2005年より分子情報伝達学教授。

骨と免疫系の研究を
別々に進めてきたのは
人間の勝手な都合
この2つの結びつきは
非常に本質的なものだ

遺伝子欠損マウスを使って　高柳が重視するのは，実際に身体に現れた骨の異常。研究室には，自ら作成したもののほか，多くの共同研究者から譲ってもらったノックアウトマウス（遺伝子欠損マウス）が100系統以上もいて，「ちょっとした動物園状態」。左はマウス脸弾の骨格標本。

「骨免疫学の命名はこのときですが，1980年代から骨と免疫の関連を示す研究はあった」と先人の業績を忘れない。とはいえ，医学全体を見れば骨の研究と免疫の研究はバラバラに進んでいた。でもそれは「人間が勝手に別々にしていただけのこと」と高柳は言う。

骨と免疫の起源は一緒

ヒトに至る生物の進化を振り返ると「硬い骨を必要としたのは陸に上がったとき」。そして，このときに，それまで持っていた免疫系（自然免疫）に加えて，特定の抗原だけを認識して排除する免疫系（獲得免疫）も発達した。それだけではない。成人では，免疫細胞や赤血球などを生み出す造血幹細胞は骨髄にある。「骨を作る細胞と免疫細胞は隣どうしで生まれてくる。まったく同じ場所と言った方がいいかもしれない」と高柳は言う。「骨と免疫の結びつきは非常に本質的なもの」。

無限の増殖能力を持つ幹細胞は，特別な存在だ。幹細胞が分化せずに幹細胞であり続けるためには，それを取り囲むニッチ（微環境）がきわめて重要とされている。実際にはそれほど単純ではないことがわかってきているが，大雑把にとらえると，造血幹細胞のニッチとなっているのが骨芽細胞なのだ。だから，骨の細胞に異常が起きると，免疫にも不具合が生じる。

もちろん，骨免疫学には異論もある。免疫細胞はいわば戦闘員なので，行った先々で炎症を起こす。「リウマチでは滑膜に行くだが，皮膚に行けば乾癬となる。“何とか炎”というのはすべて免疫細胞のしわざ。（不適切な免疫反応で）骨に異常が起きたからといって，骨免疫学など（という概念）を作る必要はないという批判はあります」。

だが，高柳は免疫系が正常に機能するためには，骨髄での骨芽細胞の存在が欠かせないという。例えば，大理石骨症という難病がある。破骨細胞がうまく働かないために，骨の新陳代謝が進まなくなってしまう。「さまざまな症状があるが，一番の問題は免疫不全」。

大理石骨症では骨髄がほとんどなくなってしまう。通常，血球は胎児期では肝臓で，成人すると骨髄で作られるようになるが，大理石骨症の患者では脾臓が大きくなってここで血球が作られるようになる。「これで血球系は代償されているのに，免疫の機能は不十分。骨髄が免疫には必要なのです」。

視点は次のステップへ

骨免疫学の概念は医学界でも一般的とは言い難く，「免疫学会でも骨代謝学会でも，主要な一部門という位置づけではない」。それでも高柳は「骨と免疫系の関係はわかってきたから」と次のステップを目指している。免疫系だけでなく，骨が全身の臓器に影響すると考えるオステオネットワークだ。

具体的な例として，FGF23（線維芽細胞増殖因子23）をあげる。これは腎臓でのリン酸の再吸収にかかわる因子で，不足すると高リン酸状態となりさまざまな症状が出る。このFGF23を分泌しているのは実は骨細胞なのだ。さらには，骨芽細胞の出すオステオカルシンというタンパク質がある。コロンビア大学の研究チームによると，オステオカルシンは血流にのって膵臓のβ細胞に働きかけ，インスリンの分泌量を制御しているという。

今のところ有名なのはこの2つだが，ほかにもたくさんの例を明らかにして，オステオネットワークを確立させたいと高柳は考えている。見込みはある。肝不全や呼吸器疾患の患者では骨に不具合が見られることがあるという。「（骨と臓器の）どちらが原因でどちらが結果かはわからないが，医師の間ではわりと知られている現象」。

高柳の研究アプローチは，さまざまな遺伝子欠損マウスの骨を徹底的に調べるところから始まる（今回の取材でもマウスの写真を載せてほしいと注文がついた）。「骨の研究は実際に個体レベルで現れた異変が大事。遺伝子の発現や培養細胞で異常があっても，それだけではだめ。骨に異変が見つかったら，細胞や遺伝子に落とし込む」。

高柳の研究は2009年度の科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業（ERATO）に採択された。終了予定の2014年までに骨と他の臓器の関係をいくつか明らかにできるだろうか？「（残り）4年ではタネが見つかるかどうか。骨をすりつぶして，こつこつ研究を積み重ねていくだけ」と微笑んだ。

（編集部・既摩雅子）

Vol 464|29 April 2010|doi:10.1038/nature08922 nature

LETTERS

IκBζ regulates T_H17 development by cooperating with ROR nuclear receptors

Kazuo Okamoto[1,2,3], Yoshiko Iwai[4], Masatsugu Oh-hora[1,2], Masahiro Yamamoto[5], Tomohiro Morio[6], Kazuhiro Aoki[7], Keiichi Ohya[7], Anton M. Jetten[8], Shizuo Akira[9], Tatsushi Muta[10] & Hiroshi Takayanagi[1,2,3]

Interleukin (IL)-17-producing helper T (T_H17) cells are a distinct T-cell subset characterized by its pathological role in autoimmune diseases[1–3]. IL-6 and transforming growth factor-β (TGF-β) induce T_H17 development, in which the orphan nuclear receptors, RORγt and RORα, have an indispensable role[4–6]. However, in the absence of IL-6 and TGF-β, the ectopic expression of RORγt or RORα leads to only a modest IL-17 production[5,7,8]. Here we identify a nuclear IκB family member, IκBζ (encoded by the *Nfkbiz* gene), as a transcription factor required for T_H17 development in mice. The ectopic expression of IκBζ in naive $CD4^+$ T cells together with RORγt or RORα potently induces T_H17 development, even in the absence of IL-6 and TGF-β. Notably, $Nfkbiz^{-/-}$ mice have a defect in T_H17 development and a resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The T-cell-intrinsic function of IκBζ was clearly demonstrated by the resistance to EAE of the $Rag2^{-/-}$ mice into which $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells were transferred. In cooperation with RORγt and RORα, IκBζ enhances *Il17a* expression by binding directly to the regulatory region of the *Il17a* gene. This study provides evidence for the transcriptional mechanisms underlying T_H17 development and points to a molecular basis for a novel therapeutic strategy against autoimmune disease.

IκBζ is a nuclear protein homologous to Bcl3, which interacts with the NF-κB subunit via the ankyrin repeat domain (ARD)[9,10]. In macrophages, IκBζ induced by Toll-like receptor (TLR) stimulation is essential for the induction of a subset of secondary response genes, including *Il6* (refs 11, 12). However, the function of IκBζ in other cell types has not been elucidated.

We explored the expression of IκBζ in helper T-cell subsets and found that IκBζ was most highly expressed in T_H17 cells (Fig. 1a). Thus, we evaluated the involvement of IκBζ in EAE, which is a model of T_H17 cell-mediated autoimmune disease[1]. After myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) immunization, wild-type mice developed severe paralytic symptoms, whereas $Nfkbiz^{-/-}$ mice exhibited almost no neuronal deficit (Fig. 1b). Histopathological analyses showed inflammatory cell infiltration and demyelination in the spinal cord of the wild-type mice, but not the $Nfkbiz^{-/-}$ mice (Fig. 1c). IL-17 production was reduced in the spleen and lymph node cells from immunized $Nfkbiz^{-/-}$ mice, but interferon-γ (IFN-γ) production was normal (Fig. 1d and Supplementary Fig. 1). These results indicate that $Nfkbiz^{-/-}$ mice have a defect in T_H17 development.

IκBζ expression was also detected in dendritic cells (Fig. 1a), which produce the inflammatory cytokines required for T_H17 development[1,13]. To exclude the possibility that impaired T_H17 development in $Nfkbiz^{-/-}$ mice is caused by a defect in dendritic cells, we evaluated inflammatory cytokine expression in dendritic cells. We confirmed normal production of tumour necrosis factor-α (TNF-α) and expression of CD40 and CD86 in $Nfkbiz^{-/-}$ dendritic cells after TLR stimulation (Supplementary Fig. 2 and data not shown). TLR ligand-induced production of IL-6 was partially suppressed in $Nfkbiz^{-/-}$ dendritic cells (Supplementary Fig. 2), but a co-culture of naive $CD4^+$ T cells and dendritic cells indicated that $Nfkbiz^{-/-}$ dendritic cells were able to support T_H17 development normally (Fig. 1e, f). However, T_H17 development from $Nfkbiz^{-/-}$ naive $CD4^+$ T cells was markedly impaired regardless of the origin of the co-cultured dendritic cells (Fig. 1e, f).

To demonstrate the $CD4^+$ T-cell-intrinsic function of IκBζ *in vivo*, we transferred wild-type or $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells into $Rag2^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 3), and immunized them with MOG peptide. The mice transferred with wild-type $CD4^+$ T cells developed severe EAE, whereas the mice transferred with $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells had only minimal symptoms (Fig. 1g, h). We observed no significant difference in proliferation between wild-type and $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells (Supplementary Fig. 4). The frequencies of IFN-γ^-IL-17^+ and IFN-γ^+IL-17^+ T cells, but not IFN-γ^+IL-17^- T cells, were much lower in the mice that received $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells than wild-type $CD4^+$ T cells, even at early time points after MOG immunization (Fig. 1i). Collectively, $Nfkbiz^{-/-}$ $CD4^+$ T cells have an intrinsic defect in their ability to differentiate into T_H17 cells, resulting in a low sensitivity to EAE.

When activated with anti-CD3 and anti-CD28 under T_H1- and T_H2-polarizing conditions, $Nfkbiz^{-/-}$ naive $CD4^+$ T cells normally produced IFN-γ and IL-4, respectively (Fig. 2a). On activation by the combination of IL-6 and TGF-β (the T_H17-polarizing conditions), IL-17 production in $Nfkbiz^{-/-}$ T cells was significantly reduced compared with wild-type T cells, even when we added IL-23, IL-1α, TNF-α or replaced IL-6 with IL-21 (Fig. 2a, b). The expression of *Il17f*, *Il21*, *Il23r* and *Il22* messenger RNA was much lower in $Nfkbiz^{-/-}$ T cells than in wild-type T cells (Fig. 2c). The expression of *Rorc* (encoding RORγ) and *Rora* (encoding RORα) mRNA was comparable between wild-type and $Nfkbiz^{-/-}$ T cells (Fig. 2d). The mRNA expression of *Runx1*, the aryl hydrocarbon receptor (*Ahr*), *Irf4*, *Socs3* and *Batf*,

[1]Department of Cell Signaling, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, [2]Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, [3]Japan Science and Technology Agency (JST), ERATO, Takayanagi Osteonetwork Project, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan. [4]Medical Top Track Program, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. [5]Laboratory of Immune Regulation, Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, and WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 2-2, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. [6]Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. [7]Department of Hard Tissue Engineering (Pharmacology), Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan. [8]Cell Biology Section, Division of Intramural Research, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, 111 T.W. Alexander Drive Research Triangle Park, North Carolina 27709, USA. [9]Laboratory of Host Defense, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Yamada-oka 3-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan. [10]Laboratory of Cell Recognition and Response, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aoba 6-3, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

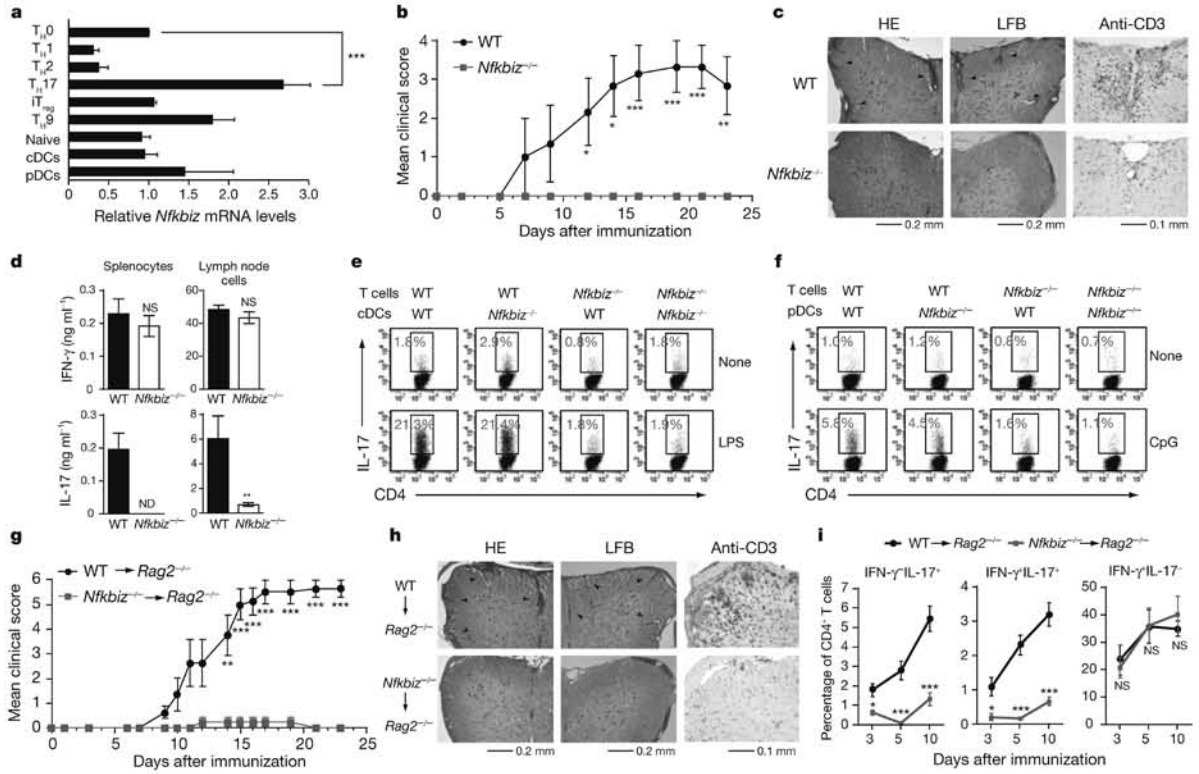


Figure 1 | *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice are resistant to EAE owing to a CD4$^+$ T-cell-intrinsic defect in T_H17 development. **a**, *Nfkbiz* mRNA expression in T_H-cell subsets, inducible T_{reg} (iT_{reg}) cells, naive CD4$^+$ T cells (Naive), conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). **b**, Disease course of EAE in wild-type (WT; $n = 5$) or *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice ($n = 5$). **c**, Pathology analysis of the spinal cord sections. Arrowheads indicate inflammatory cellular infiltrate (haematoxylin and eosin, HE) and demyelinated areas (Luxol fast blue, LFB). **d**, IFN-γ and IL-17 production in splenocytes and lymph node cells after restimulation with MOG peptide. ND, not detected. **e**, **f**, TLR-induced IL-17 production in CD4$^+$ T cells in co-culture with cDCs (**e**) or pDCs (**f**) isolated from WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice. **g**, Disease course of EAE in *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstituted with WT ($n = 8$) or *Nfkbiz*$^{-/-}$ ($n = 5$) CD4$^+$ T cells. **h**, Pathology analysis of the spinal cord sections from the reconstituted mice. **i**, Frequency of IFN-γ$^+$IL-17$^+$, IFN-γ$^-$IL-17$^+$ and IFN-γ$^+$IL-17$^-$ CD4$^+$ T cells in the reconstituted mice. Error bars (**a**, **b**, **d**, **g** and **i**), mean ± s.e.m.; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.005$; NS, not significant.

which are related to T_H17 development[7,14–18], was normal in *Nfkbiz*$^{-/-}$ T cells (Supplementary Fig. 5). The expression of genes related to the migration of T_H17 cells (*Ccr6*, *Ccl20* and *S1pr1*)[2,3] and T_H17-related cytokine receptors (*Il6ra*, *Il6st*, *Il21r*, *Il2rg*, *Il1r1* and *Il1rap*), and IL-6-induced STAT3 phosphorylation, were also normal in *Nfkbiz*$^{-/-}$ T cells (Supplementary Figs 5 and 6). There was no defect in the generation of CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$ natural regulatory T (T_{reg}) cells in *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice or the *in vitro* development of Foxp3-expressing T_{reg} cells from *Nfkbiz*$^{-/-}$ naive CD4$^+$ T cells (Supplementary Fig. 7). Taken together, IκBζ actively contributes to T_H17 development without affecting T_{reg} cell development.

IκBζ has three alternative splicing variants[10]: IκBζ (L) is the major splicing variant in macrophages, and IκBζ (S) lacks the amino-terminal 99 amino acids of IκBζ (L). Unlike these two variants, the minor splicing variant IκBζ (D) lacks transactivation activity[19]. Immunoblot and PCR with reverse transcription (RT–PCR) analyses showed that T_H17 cells predominantly expressed IκBζ (L) and slightly IκBζ (S), but not IκBζ (D) (Fig. 2e and Supplementary Figs 8 and 9).

IκBζ expression was upregulated by the combination of IL-6 and TGF-β, whereas IL-6 or TGF-β alone had no effect (Fig. 2f and Supplementary Figs 8 and 9). Addition of IL-23 did not have any effect on IκBζ expression (Fig. 2f and Supplementary Fig. 9b). IκBζ expression is regulated by the MyD88-mediated pathway in macrophages[11], and its mRNA is stabilized by the IL-17R-mediated signal in fibroblasts[20]. However, IκBζ is normally induced by the combination of IL-6 and TGF-β in *Myd88*$^{-/-}$ CD4$^+$ T cells, as well as in *Il17a*$^{-/-}$ CD4$^+$ T cells (Fig. 2g and Supplementary Fig. 9d). Notably, IκBζ induction was normal in *Rorc*$^{-/-}$ CD4$^+$ T cells, but severely impaired in Stat3-deficient CD4$^+$ T cells during T_H17 development (Fig. 2g and Supplementary Fig. 9d). Therefore, IκBζ induction is mediated by Stat3, but not by RORγt, in T_H17 cells.

We next investigated the mechanism by which IκBζ regulates T_H17 development. Overexpression of IκBζ in CD4$^+$ T cells induced T_H17 development only when stimulated with IL-6 and TGF-β (Fig. 3a, b and Supplementary Fig. 10), indicating that IκBζ does not act alone, but rather, cooperates with other factor(s) in T_H17 development. Among the T_H17-related cytokines, *Il22* expression was not upregulated by the overexpression of IκBζ without the addition of IL-23 (data not shown). We next determined which domain is responsible for IκBζ function in T_H17 development using IκBζ variants and deletion mutants[19] (Fig. 3c). IκBζ (L) and IκBζ (S) augmented T_H17 development significantly (Fig. 3d), but this augmentation was abolished in IκBζ (D) and IκBζ (L) 457–728, both of which lack the transcriptional activation domain (TAD), as well as in IκBζ (L) 1–456, which lacks the ARD (Fig. 3d). These results indicate that the function of IκBζ in T_H17 cells is dependent on both its transcriptional activity and ARD-mediated interaction with NF-κB.

The interaction between NF-κB p50 (encoded by the *Nfkb1* gene) and IκBζ is necessary for TLR-mediated induction of the inflammatory genes in macrophages[11]. This led us to examine whether p50 is required for IκBζ-mediated T_H17 development. p50 and RelA, but not cRel,

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

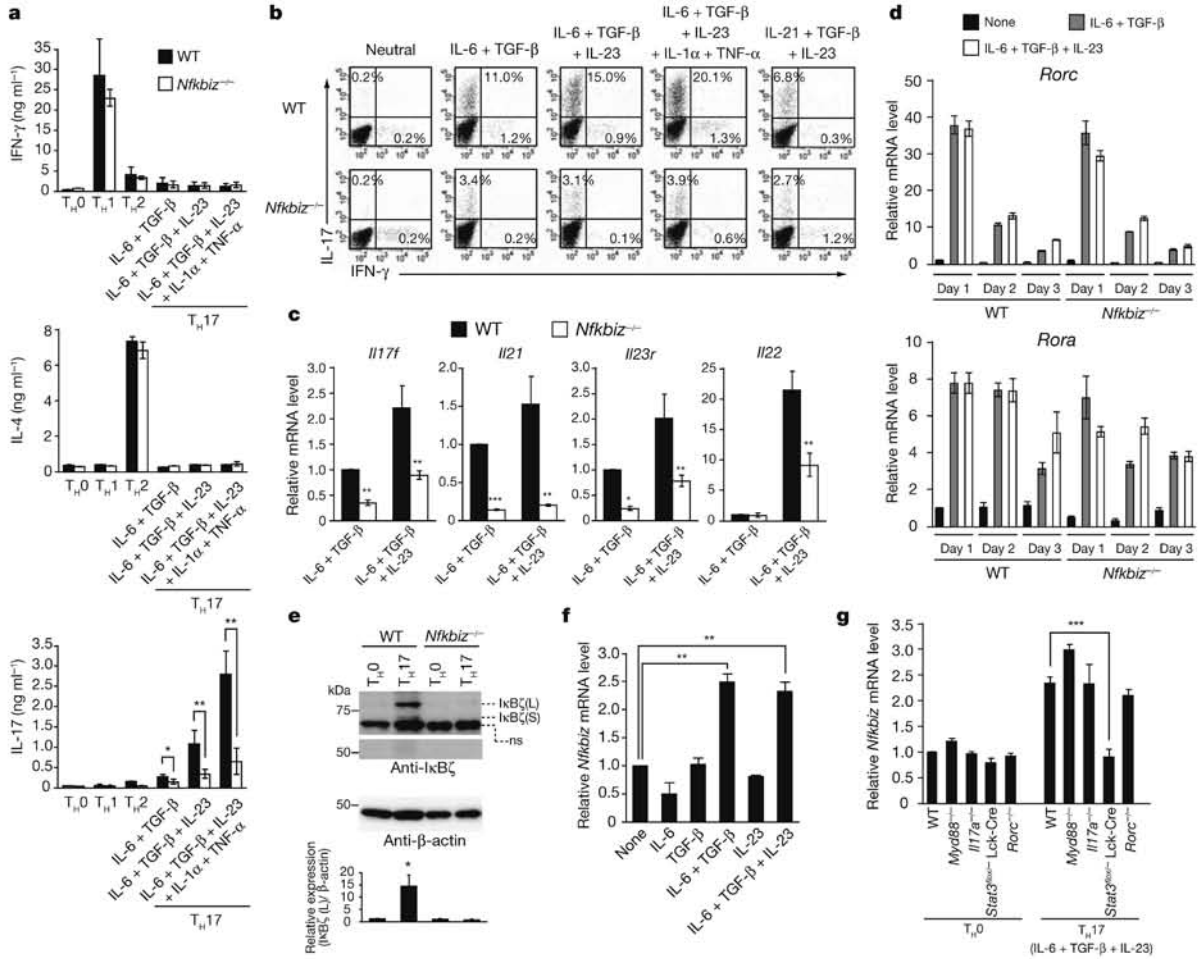


Figure 2 | Targeted disruption of the *Nfkbiz* gene results in impaired T_H17 development. **a**, IFN-γ, IL-4 and IL-17 production in WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells activated under T_H0-, T_H1-, T_H2- or T_H17-polarizing conditions. **b**, Intracellular expression of IFN-γ and IL-17 in WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells activated under T_H0- or T_H17-polarizing conditions. **c**, *Il17f*, *Il21*, *Il23r* and *Il22* mRNA expression in WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. **d**, *Rorc* and *Rora* mRNA expression in WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells cultured for 1, 2 or 3 days. **e**, Protein expression level of the IκBζ splicing variants IκBζ (L) (79 kDa), IκBζ (S) (69 kDa) and IκBζ (D) (57 kDa) in T_H0 or T_H17 cells. ns, non-specific band. **f**, Effects of the cytokines on *Nfkbiz* mRNA expression in $CD4^+$ T cells. **g**, *Nfkbiz* mRNA expression in $CD4^+$ T cells derived from *Myd88*$^{-/-}$, *Il17a*$^{-/-}$, *Stat3*$^{flox/-}$ Lck-Cre or *Rorc*$^{-/-}$ mice. Error bars (**a** and **c**–**g**), mean ± s.e.m.; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.005$.

enhanced the ability of IκBζ to induce IL-17 production under T_H17-polarizing conditions (Supplementary Fig. 11). However, *Nfkb1*$^{-/-}$ naive $CD4^+$ T cells normally differentiated into T_H17 cells (Supplementary Fig. 12), and ectopic expression of IκBζ enhanced T_H17 development even in *Nfkb1*$^{-/-}$ T cells (Supplementary Fig. 13). Therefore, p50 is not essential for IκBζ-mediated regulation of T_H17 development. In the absence of IL-6 and TGF-β, co-expression of IκBζ and an NF-κB subunit did not induce T_H17 development (Supplementary Fig. 11), indicating that a factor(s) other than NF-κB is required for IκBζ-mediated regulation of T_H17 development.

These results prompted us to test whether IκBζ functions in cooperation with RORγt or RORα in T_H17 development. In the absence of IL-6 and TGF-β, neither the ROR nuclear receptors nor IκBζ induced T_H17 development efficiently (Figs 3a and 4a), but when IκBζ (L) or (S) was overexpressed, either RORγt or RORα strongly induced IL-17 production, even in the absence of exogenous polarizing cytokines (Fig. 4a and Supplementary Fig. 14). These findings indicate that the ROR nuclear receptors and IκBζ synergistically promote T_H17 development. Under T_H17-polarizing conditions, RORγt or RORα alone strikingly induced IL-17 production (Fig. 4a), to which IκBζ induced by the combination of IL-6 and TGF-β may contribute (Fig. 2f and Supplementary Figs 8 and 9). IL-17 production induced by RORγt or RORα overexpression was significantly decreased in *Nfkbiz*$^{-/-}$ T cells under T_H17-polarizing conditions (Fig. 4b), the decrease of which was not restored by the addition of exogenous IL-21 or IL-9 (Supplementary Fig. 15). IL-17 induction was severely impaired when IκBζ was overexpressed in *Rorc*$^{-/-}$ or homozygous *Staggerer* mutation (*Rora*$^{sg/sg}$) cells[21] (Fig. 4c and Supplementary Fig. 16). Taken together, the cooperation of IκBζ with RORγt or RORα is clearly essential for T_H17 development.

Does IκBζ directly regulate the *Il17a* promoter? Seven IκBζ response elements[22] were found within the 6.6-kilobase-pair promoter region of the mouse *Il17a* gene (Fig. 4d). The reporter assay showed that IκBζ (L) and (S) moderately activated the *Il17a* promoter as well as RORγt and RORα (Fig. 4e). When RORγt or RORα was expressed, IκBζ (L) and (S), but not (D), activated the *Il17a* promoter to a much larger extent (Fig. 4e). An evolutionarily conserved non-coding sequences (CNS) 2 region in the *Il17a* locus was reported to be associated with histone H3 acetylation in a T_H17 lineage-specific

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

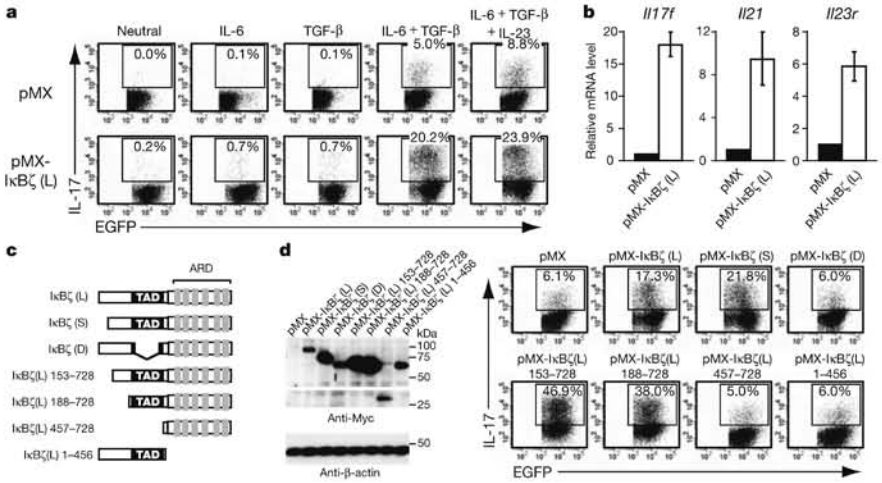


Figure 3 | Ectopic expression of IκBζ facilitates T_H17 development. **a**, Effects of retroviral expression of IκBζ (L) on IL-17 production. **b**, Effects of retroviral expression of IκBζ (L) on *Il17f*, *Il21* and *Il23r* mRNA expression in $CD4^+$ T cells activated in the presence of IL-6 and TGF-β. Error bars, mean ± s.e.m. **c**, Schematic of IκBζ variants and truncated mutants of IκBζ (L). **d**, Effects of retroviral expression of the Myc-tagged IκBζ variants and mutants on T_H17 development (right). Immunoblot analysis of IκBζ protein levels in Myc-tagged IκBζ variants-expressing $CD4^+$ T cells (left). IκBζ (L) 153–728 and IκBζ (L) 188–728 had a more potent activity to induce IL-17 production than IκBζ (L), which may be correlated to their high expression levels.

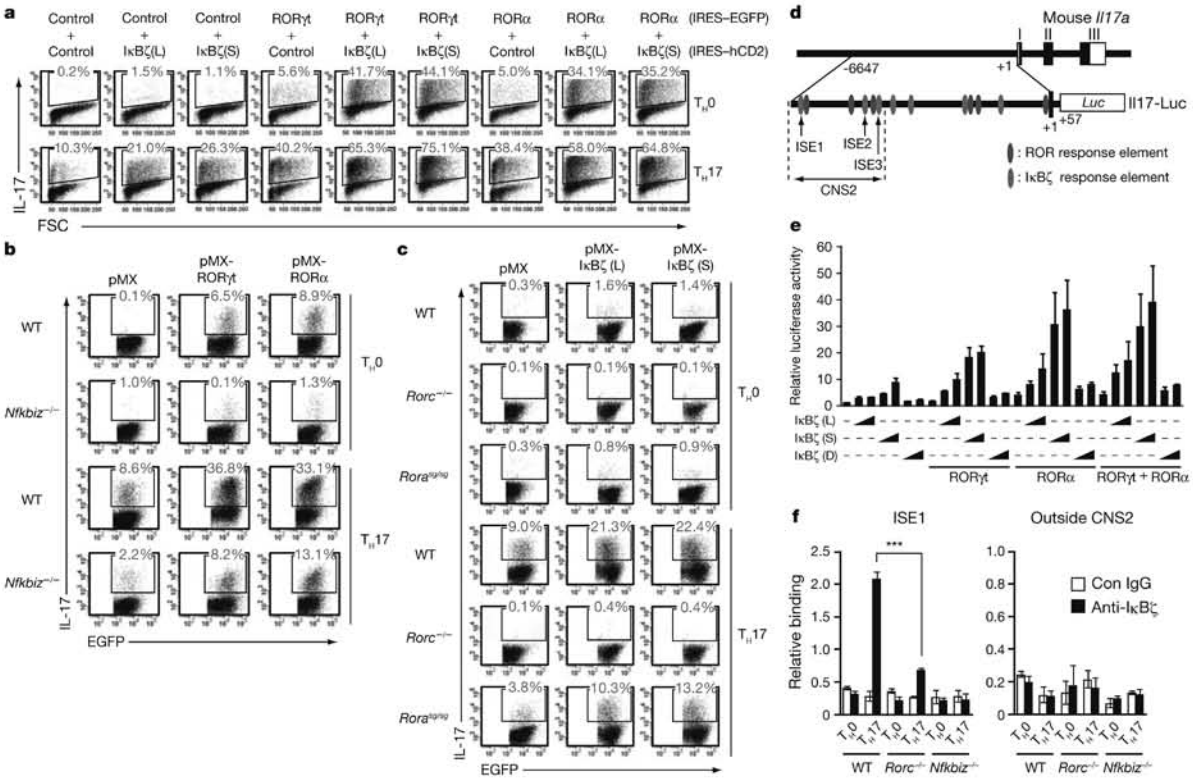


Figure 4 | IκBζ and ROR nuclear receptors cooperatively activate the *Il17a* promoter and facilitate T_H17 development. **a**, IL-17 production in $CD4^+$ T cells transduced with IκBζ (IRES–hCD2) and RORγt or RORα (IRES–EGFP) after activation under T_H0- or T_H17-polarizing conditions. FSC, forward scatter. **b**, Effects of retroviral expression of RORγt or RORα on IL-17 production in WT or *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. **c**, Effects of retroviral expression of IκBζ on IL-17 production in WT, *Rorc*$^{-/-}$ or *Rora*$^{sg/sg}$ $CD4^+$ T cells. **d**, Putative IκBζ and ROR response elements[5,17,21] in the mouse *Il17a* promoter and the Il17-Luc construct. Three IκBζ response elements were located in the CNS2 region (ISE1, −6350 to −6339; ISE2, −4795 to −4786; ISE3, −4454 to −4445). The transcriptional initiation site was designated as +1. **e**, Effects of IκBζ on RORγt and/or RORα-mediated activation of the *Il17a* promoter. **f**, Recruitment of IκBζ to the ISE1 region or the region outside CNS2 (−3978 to −3969) in WT, *Rorc*$^{-/-}$, *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells. Error bars (**e** and **f**), mean ± s.e.m. ***$P < 0.005$.

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

manner and with ROR nuclear receptor-directed IL-17 production[5,17,23]. IκBζ facilitated the CNS2 enhancer activity in combination with RORγt and RORα (Supplementary Fig. 17a, b). However, the *Il17a* promoter region lacking the CNS2 region was not activated by the co-expression of IκBζ and RORγt or RORα (Supplementary Fig. 17a, c, d). IκBζ induced the CNS2 enhancer activity mainly through the distal IκBζ response element (ISE1: −6350 to −6339) (Fig. 4d) among the three IκBζ response elements in the CNS2 region (Supplementary Fig. 18). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments showed that IκBζ was recruited to the ISE1 region in T_H17 cells, but not in T_H0 cells (Fig. 4f). We observed no physical interaction between IκBζ and RORγt or RORα by immunoprecipitation assay (data not shown), but recruitment of IκBζ to the ISE1 region was dependent on RORγt (Fig. 4f). These results indicate that T_H17 development entails IκBζ recruitment to the regulatory region of the *Il17a* gene, a process in which ROR nuclear receptors have a critical role.

This study demonstrates that IκBζ, which has a key role in the innate immune response, regulates T_H17 development in a T-cell-intrinsic manner. IκBζ, like Runx1 and Batf[14,17], does not act alone, but in cooperation with ROR nuclear receptors. This does not reduce the importance of IκBζ as the therapeutic target, because disruption of IκBζ alone leads to a complete resistance to EAE (Fig. 1). Runx1, Batf and IRF4 function upstream of RORγt[7,14,17], but it is unlikely that ROR nuclear receptors function downstream of IκBζ or vice versa (Fig. 2d, g and Supplementary Fig. 9d). We speculate that the binding of both IκBζ and ROR nuclear receptors to the *Il17* promoter leads to an efficient recruitment of transcriptional coactivators with histone acetylase activity[5,23]. Moreover, RORγt may be involved in the regulation of the accessibility of IκBζ to the specific transcriptional regulatory regions (Fig. 4f). Interestingly, *Il17f*, *Il21* and *Il23r* mRNA expression was impaired in *Nfkbiz*$^{-/-}$ T cells (Fig. 2c). ChIP analyses showed recruitment of IκBζ to the promoter or the enhancer region of these T_H17-related cytokine genes (Supplementary Fig. 19), indicating that IκBζ directly regulates these genes. *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice develop atopic dermatitis-like skin lesions[11,24]. However, as the dermatitis was not observed in the *Rag2*$^{-/-}$ mice reconstituted with *Nfkbiz*$^{-/-}$ $CD4^+$ T cells or *Nfkbiz*$^{-/-}$ fetal liver cells (data not shown), it is not likely that the dermatitis was caused by T-cell-intrinsic abnormalities, including impaired T_H17 development. Thus, the present study demonstrates the T-cell-specific function of IκBζ, which is important for understanding the transcriptional program in T_H17 cell lineage commitment.

METHODS SUMMARY

T-cell differentiation *in vitro*. Naive $CD4^+$ T cells were purified from spleen using the $CD4^+CD62L^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) (purity was >95%) and activated with plate-bound 2 μg ml^{-1} anti-CD3 (145-2C11, BD Biosciences) and 2 μg ml^{-1} anti-CD28 (37.51, BD Biosciences) for 3 days under various polarizing conditions (see Methods for details).

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 12 August 2009; accepted 10 February 2010.
Published online 11 April 2010.

1. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 485–517 (2009).
2. Dong, C. T_H17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Rev. Immunol.* **8,** 337–348 (2008).
3. O'Shea, J. J. *et al.* Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect.* **11,** 599–611 (2009).
4. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17$^+$ T helper cells. *Cell* **126,** 1121–1133 (2006).
5. Yang, X. O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors RORα and RORγ. *Immunity* **28,** 29–39 (2008).
6. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human T_H-17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγt. *Nature Immunol.* **9,** 641–649 (2008).
7. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory T_H-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature Immunol.* **8,** 958–966 (2007).
8. Huber, M. *et al.* IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105,** 20846–20851 (2008).
9. Yamazaki, S., Muta, T. & Takeshige, K. A novel IκB protein, IκB-ζ, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-κB in the nuclei. *J. Biol. Chem.* **276,** 27657–27662 (2001).
10. Muta, T. IκB-ζ: an inducible regulator of nuclear factor-κB. *Vitam. Horm.* **74,** 301–316 (2006).
11. Yamamoto, M. *et al.* Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IκBζ. *Nature* **430,** 218–222 (2004).
12. Yamamoto, M. & Takeda, K. Role of nuclear IκB proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* **14,** 265–269 (2008).
13. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24,** 179–189 (2006).
14. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T_H17 differentiation. *Nature* **460,** 405–409 (2009).
15. Quintana, F. J. *et al.* Control of T_{reg} and T_H17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453,** 65–71 (2008).
16. Veldhoen, M. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links T_H17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453,** 106–109 (2008).
17. Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, RORγt and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature Immunol.* **9,** 1297–1306 (2008).
18. Chen, Z. *et al.* Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103,** 8137–8142 (2006).
19. Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K. & Muta, T. Positive and negative regulation of nuclear factor-κB-mediated transcription by IκB-ζ, an inducible nuclear protein. *J. Biol. Chem.* **280,** 7444–7451 (2005).
20. Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S. & Takeshige, K. Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-κB regulator, IκB-ζ, via Toll/interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **280,** 1678–1687 (2005).
21. Jetten, A. M. & Joo, J. H. Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cellular differentiation and development. *Adv. Dev. Biol.* **16,** 313–355 (2006).
22. Matsuo, S., Yamazaki, S., Takeshige, K. & Muta, T. Crucial roles of binding sites for NF-κB and C/EBPs in IκB-ζ-mediated transcriptional activation. *Biochem. J.* **405,** 605–615 (2007).
23. Akimzhanov, A. M., Yang, X. O. & Dong, C. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **282,** 5969–5972 (2007).
24. Shiina, T. *et al.* Targeted disruption of MAIL, a nuclear IκB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J. Biol. Chem.* **279,** 55493–55498 (2004).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We are grateful to Y. Iwakura and T. Kitamura for providing *Il17a*$^{-/-}$ mice and retrovirus vectors, respectively. We also thank M. Shinohara, T. Negishi-Koga, M. Asagiri, T. Nakashima, N. Komatsu, M. Ohba, Y. Kunisawa, Y. Suzuki, S. Miyakoshi and T. Kunigami for discussion and assistance. This work was supported in part by Grant-in-Aid for Creative Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research from JSPS, Grant-in-Aid for JSPS Fellows, Grants-in-Aid for GCOE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), and ERATO, Takayanagi Osteonetwork Project from JST. It was also supported by grants from the Intramural Research Program of the NIEHS (Z01-ES-101586) (to A.M.J.), Takeda Life Science Foundation and Yokoyama Foundation for Clinical Pharmacology and the Ichiro Kanehara Foundation. Ka.O. is supported by JSPS Research Fellowships for Young Scientists.

Author Contributions Ka.O. performed all of the experiments, interpreted the results and prepared the manuscript. Y.I. contributed to dendritic cells experiments and T-cell transfer experiments. M.O. contributed to study design and manuscript preparation. M.Y., A.M.J. and S.A. provided genetically modified mice and advice on data analysis. To.M. provided advice on project planning and data interpretation. K.A. and Ke.O. supported the experiments using *Nfkb1*$^{-/-}$ mice. Ta.M. provided genetically modified mice and the plasmids, and advised on project planning. H.T. directed the project and wrote the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.T. (taka.csi@tmd.ac.jp).

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

doi:10.1038/nature08922

METHODS

Mice. We used *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice on a mixed 129Sv-C57BL/6 background at 5 weeks after birth[11] because of the almost complete embryonic lethality of the inbred C57BL/6 genetic background. *Rorc*$^{-/-}$ (ref. 25), *Myd88*$^{-/-}$ (ref. 26), and *Il17a*$^{-/-}$ (ref. 27) mice on a C57BL/6 background were described previously. *Nfkb1*$^{-/-}$ (ref. 28) and *Rora*$^{sg/+}$ (ref. 29) mice on a C57BL/6 background were obtained from The Jackson Laboratory. *Rag2*$^{-/-}$ mice on a C57BL/6 background were purchased from Taconic Farms. For the generation of mice with T-cell-specific disruption of *Stat3*, Lck-Cre transgenic mice (The Jackson Laboratory) were bred with *Stat3*$^{flox/-}$ mice[30]. We used wild-type littermates as controls in all experiments. All of the animals were maintained in a specific pathogen-free environment, and all animal experiments were performed with the approval of the institutional committee.

T-cell differentiation *in vitro*. The conditions for different T_H cell subsets were: 10 μg ml^{-1} anti-IL-4 (11B11, BD Biosciences) and 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ (XMG1.2, BD Biosciences) for T_H0 (neutral conditions); 10 μg ml^{-1} anti-IL-4 and 10 ng ml^{-1} IL-12 (PeproTech) for T_H1; 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ and 10 ng ml^{-1} IL-4 (PeproTech) for T_H2; 10 μg ml^{-1} anti-IL-4, 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ and 2.5 ng ml^{-1} TGF-β (PeproTech) for inducible T_{reg}; 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ, 10 ng ml^{-1} IL-4 and 1 ng ml^{-1} TGF-β for T_H9; 10 μg ml^{-1} anti-IL-4, 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ, 30 ng ml^{-1} IL-6 (PeproTech), 2.5 ng ml^{-1} TGF-β, 50 ng ml^{-1} IL-23 (R&D Systems), 80 ng ml^{-1} IL-21 (R&D Systems), 10 ng ml^{-1} IL-1α (PeproTech), 10 ng ml^{-1} TNF-α (R&D Systems) or a combination of these stimuli for T_H17. Activated cells were restimulated with 40 ng ml^{-1} phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem) and 0.5 μg ml^{-1} ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences) for 4 h before intracellular staining, or restimulated with 2 μg ml^{-1} anti-CD3 and 2 μg ml^{-1} anti-CD28 for 3 days before enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We cultured cells in RPMI 1640 medium (Invitrogen) unless otherwise indicated, or in IMDM medium (Sigma-Aldrich) in Supplementary Figs 8a, c and 9c.

Induction of EAE. The MOG35–55 peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) was synthesized by Biologica. For the induction of EAE, we used 5-week-old *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice in which no apparent symptoms of dermatitis were observed. Age-matched wild-type and *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice were immunized subcutaneously with the MOG peptide (250 μg per mouse) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) containing 40 ng ml^{-1} *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories) (day 0). After immunization, the mice were intraperitoneally injected with pertussis toxin (200 ng per mouse, Sigma-Aldrich) on days 0 and 2. On day 23, lymphoid cells were prepared from the spleens and lymph nodes of the immunized mice, and were then stimulated with 25 μg ml^{-1} MOG peptide, or 2 μg ml^{-1} anti-CD3 and 2 μg ml^{-1} anti-CD28 for 48 h, after which IFN-γ and IL-17 production was analysed by ELISA.

For the induction of EAE in the reconstituted *Rag2*$^{-/-}$ mice, MOG peptide (150 μg per mouse) emulsified in CFA was injected on days 0 and 7. Pertussis toxin (400 ng per mouse) was injected on days 1 and 8. On day 3, 5 or 10, splenocytes isolated from the recipients were stimulated with 2 μg ml^{-1} anti-CD3 and 2 μg ml^{-1} anti-CD28 for 24 h. GolgiPlug was added for the final 4 h of culture, and then intracellular IL-17 and IFN-γ expression in CD4$^+$ T cells was analysed by flow cytometry. For the 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay, the mice were intraperitoneally injected with BrdU (1 mg per mouse, Sigma-Aldrich) on day 10. Eighteen hours later, CD4$^+$ T cells isolated from the spleen were analysed by flow cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-BrdU (3D4, BD Biosciences).

Animals were scored for clinical signs of EAE for 23 days using the following criteria: 0, no clinical signs; 1, limp tail (tail paralysis); 2, complete loss of tail tonicity or abnormal gait; 3, partial hind limb paralysis; 4, complete hind limb paralysis; 5, forelimb paralysis or moribund; and 6, death. Histological analyses were performed as described[31].

CD4$^+$ T-cell transfer. CD4$^+$ T cells were prepared from the spleens of wild-type and *Nfkbiz*$^{-/-}$ mice using the CD4$^+$ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) (purity was >95%). CD4$^+$ T cells (7×10^6 per mouse) were injected intravenously into *Rag2*$^{-/-}$ mice. One day later, the recipient mice were subjected to EAE induction.

Purification of dendritic cells and dendritic cell–T cell co-culture. PDCA1$^+$ cells and PDCA1$^-$CD11c$^+$ cells were used as plasmacytoid and conventional dendritic cells, respectively, which were isolated from the spleen using anti-PDCA1 microbeads and anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotec) (purity was >95%). In the presence of either 100 ng ml^{-1} lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) or 100 nM endotoxin-free phosphorothioate-stabilized CpG oligodeoxynucleotides (5′-TCCATGACGTTCCTGATGCT-3′) (Hokkaido System Science), naive CD4$^+$ T cells were co-cultured with dendritic cells in the presence of 1 ng ml^{-1} soluble anti-CD3, 2.5 ng ml^{-1} TGF-β, 10 μg ml^{-1} anti-IFN-γ and 10 μg ml^{-1} anti-IL-4. Three days later, cells were restimulated with 40 ng ml^{-1} PMA plus 0.5 μg ml^{-1} ionomycin in the presence of GolgiPlug for 4 h, after which CD4$^+$ T cells were analysed for intracellular IL-17 and IFN-γ. For analysis of cytokine production and surface marker expression, dendritic cells were cultured with 100 ng ml^{-1} LPS or 100 nM CpG DNA for 24 h.

Quantitative RT–PCR. Total RNA was extracted with ISOGEN (Wako). Quantitative RT–PCR was performed with a LightCycler (Roche) using SYBR Green (Toyobo) as described[31]. The primer sequences are described in Supplementary Table 1. The level of mRNA expression was normalized to that of *Gapdh* mRNA expression.

ELISA. Concentrations of cytokines in the culture supernatant were determined by ELISA kits (IFN-γ, IL-4 and IL-17, BD Biosciences; IL-6 and TNF-α, eBioscience), according to the manufacturers' instructions.

Retroviral transduction. pMX-IRES-EGFP and pMX-IRES-hCD2 are bicistronic retroviral vectors containing enhanced green fluorescence protein (EGFP) and human CD2 lacking the cytoplasmic domain, respectively, under the control of an internal ribosome entry site (IRES)[32]. The cDNA fragments of CD2, RORγt, RORα, RelA, cRel and p50 were amplified by PCR. cDNA fragments of IκBζ splicing variants and truncated mutants[19] were cloned into pMX-IRES-EGFP or pMX-IRES-hCD2 with a Myc tag added at its 5′ end. cDNA fragments of RORγt, RORα, RelA, cRel and p50 were cloned into pMX-IRES-EGFP. Retroviral packaging was performed by transfecting Plat-E cells with the plasmids as described previously[33]. Naive CD4$^+$ T cells were plated in wells pre-coated with 100 μg ml^{-1} goat anti-hamster IgG (Cappel) followed by 0.5 μg ml^{-1} anti-CD3 and 0.5 μg ml^{-1} anti-CD28 for 3 days in the presence of 5 ng ml^{-1} IL-2 (PeproTech) under the following conditions: anti-IL-4, anti-IFN-γ for T_H0 (neutral conditions); anti-IL-4, anti-IFN-γ, IL-6 and TGF-β for T_H17. In Supplementary Fig. 14, 10 μg ml^{-1} anti-TGF-β (1D11, R&D Systems) were added into the cultures. On days 1 and 2, cells were infected with fresh retroviral supernatant by centrifugation for 2 h at 780*g* in the presence of 10 μg ml^{-1} polybrene (Sigma-Aldrich). Cells were further cultured for 3 days. For intracellular cytokine staining, cells were restimulated for 4 h with 40 ng ml^{-1} PMA plus 0.5 μg ml^{-1} ionomycin in the presence of GolgiPlug. For quantitative RT–PCR and immunoblot analyses, EGFP$^+$ cells were sorted by MoFlo (Beckman Coulter).

Flow cytometry and antibodies. For the analysis of natural T_{reg} cells, single-cell suspensions prepared from the thymus, spleen and lymph nodes were stained with fluorophore-conjugated monoclonal antibodies: FITC-conjugated anti-CD4 (RM4-5, BD Biosciences), phycoerythrin-cyanine 7-conjugated anti-CD25 (PC61, BD Biosciences) and allophycocyanin-conjugated anti-Foxp3 (FJK-16 s, eBioscience). For intracellular cytokine staining, phycoerythrin-conjugated anti-mouse IL-17 (TC11-18H10, BD Biosciences), allophycocyanin-conjugated anti-mouse IFN-γ (XMG1.2, BD Biosciences) and allophycocyanin-conjugated anti-human CD2 (LFA-2, eBioscience) were used. For the analysis of the phosphorylation of STAT3, cells were stained with anti-phospho-STAT3 (D3A7, Cell Signaling Technology) followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (BioSource). Flow cytometric analysis was performed by FACSCanto II with Diva software (BD Biosciences).

Reporter gene assay. The reporter plasmid Il17-Luc, Il17 4371-Luc and Il17 1547-Luc were constructed by subcloning a 6,647-base-pair (bp) fragment, a 4,371-bp fragment and a 1,547-bp fragment of the 5′ flanking region of the mouse *Il17a* gene, respectively, into the pGL3-basic vector (Promega). Il17 CNS2-Luc was constructed by subcloning the CNS2 region of the *Il17a* gene into the pTAL-Luc (Clontech). The mutations introduced into Il17 CNS2-Luc were as follows: 5′-AGGGACTGTCCC-3′ (ISE1) to 5′-AAATACTGTCCC-3′; 5′-GGGAAAACACT-3′ (ISE2) to 5′-AATAAAACACT-3′; 5′-GGAAGCGCCT-3′ (ISE3) to 5′-ATAAGCGCCT-3′. The expression plasmids of IκBζ (L), (S) and (D) have been described[19]. cDNA fragments of RORγt and RORα amplified by PCR were subcloned into the expression vector. The reporter plasmids and the expression plasmids were transfected into HEK293T cells using FuGENE 6 (Roche). After 36 h, dual luciferase assay was performed according to the manufacturer's protocol (Promega).

Immunoblot analysis. Immunoblot analysis was performed using antibodies against β-actin (Sigma-Aldrich), Myc (MBL) or IκBζ (C-15, Santa Cruz) as described[31].

Chromatin immunoprecipitation assay. Naive CD4$^+$ T cells were activated with plate-bound 2 μg ml^{-1} anti-CD3 and 2 μg ml^{-1} anti-CD28 for 3 days in the presence of anti-IL-4 and anti-IFN-γ for the development of T_H0, or anti-IL-4, anti-IFN-γ, IL-6, TGF-β and IL-23 for the development of T_H17. ChIP assay was performed using antibodies against IκBζ (C-15, Santa Cruz) and normal goat IgG (Santa Cruz) as described with minor modifications[34]. Quantitative PCR was performed with a LightCycler using the primers described in Supplementary Table 2. The data are presented as the relative binding based on normalization to input DNA. The evolutionarily conserved regions were identified as regions sharing at least 70% sequence identity across at least 100 bp using the rVista 2.0 web tool[35].

Statistical analysis. All data are expressed as the mean ± s.e.m. ($n = 3$ or more). Statistical analysis was performed using the unpaired two-tailed Student's *t*-test

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

doi:10.1038/nature08922 nature

(*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.005$; NS, not significant, throughout the paper). Results are representative examples of more than three independent experiments.

25. Kurebayashi, S. *et al.* Retinoid-related orphan receptorγ (RORγ) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97,** 10132–10137 (2000).
26. Adachi, O. *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9,** 143–150 (1998).
27. Nakae, S. *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17,** 375–387 (2002).
28. Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I. & Baltimore, D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-κB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80,** 321–330 (1995).
29. Hamilton, B. A. *et al.* Disruption of the nuclear hormone receptor RORα in *staggerer* mice. *Nature* **379,** 736–739 (1996).
30. Takeda, K. *et al.* Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* **161,** 4652–4660 (1998).
31. Asagiri, M. *et al.* Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* **319,** 624–627 (2008).
32. Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* **31,** 1007–1014 (2003).
33. Shinohara, M. *et al.* Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* **132,** 794–806 (2008).
34. Koga, T. *et al.* NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature Med.* **11,** 880–885 (2005).
35. Loots, G. G. & Ovcharenko, I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* **32,** W217–W221 (2004).

©2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation

Keizo Nishikawa[a,b], Tomoki Nakashima[a,b,c], Mikihito Hayashi[a,b], Takanobu Fukunaga[a,b], Shigeaki Kato[d,e], Tatsuhiko Kodama[f], Satoru Takahashi[g], Kathryn Calame[h], and Hiroshi Takayanagi[a,b,c,1]

[a]Department of Cell Signaling, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8549, Japan; [b]Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo 113-8549, Japan; [c]Takayanagi Osteonetwork Project, Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Tokyo 113-8549, Japan; [d]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-0032, Japan; [e]Kato Nuclear Complex, Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan; [f]Research Center for Advanced Science and Technology, Department of Molecular Biology and Medicine, University of Tokyo, Tokyo 153-8904, Japan; [g]Institute of Basic Medical Sciences and Laboratory Animal Resource Center, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8575, Japan; and [h]Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032

Edited by Anjana Rao, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved December 23, 2009 (received for review November 7, 2009)

Regulation of irreversible cell lineage commitment depends on a delicate balance between positive and negative regulators, which comprise a sophisticated network of transcription factors. Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) stimulates the differentiation of bone-resorbing osteoclasts through the induction of nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1), the essential transcription factor for osteoclastogenesis. Osteoclast-specific robust induction of NFATc1 is achieved through an autoamplification mechanism, in which NFATc1 is constantly activated by calcium signaling while the negative regulators of NFATc1 are suppressed. However, it has been unclear how such negative regulators are repressed during osteoclastogenesis. Here we show that B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp1; encoded by *Prdm1*), which is induced by RANKL through NFATc1 during osteoclastogenesis, functions as a transcriptional repressor of anti-osteoclastogenic genes such as *Irf8* and *Mafb*. Overexpression of Blimp1 leads to an increase in osteoclast formation, and *Prdm1*-deficient osteoclast precursor cells do not undergo osteoclast differentiation efficiently. The importance of Blimp1 in bone homeostasis is underscored by the observation that mice with an osteoclast-specific deficiency in the *Prdm1* gene exhibit a high bone mass phenotype caused by a decreased number of osteoclasts. Thus, NFATc1 choreographs the determination of cell fate in the osteoclast lineage by inducing the repression of negative regulators as well as through its effect on positive regulators.

B lymphocyte induced maturation protein 1 | nuclear factor of activated T cells c1 | osteoclastogenesis | transcription | bone

Osteoclasts are multinucleated cells of monocyte/macrophage lineage that degrade bone matrix. The maintenance of bone homeostasis is dependent on the balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts (1, 2). Excessive bone resorption by osteoclasts is often associated with diseases accompanied by pathological bone loss, including osteoporosis and rheumatoid arthritis (3–6); thus research into the mechanisms of osteoclast differentiation is both biologically and clinically important.

Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) is a key cytokine that stimulates the osteoclast precursor cells to fuse and undergo differentiation into osteoclasts (7, 8). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) also is an essential cytokine for osteoclastogenesis, which is important for the survival of the osteoclast lineage and the expression of RANK, the receptor for RANKL (9). RANKL binding to RANK results in the recruitment of the TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), leading to the activation of NF-κB and JNK (10). RANK also stimulates the induction of *Fos* and thus activates the activator protein-1 (AP-1) complex containing c-Fos (11). NF-κB induces the initial induction of nuclear factor of activated T cells c1 (*Nfatc1*), the expression of which is autoamplified by NFATc1 binding to its own promoter in cooperation with c-Fos (12). This autoamplification mechanism enables a robust induction of *Nfatc1* specific to osteoclasts (13).

During osteoclastogenesis, NFATc1 is constantly activated by calcium signaling, which is dependent on Ig-like receptors such as osteoclast-associated receptor (OSCAR) and triggering receptor expressed in myeloid cells-2 (TREM2) (1, 2). These receptors are associated with the adaptor molecules, DNAX-activating protein 12 (DAP12) and Fc receptor common γ subunit (FcRγ), both of which contain the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in their cytoplasmic domain (14, 15). Spleen tyrosine kinase (Syk) is recruited to the tyrosine-phosphorylated ITAM and makes a complex with the Tec family kinases activated by RANK, which efficiently induces phospholipase Cγ (PLCγ) phosphorylation leading to the activation of calcium signal through inositol triphosphate (16).

NFATc1 functions as the key regulator of osteoclast differentiation (13, 17, 18) by inducing fusogenic genes such as *Tm7sf4* [encoding dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)] (19, 20) and *Atp6v0d2* (20, 21) in addition to a number of genes (such as *Acp5*, *Calcr*, and *Itgb3*) expressed in mature polarized osteoclasts that are involved in the regulation of bone-resorbing activity (1). Recent reports indicate that NFATc1 activity is negatively regulated by other transcription factors such as IFN regulatory factor-8 (IRF-8) and v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (MafB) during osteoclastogenesis (22, 23). The expression of such negative regulators was observed to be repressed through osteoclastogenesis. This repression is consistent with the notion that high NFATc1 activity is a prerequisite for efficient osteoclastogenesis (12), but the mechanism by which the expression of these anti-osteoclastogenic regulators is repressed during RANKL-induced osteoclastogenesis has remained obscure.

To identify the negative transcriptional regulators in osteoclast differentiation, we performed a genome-wide screening of RANKL-inducible transcription factors and found that B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp1) (encoded by *Prdm1*) is crucial for the repression of anti-osteoclastogenic genes such as *Irf8* and *Mafb*. Blimp1 is a transcriptional repressor that plays crucial roles in the differentiation and/or function of

Author contributions: K.N., T.N. and H.T. designed research; K.N., M.H., T.F., S.K., T.K., S.T. and C.K. performed research; K.N. analyzed data; and K.N., T.N. and H.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: GeneChip data are available for download from the Genome Network Platform (http://genomenetwork.nig.ac.jp/).

[1]To whom correspondence should be addressed. E-mail: taka.csi@tmd.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0912779107/DCSupplemental.

various kinds of cells such as macrophages and lymphocytes (24). In particular, Blimp1 is necessary for B cells to undergo terminal differentiation into plasma cells through direct repression of transcription factors such as *Pax5*, *Bcl6*, and *Myc*, which are specifically important in the lineage commitment and proliferation of B cells (24, 25).

Here we show that Blimp1 is induced by RANKL through NFATc1 and functions as a global repressor of negative regulators of NFATc1 during osteoclastogenesis. We also provide genetic evidence that Blimp1 is important for bone homeostasis by its promotion of osteoclastogenesis. These results reveal a previously undescribed aspect of the NFATc1-mediated transcriptional program of osteoclastogenesis, the repression of negative regulators by an NFATc1 target gene.

Results and Discussion

Genome-Wide Screening of Transcription Factors Involved in Osteoclastogenesis. To explore the transcription factors involved in osteoclast differentiation, we performed a genome-wide screening of mRNAs expressed in bone marrow-derived monocyte/macrophage precursor cells (BMMs) stimulated by RANKL. We clustered the data of 1,675 transcription factors (26) using *k*-means algorithm into 22 groups (27). Four clusters of genes exhibited a common expression pattern characterized by a steady increase (by more than 2-fold at each time point after RANKL treatment) (Fig. 1*A*, *Upper*). Clusters I, II, III, and IV contained 72, 54, 48, and 7 transcription factors, respectively (Fig. 1*A*, *Upper*). From these four clusters, we finally selected 13 genes that are highly expressed in mature osteoclasts (an average difference >500 at 3 days) (Fig. 1*A*, *Lower*). Among the 13 genes selected were *Nfatc1*, *Ppargc1b*, and *Fosl2*, which are known to function as transcriptional activators in osteoclast differentiation (13, 28, 29). Blimp1 also has been classified with this group of transcription factors but is known to be a transcriptional repressor required for plasma cell function (24).

We confirmed that both the protein and mRNA expression of *Prdm1* increased markedly during osteoclastogenesis (Fig. 1 *B* and *C*). *Prdm1* was dramatically induced in BMMs stimulated by RANKL in the presence of M-CSF (Fig. 1*C*). It has been reported that *Prdm1* expression increases with the macrophage differentiation induced by phorbol-12-myristate 13-acetate (30), but M-CSF treatment alone did not induce the *Prdm1* expression in this time course. To test whether *Prdm1* induction by RANKL is dependent on NFATc1, we investigated the *Prdm1* expression in the presence of a calcineurin inhibitor, cyclosporin A. As expected, *Prdm1* induction was greatly suppressed by the treatment with cyclosporin A, suggesting that *Prdm1* expression is regulated by NFATc1 (Fig. 1*D*). We performed a computational search on the sequence from 5 kb upstream to 5 kb downstream of the transcription start site of the *Prdm1* gene and found an NFATc1-binding site in a region conserved in the human and mouse sequences (Fig. 1*E*). Indeed, ChIP analysis showed that NFATc1 binds directly to the site in BMMs stimulated with RANKL for 2 days but not in unstimulated BMMs (Fig. 1*E*). These results suggest that *Prdm1* is a direct transcriptional target of NFATc1 during osteoclastogenesis.

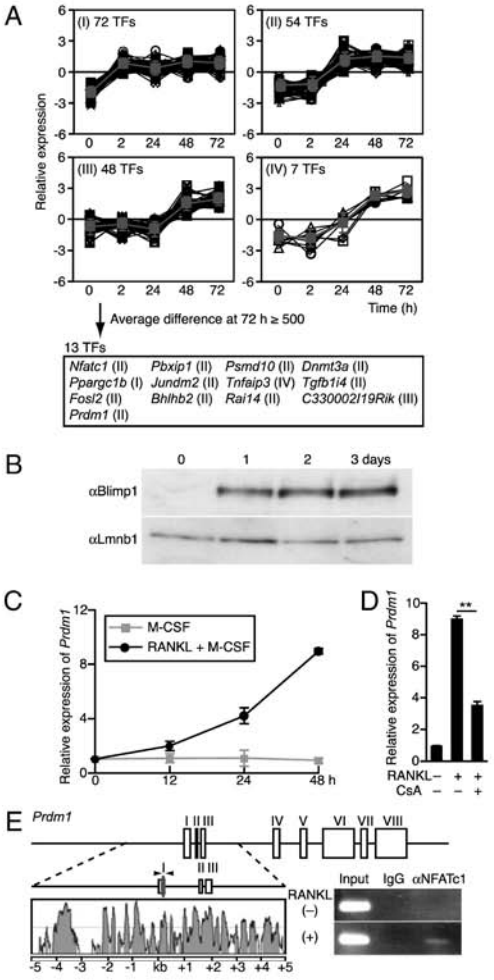


Fig. 1. Increased expression of *Prdm1* during osteoclastogenesis. (*A*) GeneChip analysis of transcription factor expression during osteoclast differentiation. Among the 22 clusters, clusters I to IV were characterized by a steady increase. The gene expression increased mainly in the early (I), intermediate (II), or late (III) phase, or continuously (IV). The log-transformed value of the mRNA expression of each gene is depicted by a black line, and the average of the black lines is shown in red. (*B*) Immunoblot analysis to detect the expression of Blimp1 protein in BMMs stimulated with RANKL in the presence of M-CSF. (*C*) mRNA expression of *Prdm1* in BMMs cultured with or without RANKL. (*D*) Effect of cyclosporin A (CsA; 0.8 μM) on the expression of *Prdm1* in BMMs stimulated with RANKL for 2 days. **, $P < 0.01$. (*E*) Recruitment of NFATc1 to the *Prdm1* promoter region. Schematic view of the NFATc1-binding site in the regulatory region of *Prdm1* (expanded, *Lower Left*). DNA sequences conserved between the mouse and human sequences were identified using VISTA Genome Browser (http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml). Arrowheads indicate the primer set used for ChIP. The sites colored red represent the NFATc1-binding site. ChIP assay and representative results (Lower Right).

Repression Activity of Blimp1 Is Important for Osteoclast Differentiation. Although it has been reported previously that Blimp1 functions as a transcriptional repressor in other cell types (24, 25), transcription factors can function as either a positive or a negative transcriptional regulator in a context-dependent manner (31). To investigate whether Blimp1 acts as a transcriptional activator or repressor during osteoclast differentiation, we constructed Blimp1 variants that constitutively function as a transcriptional activator or repressor (32). We fused either the transactivation domain of herpes simplex virus VP16 or the repressor domain of *Drosophila* engrailed to Blimp1 (AD-Blimp1 and RD-Blimp1, respectively) (Fig. 2*A*) and overexpressed these variants in BMMs using the retrovirus vector (Fig. 2*B*) to test their effects on osteoclast formation. The introduction of RD-Blimp1 into BMMs by retroviral transfer led to increased osteoclast differentiation, whereas the overexpression of AD-Blimp1 inhibited

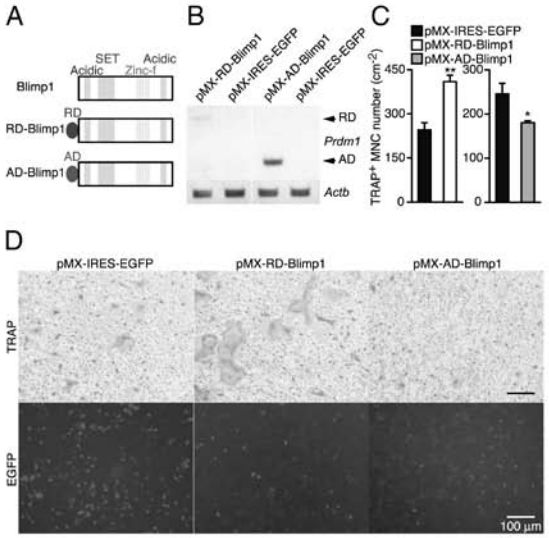


Fig. 2. Blimp1 functions as a transcriptional repressor in the promotion of osteoclast differentiation. (*A*) Schematic view of WT Blimp1, RD-Blimp1, and AD-Blimp1. (*B*) mRNA expression of RD-Blimp1 and AD-Blimp1 after infection with pMX-RD-Blimp1-IRES-EGFP (pMX-RD-Blimp1) and pMX-AD-Blimp1-IRES-EGFP (pMX-AD-Blimp1), respectively. (*C*) Effects of retroviral expression of RD-Blimp1 or AD-Blimp1 on the osteoclastogenesis from BMMs stimulated with RANKL. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (*D*) Osteoclast formation in BMMs transduced with pMX-RD-Blimp1 or pMX-AD-Blimp1.

osteoclast formation (Fig. 2 *C* and *D*). These results suggest that Blimp1 functions mainly as a transcriptional repressor in the promotion of osteoclast differentiation.

High Bone Mass Phenotype Induced by Osteoclast-Specific Deficiency of *Prdm1*. Because *Prdm1*-deficient mice are embryonically lethal (25), to investigate the role of Blimp1 in osteoclasts *in vivo*, we crossed $Prdm1^{flox/-}$ mice (25) with $Ctsk^{Cre/+}$ mice (33) to disrupt the *Prdm1* gene specifically in the osteoclast lineage ($Prdm1^{\Delta OC/-}$). Microcomputed tomography clearly indicated that the bone volume was greatly enhanced in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice at the age of 12 and 32 weeks (Fig. 3*A*). The osteoclast number was significantly reduced in the metaphyseal region, and the bone marrow was abnormally filled with trabecular bone in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice (Fig. 3 *B* and *C*). Bone morphometric analysis indicated an increase in bone volume associated with a reduced osteoclast number and a decrease in the indicators of osteoclastic bone resorption (Fig. 3*C*). Osteoblastic parameters were slightly decreased in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice (Fig. 3*C*), possibly because of an osteoclast–osteoblast coupling mechanism. These results collectively suggest that the increase in bone mass in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice was caused by impaired osteoclastic bone resorption owing to a defect in osteoclast differentiation. Having normal tooth eruption, the $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice exhibit an incomplete osteopetrotic phenotype, but the results nevertheless suggest that Blimp1 plays a critically important role in osteoclast differentiation.

Impaired Osteoclastogenesis in *Prdm1*-Deficient Cells. *In vitro* osteoclast differentiation was evaluated by counting the multinucleated cells (MNCs) positive for the osteoclast marker tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) after stimulation of BMMs with RANKL in the presence of M-CSF. The number of TRAP-positive MNCs was markedly reduced in the $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells compared with the $Prdm1^{flox/flox}$ cells (Fig. 4*A*). Quantitative

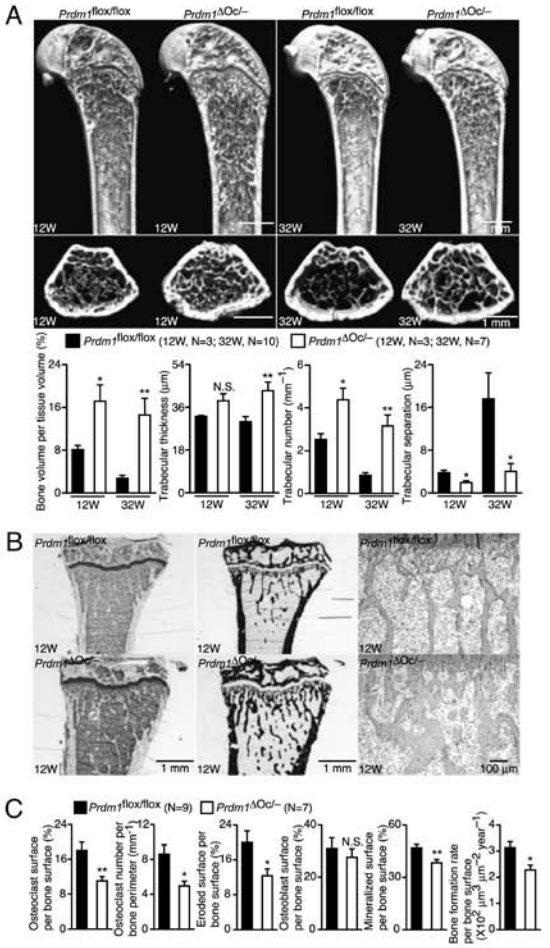


Fig. 3. $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice exhibit a high bone mass phenotype. (*A*) Microcomputed tomography (μCT) analysis of the femurs of $Prdm1^{flox/flox}$ and $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice (*Upper photograph*: longitudinal view; *Lower photograph*: axial view of the metaphyseal region). The parameters are based on the μCT analysis of the metaphyseal region. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant. (*B*) Histological analysis of the proximal tibia of $Prdm1^{flox/flox}$ and $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice (*Left*, toluidine blue staining, purple marks cartilage; *Center*, von Kossa staining, black indicates mineralized bone; *Right*, TRAP staining, red marks osteoclasts). (*C*) Parameters for osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in the bone morphometric analysis of $Prdm1^{flox/flox}$ and $Prdm1^{\Delta OC/-}$ mice at the age of 32 weeks. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., not significant.

genomic PCR analysis indicates that the *Prdm1* gene was excised efficiently 2 days after RANKL treatment (Fig. 4*B*). Consistently, the protein and mRNA expression of *Prdm1* was diminished in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells 2 days after RANKL treatment (Fig. 4 *C* and *D*). These results indicate that the *Prdm1* gene was disrupted in the middle stage of osteoclast differentiation (24–48 h after RANKL stimulation in the 72-h period of differentiation). There was no significant difference in the number of $CD11b^+$ cells in the BMMs (Fig. 4*E*), suggesting that $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells contain a normal number of osteoclast precursor cells. RANKL-stimulated induction of the osteoclast-specific genes *Nfatc1*, *Acp5*, and *Ctsk* was severely reduced in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells (Fig. 4*D*).

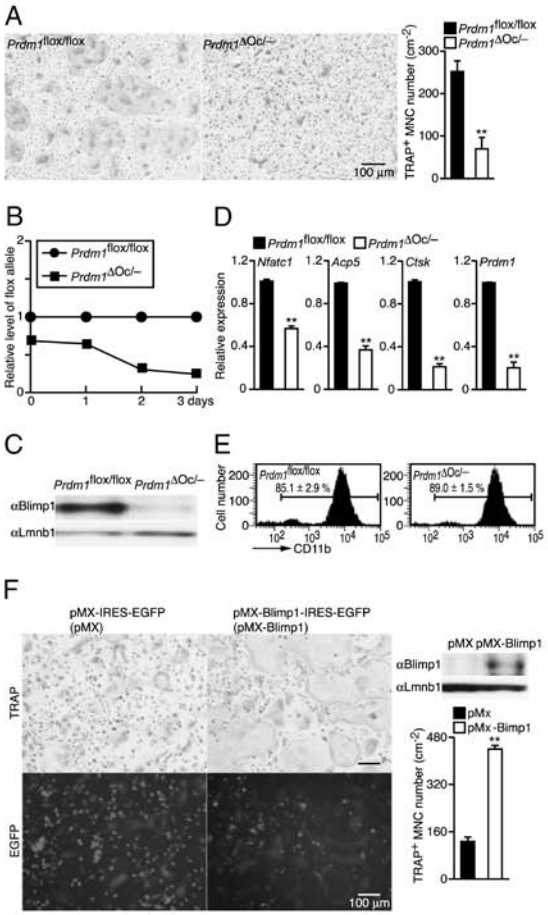


Fig. 4. Impaired osteoclastogenesis in *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ cells. (*A*) Osteoclast differentiation in *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated with RANKL. **, $P < 0.01$. (*B*) Quantitative genomic PCR analysis to detect the recombination efficiency in *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated by RANKL. (*C*) Protein expression of Blimp1 in *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated with RANKL. (*D*) Real-time RT-PCR analysis of mRNAs for *Nfatc1*, *Acp5*, *Ctsk*, and *Prdm1* in *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated with RANKL. **, $P < 0.01$. (*E*) Expression of CD11b in the *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs (flow cytometry). (*F*) Effect of retroviral expression of HA-tagged Blimp1 on osteoclastogenesis on *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated with RANKL. **, $P < 0.01$.

To evaluate the effect of Blimp1 overexpression, we constructed a retroviral vector carrying the HA-tagged Blimp1 gene. We transduced the *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ cells with the viral vector and evaluated the TRAP-positive MNC formation. Impaired osteoclast formation in *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ cells was significantly restored by the overexpression of Blimp1 (Fig. 4*F*), demonstrating that Blimp1 has an ability to promote osteoclastogenesis.

Blimp1 Represses Expression of the *Irf8* and *Mafb* Genes in Osteoclasts. What are the target(s) of Blimp1-mediated repression in the promotion of osteoclastogenesis? To identify the putative Blimp1-regulated genes, we performed a genome-wide screening of mRNAs during osteoclastogenesis using WT and *Prdm1*$^{\Delta Oc/\Delta Oc}$ BMMs (Fig. 5*A*, *Left* and *Center*). We first

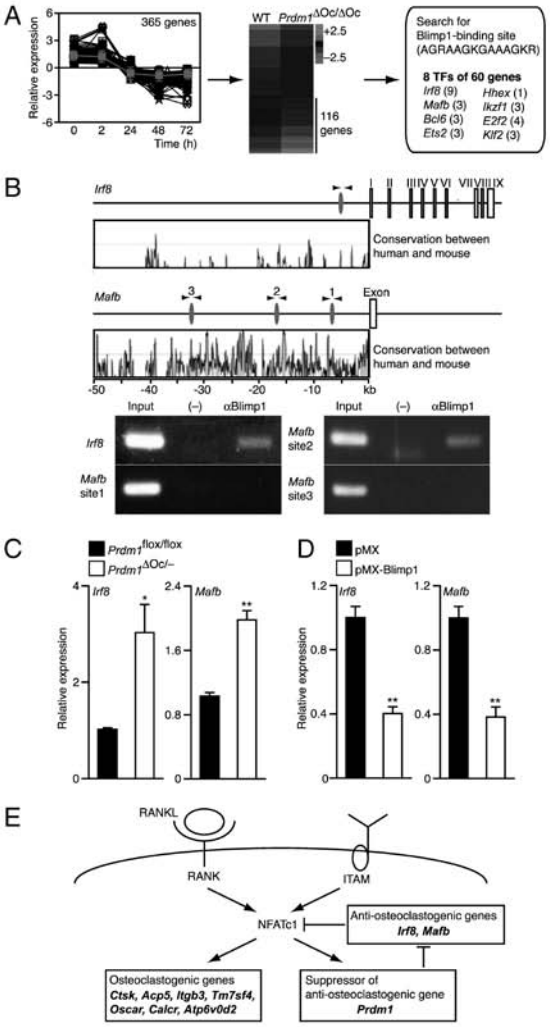


Fig. 5. Blimp1 regulates osteoclast differentiation through the down-regulation of multiple negative regulators. (*A*) Comprehensive search for the Blimp1-regulated genes during osteoclastogenesis. The expression of 365 genes decreased more than 2-fold every 24 h during osteoclast differentiation (*Left*). Of these genes, we identified the expression of 116 genes to be sufficiently recovered (>120%) in *Prdm1*-deficient cells (*Center*). *Prdm1*-deficient cells were generated by retroviral introduction of *Cre* recombinase into *Prdm1*$^{flox/flox}$ BMMs. A computational search for the Blimp1-binding site in the region conserved between the human and mouse sequences within 500 kb upstream of the transcriptional start site of 116 genes using the ECR Browser (http://ecrbrowser.dcode.org/) showed that 60 genes, including eight transcription factors, have a putative Blimp1-binding site (*Right*). The number in parentheses indicates the number of Blimp1-binding sites. (*B*) Recruitment of Blimp1 to the *Irf8* and *Mafb* regulatory regions. Schematic view of the Blimp1-binding site in the regulatory region of *Irf8* and *Mafb* (*Upper*). BMMs cultured with RANKL and M-CSF for 2 days were used. Arrowheads indicate the primer sets used for ChIP. Sites colored red represent Blimp1-binding sites. ChIP assay and representative results (*Lower*). (*C*) Real-time RT-PCR analysis of *Irf8* and *Mafb* mRNAs in *Prdm1*$^{flox/flox}$ and *Prdm1*$^{\Delta Oc/-}$ BMMs stimulated with RANKL for 2 days. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (*D*) Real-time RT-PCR analysis of *Irf8* and *Mafb* mRNAs in HA-tagged Blimp1-expressed BMMs stimulated with RANKL for 2 days. **, $P < 0.01$. (*E*) A model of Blimp1-mediated regulation of osteoclast differ-

selected genes the expression of which was decreased more than 2-fold every 24 h during osteoclast differentiation in WT cells (Fig. 5*A*, *Left*). We further selected genes in which the reduced expression was clearly normalized by the *Prdm1* deficiency (Fig. 5*A*, *Center*). We computationally searched the 5′-flanking region of these genes for the Blimp1-binding site to identify 60 genes having a putative Blimp1-binding site (Fig. 5*A*, *Right*). The eight transcription factors were included in these genes (Fig. 5*A*, *Right*). In this study, we focused on *Irf8* and *Mafb* because these genes are reported to be negative regulators of osteoclast differentiation (22, 23). We identified nine Blimp1-binding sites in the 5′-flanking sequence of *Irf8* and three Blimp1-binding sites in the 5′-flanking sequence of *Mafb*. A cluster of Blimp1-binding sites is located ≈5.5 kb upstream from the transcription start site of the *Irf8* gene. Indeed, ChIP analysis showed that Blimp1 bound to the sequence containing the cluster in the 5′-flanking sequence of *Irf8* (Fig. 5*B*). Blimp1 also bound to one of the three Blimp1-binding sites located ≈16 kb upstream from the transcription start site of the *Mafb* gene (Fig. 5*B*). These results suggest that Blimp1 represses the expression of *Irf8* and *Mafb* by directly binding to their regulatory regions. Consistent with this notion, the expression of *Irf8* and *Mafb* was increased in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells (Fig. 5*C*), and the forced expression of Blimp1 decreased the expression of *Irf8* and *Mafb* significantly (Fig. 5*D*). These results suggest that the *Irf8* and *Mafb* genes are among the direct repressive targets of Blimp1 during osteoclastogenesis.

To investigate whether Blimp1 promotes osteoclastogenesis by the down-regulation of *Irf8* and *Mafb*, we generated retroviral vectors carrying *Irf8* or *Mafb* shRNA. However, the introduction of *Irf8* and/or *Mafb* shRNAs into $Prdm1^{\Delta OC/-}$ BMMs had only a minimal rescue effect (Fig. S1), suggesting that Blimp1 exerts its function through the regulation of multiple genes, including *Irf8* and *Mafb*. *Pax5* expression is known to be repressed by Blimp1 in plasma cells (24), and $Pax5^{-/-}$ mice exhibit an osteopenic phenotype because of an increased number of osteoclasts (34), suggesting that *Pax5* is a candidate target of Blimp1 in osteoclasts. However, the contribution of *Pax5* to the Blimp1-mediated regulation of osteoclastogenesis may be minimal, because the expression of *Pax5* is negligible during osteoclastogenesis based on the GeneChip data. *Bcl6* also is repressed by Blimp1, and Blimp1 is negatively regulated by BCL6 in plasma cells (24). Although the shRNA-mediated knockdown of *Bcl6* did not normalize the decreased osteoclastogenesis in $Prdm1^{\Delta OC/-}$ cells (Fig. S1), we cannot rule out the possibility that *Bcl6* may also contribute to the Blimp1-mediated regulation of osteoclastogenesis in cooperation with *Irf8* and *Mafb*.

Cell lineage commitment is strictly regulated to maintain the homeostasis of the biological systems of the multicellular organisms. To this end, cell differentiation signals usually stimulate the negative-feedback regulatory pathways to correct any excess. During osteoclastogenesis, however, NFATc1 activity and expression are maintained at an extremely high level compared with other cell types (12). Therefore, the expression of molecules that inhibit NFATc1 activity needs to be repressed. Blimp1, which is induced by the RANKL–NFATc1 axis, represents the repressor of anti-osteoclastogenic genes (Fig. 5*E*). It is likely that NFATc1 functions as the crucial regulator of osteoclastogenesis both by inducing osteoclastogenic genes and by acting as a repressor of negative regulatory genes.

entiation. During osteoclastogenesis, the critical transcription factor NFATc1 is induced by RANKL and ITAM signals. NFATc1 is known to regulate various osteoclastogenic genes. Anti-osteoclastogenic transcription factors such as IRF-8 and MafB inhibit osteoclast differentiation mainly through the suppression of NFATc1 activity. Blimp1, which also is induced by the RANKL-NFATc1 axis, represents the repressor of anti-osteoclastogenic genes.

Accumulating evidence indicates that immune and bone cells share important regulatory molecules, including receptors, signaling molecules, enzymes, and transcription factors. These findings have shed light on the new interdisciplinary research field of osteoimmunology (1, 2). In particular, an unexpectedly high number of factors that regulate osteoclast differentiation were identified originally in immune cells (1, 2). Blimp1 also has been well characterized as a repressor of genes involved in early B-cell differentiation that enable B cells to undergo terminal differentiation into plasma cells (24). The function of Blimp1 in osteoclasts is analogous to its role in plasma cells, in that Blimp1 represses the genes involved in macrophage development such as *Irf8* and *Mafb* (35, 36), thus converting monocyte/macrophage precursor cells into terminally differentiated osteoclasts.

Because Blimp1 acts as a global repressor of multiple anti-osteoclastogenic genes, it is possible that inhibitors of Blimp1 function may serve as antiresorptive agents by inducing various factors affecting osteoclastogenesis. In depth understanding of the gene regulatory programs mediated by Blimp1 should help provide a molecular basis for future therapeutic strategies in bone disease.

Materials and Methods

Mice and Analysis of Bone Phenotype. $Prdm1^{flox/-}$ and $Ctsk^{Cre/+}$ mice were generated previously and have been described elsewhere (25, 33). Both strains were backcrossed with C57/BL6 mice for more than six generations. All mice were born and maintained under specific-pathogen–free conditions. All animal experiments were performed with the approval of the Animal Study Committee of Tokyo Medical and Dental University and conformed to relevant guidelines and laws. CT scanning was performed using a ScanXmate-A100S Scanner (Comscantechno). Three-dimensional microstructural image data were reconstructed and structural indices were calculated using TRI/3D-BON software (RATOC Systems). Bone morphometric analysis was performed as described (14, 16).

Cell Cultures. The method for *in vitro* osteoclast differentiation was described previously (13, 14, 16). In brief, bone marrow cells cultured with 10 ng mL^{-1} M-CSF (R&D Systems) for 2 days were used as BMMs, which were further cultured with 50 ng mL^{-1} RANKL (Peprotech) in the presence of M-CSF (10 ng mL^{-1}) for 3 days.

Flow Cytometric Analysis. Two days after stimulation with RANKL, cells were stained with the PE-conjugated anti-CD11b antibody (BD Biosciences) or control rat IgG. Stained cells were analyzed with a flow cytometer (FACSCanto II; BD Biosciences).

Quantitative PCR Analysis. Total RNA and cDNA were prepared by ISOGEN (Wako Chemicals) and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was obtained by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantitative PCR analysis was performed with a LightCycler (Roche) using SYBR Green (Toyobo). The primer sequences used in real-time RT-PCR analysis were *Actb*, 5′-CTTCTACAATGAGCTGCGTG-3′ and 5′-TCATGAGGTAGTCTGTCAGG-3′; *Acp5*, 5′-GGGAAATGGCCAATGCCAAAGAGA-3′ and 5′-TCGCACAGAGGGATCCATGAAGTT-3′; *Ctsk*, 5′-AGGCAGCTAAATGCAGAGGGTACA-3′ and 5′-ATGCCGCAGGCGTTGTTCTTATTC-3′; *Nfatc1*, 5′-GGTAACTCTGTCTTTCTAACCTTAAGCTC-3′ and 5′-GTGATGACCCCAGCATGCACCAGTCACAG-3′; *Prdm1*, 5′-TGCTTATCCCAGCACCCC-3′ and 5′-CTTCAGGTTGGAGAGCTGACC-3′; *Mafb*, 5′-AACGGTAGTGTGGAGGAC-3′ and 5′-TCACAGAAAGAACTCAGGA-3′; *Irf8*, 5′-AAGGTCACCGTGGTCCTTAG-3′ and 5′-GGAAAGCCTTACCTGCTGAC-3′; *engrailed*, 5′-TCGAATTCAAGGTATGGCCCTGGAG-3′ and 5′-GGGAATTCGCTCGAGAGGGATCCCAGAGCA-3′; *VP16*, 5′-GGGAATTCGGATCCCATCGATATGACCGGA-3′ and 5′-GGGAATTCTTCTAGAGGCTCGAGCCCACCG-3′.

The primer sequences used in quantitative genomic PCR analysis were *Prdm1* third exon, 5′-gctgcccccaagtctagc-3′ and 5′-cttcaaactcggcctctgtcc-3′; *Prdm1* sixth intron/seventh exon, 5′-aagaggcttgcatctgcatt-3′ and 5′-tgtggcttctctcctgtgtg-3′.

GeneChip Analysis. GeneChip analysis was performed as described (13, 14, 16). Briefly, the total RNAs were used for cDNA synthesis by reverse transcription followed by synthesis of biotinylated cRNA through *in vitro* transcription. After cRNA fragmentation, hybridization with mouse genome 430 2.0 array

(Affymetrix) was performed. The main part of the dataset has been deposited and can be obtained from the Genome Network Platform (http://genomenetwork.nig.ac.jp/). *K*-means clustering analysis of gene expression on their Euclidean distance was performed with the Cluster 3.0 (27).

ChIP Assay. ChIP assay was performed by the ChIP Assay Kit (Upstate) according to the manufacturer's instructions with minor modifications. In brief, BMMs stimulated with RANKL for 2 days were fixed with formaldehyde. After quenching with glycine, cells were lysed and sonicated. Sonicated chromatin was incubated with either rabbit anti-Blimp1 polyclonal antibody serum (37) or anti-NFATc1 antibody (Santa Cruz). We used rabbit serum or rabbit IgG (Santa Cruz) as a control. Immunoprecipitation was performed using protein A Dynabeads (Invitrogen). After extensive washing, protein-DNA crosslinks were reversed, and the precipitated DNA was treated with proteinase K before phenol chloroform extraction and ethanol precipitation. The primer sequences were *Prdm1*, 5′-AAACGTGTGGGTACGACCTT-3′ and 5′-AGCGCTGGTTTCTACTGAGG-3′; *Irf8*, 5′-TCCCTCCCTCCTTCTCCTTA-3′ and 5′-AAGCCCTGAGTGCACAGACT-3′; *Mafb* site 1, 5′-CAGAGGCAAAGGAACAGCTC-3′ and 5′-GCACCCTGGACTGTAACCAT-3′; *Mafb* site 2, 5′-CCTTGCCTTGTGTCCTGAAG-3′ and 5′-GAGGGGGTATGAAGGAGAGG-3′; *Mafb* site 3, 5′-GCGTCAGCTTCCCAGTAGAA-3′ and 5′-CGACTGGGAGCGTAGTTAGC-3′.

Plasmid Construction and Retroviral Gene Transfer. A retroviral vector, pMX-HA-Blimp1, was constructed by inserting DNA fragments encoding HA and Blimp1 into a retroviral expression vector, pMx-IRES-GFP (38). The retroviral vectors pMX-RD-HA-Blimp1 and pMX-AD-HA-Blimp1 were constructed by inserting DNA fragments encoding engrailed or VP16 (32) into pMX-HA-Blimp1. A retroviral vector, pMX-Cre, has been described elsewhere (39). Retroviral packaging was performed by transfecting the plasmids into Plat-E cells using FuGENE 6 (Roche) as described (38). Retroviral particles were used for infection after concentration by centrifugation at 8,000 × *g* for 16 h. After 12-h inoculation, BMMs were stimulated with RANKL.

Knockdown Analysis. We used the RNAi system (BD Biosciences) and constructed the *Irf8* and *Mafb* RNAi-Ready pSIREN vector according to the manufacturer's protocol. Briefly, annealed oligonucleotides (*Irf8* RNAi sense: gatcCCGCTGAAATGGAGTTAGTTTCTCGAGAAACTAACTCCATTTCAGCGGTTTTTG; *Irf8* RNAi antisense: aattCAAAAACCGCTGAAATGGAGTTAGTTTCTCGAGAAACTAACTCCATTTCAGCGG; *Mafb* RNAi sense: gatcGCTGAGTCTTTGTTTGGGTTTCTCGAGAAACCCAAACAAAGACTCAGCTTTTTG; *Mafb* RNAi antisense: aattCAAAAAGCTGAGTCTTTGTTTGGGTTTCTCGAGAAACCCAAACAAAGACTCAGC; *Bcl6* RNAi sense: gatcGCTGTCAAAGAGAAGGCTTTACTCGAGTAAAGCCTTCTCTTTGACAGCTTTTTG; *Bcl6* RNAi antisense: aattCAAAAAGCTGTCAAAGAGAAGGCTTTACTCGAGTAAAGCCTTCTCTTTGACAGC) were ligated into a pSIREN vector. After 12-h inoculation with retroviruses carrying the pSIREN vector, BMMs were stimulated with RANKL followed by selection with 2.5 μg mL^{-1} puromycin (Invitrogen).

Immunoblot Analysis. Immunoblot analysis was performed using antibodies against Blimp1 (NOVUS), HA (Abgent), and Laminb1 (Santa Cruz) as previously described (40). Anti-Laminb1 antibody was used as an internal control.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using the unpaired two-tailed Student's *t* test. All data are expressed as the mean ± SEM.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank T. Ando, Y. Kunisawa, M. Shinohara, M. Oh-hora, A. Izumi, and A. Hirota for discussion and technical assistance. We also thank M. Kobayashi for the gift of pCS2-En and pCS2-VP16. This work was supported in part by a grant to the Exploratory Research for Advanced Technology Takayanagi Osteonetwork Project from Japan Science and Technology Agency; Grants-in-Aid for Creative Scientific Research and Young Scientist (A and Start-up) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS); a Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research from the JSPS; grants for the Genome Network Project and Global Center of Excellence Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; and by grants from the Tokyo Biochemical Research Foundation, the Life Science Foundation of Japan, the Yokoyama Foundation for Clinical Pharmacology, and the Takeda Science Foundation.

1. Takayanagi H (2007) Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7:292–304.
2. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008) Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 29:403–440.
3. Goldring SR, Gravallese EM (2000) Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: Diagnosis and therapeutic implications. *Arthritis Res* 2:33–37.
4. Kong YY, et al. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304–309.
5. Takayanagi H, et al. (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-γ. *Nature* 408:600–605.
6. Rodan GA, Martin TJ (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508–1514.
7. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM (2002) RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 20:795–823.
8. Xing L, Schwarz EM, Boyce BF (2005) Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol Rev* 208:19–29.
9. Ross FP, Teitelbaum SL (2005) α/β3 and macrophage colony-stimulating factor: Partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 208:88–105.
10. Kobayashi N, et al. (2001) Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J* 20:1271–1280.
11. Wagner EF, Eferl R (2005) Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 208:126–140.
12. Asagiri M, et al. (2005) Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202:1261–1269.
13. Takayanagi H, et al. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3:889–901.
14. Koga T, et al. (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428:758–763.
15. Mócsai A, et al. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ-chain (FcRγ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6158–6163.
16. Shinohara M, et al. (2008) Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell* 132:794–806.
17. Winslow MM, et al. (2006) Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell* 10:771–782.
18. Aliprantis AO, et al. (2008) NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest* 118:3775–3789.
19. Yagi M, et al. (2007) Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res* 22:992–1001.
20. Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y, Kim N (2008) NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol* 22:176–185.
21. Lee SH, et al. (2006) v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med* 12:1403–1409.
22. Zhao B, et al. (2009) Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med* 15:1066–1071.
23. Kim K, et al. (2007) MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 109:3253–3259.
24. Martins G, Calame K (2008) Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 26:133–169.
25. Shapiro-Shelef M, et al. (2003) Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19:607–620.
26. Kanamori M, et al. (2004) A genome-wide and nonredundant mouse transcription factor database. *Biochem Biophys Res Commun* 322:787–793.
27. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14863–14868.
28. Bozec A, et al. (2008) Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature* 454:221–225.
29. Ishii KA, et al. (2009) Coordination of PGC-1β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med* 15:259–266.
30. Chang DH, Angelin-Duclos C, Calame K (2000) BLIMP-1: Trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nat Immunol* 1:169–176.
31. Alvarez M, Rhodes SJ, Bidwell JP (2003) Context-dependent transcription: All politics is local. *Gene* 313:43–57.
32. Kessler DS (1997) Siamois is required for formation of Spemann's organizer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13017–13022.
33. Nakamura T, et al. (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130:811–823.
34. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401:556–562.
35. Tamura T, Nagamura-Inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T, Ozato K (2000) ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 13:155–165.
36. Moriguchi T, et al. (2006) MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 26:5715–5727.
37. Tunyaplin C, et al. (2004) Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173:1158–1165.
38. Morita S, Kojima T, Kitamura T (2000) Plat-E: An efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7:1063–1066.
39. Sato S, et al. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:1087–1095.
40. Nishikawa K, et al. (2003) Self-association of Gata1 enhances transcriptional activity in vivo in zebra fish embryos. *Mol Cell Biol* 23:8295–8305.

MEMO

分子細胞機能学

森田 育男

医歯学総合研究科・顎顔面頸部機能再建学系専攻
分子細胞機能学・教授

1）研究の課題名

1. 歯周組織の再建　Periodontal tissue regeneration

拠点内の共同研究（分子細胞機能学分野、歯周病学分野、生体材料工学研究所有機化学分野）

21世紀型先端医療は再生医療とゲノム医療と言われている。その中でも再生医療は自身の細胞を用いることにより副作用が少ない医療として注目を浴びている。申請者は印刷技術を用いた再生医療法を開発し、動物における血行再建、骨再生を報告してきた。本研究においては、口腔疾患の中で重要な疾患であり、再生医療の対象である歯周病に注目し、従来の歯周病治療の問題点である治療後の歯周組織欠損で生じる審美的障害を解決するためのモデル構築と、そのモデルを用いた新規再生医療法の開発を行う。すなわち、歯周病治療後の歯周組織欠損の類似モデルとして、下掘れ式の骨露出を伴う軟組織欠損を生じる褥瘡モデルを考案し、我々が開発した再生医療技術とナノゲルを用いて良好な血行回復＋増殖因子徐放効果により迅速な組織再生研究を行っている。

2. 脂質メディエーターと骨代謝

Lipid mediator and bone metabolism

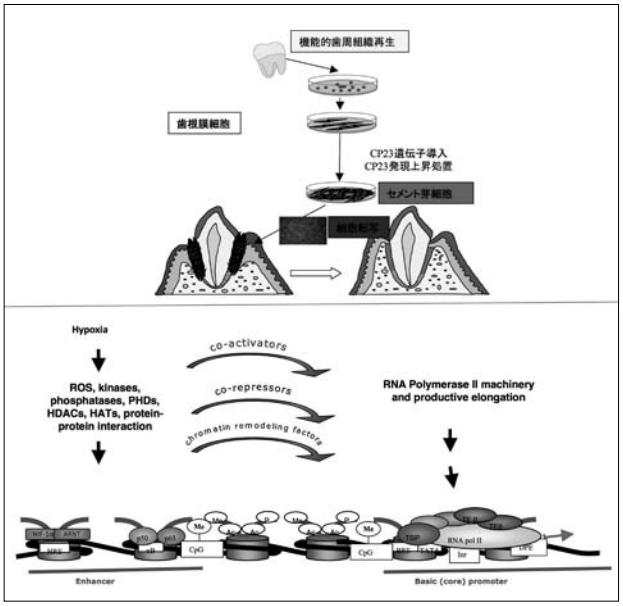
骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によるリモデリングによって保たれている。リモデリングは精巧に調節されており、このバランスが崩れると、骨粗鬆症や癌の骨転移、炎症などにつながる原因となることが知られている。多価不飽和脂肪酸（PUFAs）、特にω3系PUFAであるドコサヘキサエン酸（DHA）、エイコサペンタエン酸（EPA）は健康食品、サプリメントとして使用されている。マウス、ラットでの骨塩量の増加、カルシウム増加など骨に対する作用が報告されている他、ヒトではω6系PUFAとω3系PUFAの摂取量についてω6系PUFAの比率が高いほど骨密度が低い傾向にあること、ω3系PUFA摂取と骨密度に相関があることが報告されている。本研究室ではマウスBMMsを用い、EPAは破骨細胞形成を促進するが、DHAは強く抑制することを報告した)。また、DHAの抑制作用はリポキシゲナーゼ（LOX）阻害剤であるノルジヒドログアイレイック酸（NDGA）によって消失したこと、さらにDHAのLOX代謝産物であるリゾルビンD1（7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoicacid:RvD1）を加えることによってNDGAで消失したDHAによる破骨細胞形成抑制作用が回復したことから、DHAのLOX代謝産物であるRvD1[6] が破骨細胞形成を抑制しているのではないかと考えている。さらに、RvD1の受容体の同定を行っている。

・炎症とエピゲネティクス

The involvement of DNA and histone methylation in inflammation

炎症が起こると、酸素欠乏や炎症性サイトカインの産生増加といった微小環境の変化により様々な遺伝子発現が変化する。遺伝子の転写調節には活性化と抑制があり、炎症や腫瘍浸潤に関連した様々な遺伝子の活性化が低酸素下で誘導されることは多く知られているが、転写抑制に関する報告は数少ない。そこで本研究では、低酸素下におけるMCP-1発現抑制機序へのDNA及びヒストンメチル化の関与を明らかにする目的で各種検討を行った。その結果、低酸素下におけるMCP-1発現抑制にDNAメチル化及びH3K9ジメチル化が関与していることが明らかとなった。本研究はDNAメチル化がエピジェネティックな遺伝子サイレンシングだけではなく一過性の転写抑制にも関与しているという新しい概念を支持するものである。

2)



3) 研究内容についての英文要約

Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice

Bone regeneration therapy based on the delivery of osteogenic factors and/or cells has received a lot of attention in recent years since the discovery of pluripotent stem cells. We reported previously that the implantation of capillary networks engineered ex vivo by the use of cell-printing technology could improve blood perfusion. Here, we developed a new substrate prepared by coating glass with polyethylene glycol (PEG) to create a non-adhesive surface and subsequent photo-lithography to finely tune the adhesive property for efficient cell transfer. We examined the cell-transfer efficiency onto amniotic membrane and bone regenerative efficiency in murine calvarial bone defect. Cell transfer of KUSA-A1 cells (murine osteoblasts) to amniotic membrane was performed for 1 h using the substrates. Cell transfer using the substrate facilitated cell engraftment onto the amniotic membrane compared to that by direct cell inoculation. KUSA-A1 cells transferred onto the amniotic membrane were applied to critical-sized calvarial bone defects in mice. Micro-computed tomography (micro-CT) analysis showed rapid and effective bone formation by the cell-equipped amniotic membrane. These results indicate that the cell-printing and transfer technology used to create the cell-equipped amniotic membrane was beneficial for the cell delivery system. Our findings support the development of a biologically stable and effective bone regeneration therapy.

Transcriptome remodeling in hypoxic inflammation.

Hypoxia is an integral component of the inflamed tissue microenvironment. Today, the influence of hypoxia on the natural evolution of inflammatory responses is widely accepted; however, many molecular and cellular mechanisms mediating this relationship remain to be clarified. Hypoxic stress affects several independent transcriptional regulators related to inflammation in which HIF-1 and NF-kappaB play central roles. Transcription factors interact with both HATs and HDACs, which are components of large multiprotein co-regulatory complexes. This review summarizes the current knowledge on hypoxia-responsive transcriptional pathways in inflammation and their importance in the etiology of chronic inflammatory diseases, with the primary focus on transcriptional co-regulators and histone modifications in defining gene-specific transcriptional responses in hypoxia, and on the recent progress in the understanding of hypoxia-mediated epigenetic reprogramming. Furthermore, this review discusses the molecular cross-talk between glucocorticoid anti-inflammatory pathways and hypoxia.

The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro

Bone homeostasis is maintained by active remodeling through the balance between resorption (by osteoclasts) and synthesis (by osteoblasts). In this study, we examined the effects of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their metabolites on sRANKL-induced differentiation of bone marrow-derived macrophages (BMMs) into osteoclasts in vitro. Docosahexaenoic acid (DHA) strongly inhibited osteoclastogenesis; however, dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA), arachidonic acid (AA) and eicosapentaenoic acid (EPA) enhanced it. The enhancement effect of PUFAs on osteoclastogenesis was mediated predominantly by cyclooxygenase (COX) products, because the effect was inhibited by a COX inhibitor. It was also found that COX products of PUFAs, prostaglandin E (1), E (2), and E (3), clearly increased in osteoclastogenesis. The inhibitory effect of DHA on osteoclastogenesis was reversed by treatment with a lipoxygenase (LOX) inhibitor. Furthermore, resolvin D1, a LOX product of DHA, significantly inhibited osteoclastogenesis. Quantitative analysis of specific mRNA levels revealed that DHA-mediated attenuation of osteoclastogenesis might be due to a decrease in DC-STAMP expression. These results suggested that the effect of DHA on osteoclastogenesis is, at least in part, mediated by lipoxygenase products. This study showed a distinct mechanism of the effect of PUFAs on osteoclastogenesis and will provide evidence for therapeutic treatment with DHA in osteoporotic patients.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

研究担当理事として、研究支援センターを設置するなど、研究の円滑な支援を行った。

D（人材育成）

国際PIシャペロンの教育のために、自分の研究の知的財産がいかなるものであるかを理解させるためのセミナーを行った。

E（国際化）

台湾の歯科医学学会にて、本G-COEの紹介及び実績の紹介を行った。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

若手育成委員会の委員長として、優秀なSS学生の採用のための条件を制定し、その条件を公表した。トロント、UCSFなどの大学で行われたリサーチデイに優秀な学生を選抜、派遣することにより若手育成を行った。

6）英文原著論文

1. ◎Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata E, Shibata T, Morita I, Miyazono K, Saitoh M. TGF-b regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. EMBO J in press
2. ◎Tsugawa J, Komaki M, Yoshida T, Nakahama K, Amagasa T, Morita I., Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice. J Tissue Eng Regen Med in press
3. ◎Kamiya K, Tsumoto K, Arakawa S, Shimizu S, Morita I, Yoshimura T, Akiyoshi K., Preparation of connexin43-integrated giant liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. Biotechnology and bioengineering 107（5）:836-43, 2010
4. ◎Moritani, Y, Nomura S, Morita I, Akiyoshi K.,Direct integration of cell-free synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation. FEBS Journal FEBS J.277（16）: 3343-3352, 2010
5. Yoshida T, Komaki M, Hattori H, Negishi J, Kishida A, Morita I, Abe M., Therapeutic Angiogenesis by Implantation of a Capillary Structure Constituted of Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30（7）:1300-1306, 2010
6. Yoshida T, Sato Y, Morita I, Abe M. Pigpen, a nuclear coiled body component protein, is involved in angiogenesis. Cancer Sci. 101（5）:1170-1176, 2010
7. Shimada N, Ohno-Matsui K, Iseki S, Koike M, Uchiyama Y, Wang J, Yoshida T, Sato T, Peters C, Mochizuki M, Morita I. Cathepsin L in bone marrow-derived cells is required for retinal and choroidal neovascularization. Amer. J Pathol. 176（5）:2571-2580, 2010
8. ◎Yuana J, Akiyama M, Nakahama K, Sato T, Uematsu H, Morita I, The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. Prostaglandins and Other Lipid Mediators 92, 85–90, 2010
9. ◎Nakalekha C, Yokoyama C, Miura Y, Alles N, Aoki K, Ohya K, Morita I. Increased Bone Mass in Adult Prostacyclin Deficient Mice. J. Endocrinology, 204（2）:125-133, 2010（IF 2.791）
10. ◎Akahori T, Kobayashi A, Komaki M, Hattori H, Kahahama K, Ichinose S, Abe M, Takeda S, Morita I. Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hindlimb ischemia in mice, Tissue Engendering, Part A. 16（3）:953-959, 2010（IF 4.699）

7）総説ならびに著書

◎Safronova O, Morita I Transcriptome Remodeling in Hypoxic Inflammation. J Dent Res.（Review） 89（5）:430-444, 2010

8）平成22年度までの自己評価

研究担当理事として、大学院改革、研究支援などに力を注いでいる。その結果、G-COEに対する取り組みが難しくなってきている。しかし、若手育成委員長として、大学院生、シャペロンの教育、研究支援は積極的に行っている。

9）学会発表（英文）

1. Safronova O, Aoi Y, and Morita I. Role of HDACs in hypoxic repression of NF-kB-dependent genes: deacetylation of histones and non-histone protein. Poster Session 3, “Hypoxia: Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathways”, 2010 Keystone Symposia Meeting , KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, January 19-24, 2010, Keystone, Colorado, USA

2. ◎ Ikuo Morita: Nanotechnology in Tissue Engineering, December 6, 2010, BIT Life Sciences’ 3rd Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2010, Shanghai, China, December 5-7, 2010

3. Ikuo Morita A new technology for tissue regeneration by using cell printing and transfer. 21st Century COE Program.The 33rd Annual Scientific Meeting of Association for Dental Sciences of the Republic of China. Taipei, November 26-28, 2010

10）学会発表（和文）

1. Praween Wayakanon, Rajib Bhattacharjee, Makato Kaneda, Ken-ichi Nakahama and Ikuo Morita. The Role of C-terminus of Cx43 in Gap Junction Plaque Internalization. 第20回細胞間ジャンクション研究会. 東京.2010年1月23日
2. 青井陽子、サフロノヴァ・オルガ、中浜健一、森田育男.低酸素下におけるMCP-1産生変動機序-メチル化の関与.一般ポスター.第31回日本炎症・再生医学会.東京.2010年8月5～6日
3. 須藤乃里子、吉田朋子、星野優子、小牧基浩、中浜健一、久保田俊郎、安部まゆみ、森田育男.生体外で作成した血管網を用いた血管再生療法.ワークショップ3:心・血管再生.第31回日本炎症・再生医学会.東京.2010年8月5～6日
4. 島田典明、大野京子、望月　学、森田育男.眼内血管新生におけるカテプシンLの役割.第44回血管研究会.東京.2010年10月7日
5. Wayakanon P, Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K, Morita I. The role of C-terminus of Cx43 in gap junction plaque intermalization. Poster 細胞の構造と機能-細胞内流システム・小胞輸送. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会.神戸.2010年12月7-10日
6. 中浜健一、小沢　仁、鈴木岳史、森田育男.ギャップジャンクションを介した破骨細胞分化抑制作用の検討.一般演題（ポスター）細胞の構造と機能-細胞周期・細胞分裂・細胞分化・細胞極性. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会.神戸.2010年12月7-10日
7. 李　香蘭、穐山雅子、中浜健一、輿石太郎、竹田　省、森田育男.破骨細胞分化におけるICAM-2の役割.第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会.神戸.2010年12月7-10日
8. 森田育男.講演.医歯学教育・研究推進と倫理.東京医科歯科大学生命倫理研究センター5周年記念シンポジウム「生命・医療・研究倫理の未来を見据えて」.東京.2010年2月10日
9. 森田育男.講演.歯科医学における基礎臨床ボーダーレス教育・東京医科歯科大学の取り組み.新潟大学（医歯学総合研究科歯科矯正学分野、新潟大学医歯学総合病院矯正歯科診療室　斉藤功教授）.2010年3月19日
10. 森田育男.講演.印刷技術を用いた組織再生.第89回工学フォーラム.京都大学再生医科学研究所.2010年5月14日
11. 森田育男.細胞転写基盤と再生.組織材料工学コース授業.大学院GP:歯科医学における基礎・臨床融合型ボーダーレス教育研究拠点の形成.当学.2010年7月2日
12. 森田育男、桑名正隆.座長.ワークショップ3:「心・血管再生」.第31回日本炎症・再生医学会（テーマ:炎症再生の分子病態と新たな治療標的）.東京.2009年8月5～6日
13. 森田育男（副学長・研究担当理事・教授）.講演.大阪歯科大学、大学院FD講演会.大阪.2010年8月20日
14. 森田育男（理事）.特別講演.コネキシンの機能解析.徳島文理大学・薬学部・大学院特別講義.徳島.2010年9月3日
15. 森田育男（理事）.特別講演.高度不飽和脂肪酸の生理作用-プロスタグランジン依存症と非依存性-.第6回「必須脂肪酸と健康」研究会.大阪.2010年9月8日
16. 森田育男（理事・副学長、医学系大学産学連携ネットワーク協議会会長）.講演.大学における医学系産学連携活動の活性化に向けた取組み.知的財産戦略ネットワーク株式会社、第2回IPSN講演会.横浜.2010年9月30日

11）外部資金の獲得状況

・森田育男:基盤研究（B）（継続）.コネキシン43を介した組織の高次機能恒常性機構の解明.研究課題番号:20390470.分担研究者:中浜健一 、研究課題番号:20390470-01.
・中浜健一:基盤研究（B）（継続）.骨リモデリングにおける破骨細胞分化の軸雨滴制御機構の解明.研究課題番号:20390463.分担研究者:森田育男、研究課題番号:20390463-01.
・森田育男:萌芽研究（継続）.転写技術を応用した歯槽骨再生医療法の開発.研究課題番号:20659306.
分担研究者:中浜健一、研究課題番号:20659306-01.小牧基浩、研究課題番号:20659306-02.
・中浜健一:挑戦的萌芽研究（継続）.破骨細胞分化を司る接着分子の同定、その制御機構と破綻による病態の解明.研究課題番号:21659432.分担研究者:森田育男、研究課題番号:21659432-01.
・森田育男:基盤研究（B）分担研究者、大野京子　代表研究者.（新規）加齢黄斑変性発症の四次元時空的解明と分子標的治療の確立.研究課題番号:22390322-01.
・森田育男:挑戦的萌芽研究　分担研究者、大野京

子　代表研究者.（継続）血管内皮前駆細胞を標的とした新たな加齢黄斑変性の治療戦略.研究課題番号:21659399-01.
・森田育男:基盤研究（A）分担研究者、秋吉一成　代表研究者.（継続）ナノゲルを基盤とした新規ドラッグデリバリーシステムの開発.研究課題番号:20240047-01.
・森田育男:基盤研究（C）分担研究者、安部まゆみ 代表研究者.（新規）核蛋白ピグペンの血管新生促進作用の機序の解明と血管新生制御への応用.研究課題番号:22501006-01.
・小牧基浩:基盤研究（C）（継続）.パターニング技術によるマラッセ上皮遺残ネットワークの構築と歯周再生療法への応用.研究課題番号:20592423.分担研究者:森田育男、研究課題番号:20592423 -01.
・安部まゆみ:（新規）核蛋白ピグペンの血管新生促進作用の機序の解明と血管新生制御への応用.研究課題番号:22501006、分担研究者:森田育男、研究課題番号:22501006- 01.
・青井陽子:特別研究員（DC1）（継続）.低酸素下におけるサイトカイン産生変動機序-メチル化の関与.研究課題番号:20・56251.
・森田育男・大日本印刷（株）:共同研究費.平成17年～22年.ナノテクノロジーを応用した再生医療および薬物導入技術の開発とその応用.研究課題番号:2B040.

A new technology for tissue regeneration using cell printing

Ikuo Morita

Department of Cellular Physiological Chemistry, Graduate School,
Global COE, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

The Tissue engineering emerged in the early 1990s to address the limitations of tissue grafting. Engineering an artificial tissue principally involves seeding cells into a biodegradable scaffold. In contrast, scaffold-free tissue engineering has been developed by several cells cultured on temperature-responsive polymer. In both cases, one of the principal limitations to the 3-dimensional (3D) structure of an engineered tissue is oxygenation and nutrient transport, that is, lack of vascularization after grafting has been suggested as one of the major reasons for poor graft take and survival of transplanted tissues. In vitro formation of capillary networks for engraftment into ischemic regions may offer a significant advance for tissue implantation and angioplasty.

We have recently developed the technique to make patterned capillary vessels constituted of endothelial cells by printing technology with photo-lithography, and tissues equipped these capillary beds were applied in vivo. In this approach, endothelial cells are patterned on a substrate and then transferred to amnion membranes. The endothelial cells change their morphology and form tubular vessels as confirmed by electron microscopy and dye microinjection. Human umbilical vein endothelial cells, omental microvascular endothelial cells and endothelial progenitor cells (OEC) isolated from umbilical blood are able for this technology, but endothelial progenitor cells (EPC) did not. Furthermore, when HOMEC and human omental stromal cells (HOSC) were co-cultured, the capillary structures constituted of HOMEC were surrounded by HOSC and stabilized without S1P. Besides, when outgrowth endothelial progenitor cells (OEC) and Wharton’s jelly-derived cells (WJC) were co-cultured on the substrates and transferred onto Matrigel, we observed that WJC covered around the tubes made of OEC.

Conclusion: We demonstrate that these cells are useful for clinical applications in regenerative medicine.

transmission of infectious diseases through the dental settings has become a major public health concern since the start of the AIDS epidemic in the early 80s. To assure the public safety from infectious diseases and to protect dental health care workers, numerous infection control guidelines, regulations and recommendations for dental settings have been published by US government agencies and professional organizations in the past two decades. In December 2003, the Center for Disease Control and Prevention (CDC; an US Federal Government Agency) reviewed current scientific evidence, consolidated previous recommendations and regulations, and published the latest “Guidelines” [MMWR

53(17)]. This CDC document provides us an opportunity to re-examine the current infection control concepts and practices under various dental care settings, including dental clinics and laboratories.

A good infection control practice starts with an effective infection-control program that includes written documents on operating policies, procedures and evaluation. The infection-control program should provide personnel education and training, immunization, exposure prevention, and post-exposure management. The main topics of the infection control in dentistry are hand hygiene, barrier protection, preprocedural mouth rinse and rubber dam, sterilization and disinfection, control and handling of sharps and medical wastes/specimens, and controlled handling and procedures for the laboratories.

The objectives of this presentation are to (1) update current status of emerging infectious diseases such as viral hepatitis, HIV/AIDS, tuberculosis, prion and bio-terrorism diseases. The epidemiology, pathology, clinical and oral manifestations, and potential impacts of these diseases on dental treatment and patient management will be discussed; (2) highlight the rationales for the current guidelines and recommendations on infectious disease control; (3) refresh evidence-based infection control concepts and practices in dentistry; (4) discuss the new development on special issues related to the dental practice such as disinfectant and personal protection products, latex allergy, dental unit waterlines and safety injection devices; (5) demonstrate an infection control protocol in a teaching dental clinic.

Infection control in dental settings can reduce risks for disease transmission and protect both dental health workers and patients. Many questions regarding the effectiveness of current infection control practice are still unclear. Research for engineering new safety devices / instruments / environment, establishing cost-effective materials and methods, managing new emerging infectious diseases, and promoting education is still needed

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 00, Number 00, 2009
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0097

Original Article

Implantation of Capillary Structure Engineered by Optical Lithography Improves Hind Limb Ischemia in Mice

Taichi Akahori, M.D.,[1,2] Akiko Kobayashi, M.D., Ph.D.,[1,2] Motohiro Komaki, D.D.S., Ph.D.,[3] Hideshi Hattori, Ph.D.,[3,*] Ken-Ichi Nakahama, Ph.D.,[1] Shizuko Ichinose, Ph.D.,[4] Mayumi Abe, M.D., Ph.D.,[3] Satoru Takeda, M.D., Ph.D.,[2,†] and Ikuo Morita, Ph.D.[1,5]

We previously reported a novel optical lithographic technique for the construction of a capillary network consisting of endothelial cells. To investigate the feasibility of clinical application in the treatment of ischemic diseases, capillary structures were formed on scaffolds made from amniotic membrane (AM) and implanted into mice. The capillary network remained in place for at least 5 days and blood perfusion through the implanted capillaries was histologically detected in an ear flap model. Moreover, blood was observed flowing through the capillary network implanted in abdominal subcutaneous tissue of mice at 5 days after insertion. Implantation of the AM capillary structure into the ischemic hind limbs of mice significantly increased reperfusion compared with controls (AM only). Blood flow was restored in the ischemic limbs to the level of corresponding non-ischemic limbs as early as 9 days after surgical implantation. The treatment reversed ischemic symptoms, and ambulatory impairment was significantly improved. Thus, the implantation of a capillary network engineered *ex vivo* could have therapeutic potential for ischemic diseases.

Introduction

Ischemic diseases including peripheral arterial diseases (PADs; arteriosclerosis obliterans and Burger's disease), myocardial infarction, and cerebral infarction cause severe tissue damage and may result in death. Patients suffering from these ischemic diseases need to undergo percutaneous transluminal angioplasty or artery bypass grafting to restore perfusion in the ischemic area. Recently, angiogenic therapy (which facilitates reperfusion by increasing capillary density) has been applied to no-option patients as sole therapy or in combination with percutaneous transluminal angioplasty and artery bypass grafting. Therapeutic angiogenesis can be divided into two categories: (1) growth factor therapy (gene therapy or protein administration) and (2) cell therapy using peripheral blood- or bone marrow-derived mononuclear cells (MNCs) as endothelial progenitor cells. Although early nonblinded and uncontrolled studies showed promising outcomes, later double-blinded, randomized, and controlled trials have been less effective than anticipated.

We have approached this issue using a different method, namely, the use of printing technology to engineer a capillary network consisting of endothelial cells (ECs) with a diameter of micrometer order.[1] For the clinical application of this technology in ischemic diseases, we constructed a capillary structure *ex vivo* and investigated its efficacy in therapeutic angiogenesis in a mouse hind limb ischemic model.

Materials and Methods

Substrate preparation

Photomask preparation, substrate preparation for fluoroalkyl-silane (FAS), and surface modification and patterning were performed as described previously.[1] For the polyethyleneglycol (PEG) substrate, the cell-repellent coating was prepared by hydrolysis and condensation reaction of

[1]Department of Cellular Physiological Chemistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.
[2]Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School, Saitama Medical University, Iruma-gun, Saitama, Japan.
[3]Department of Nanomedicine (DNP), Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.
[4]Instrumental Analysis Research Center for Life Science, Research Center for Frontier Life Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.
[5]Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases.
*Present address: Biomaterial Laboratory, Research and Development Center, Dai Nippon Printing Co., Ltd., Kashiwa, Chiba, Japan.
†Present address: Department of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Medicine, Juntendo University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

3-glycidoxypropyltrimethoxysilane with hydroxyl groups on the surface of glass and addition of tetraethylene glycol to the epoxy ring. Photocatalytic lithography was used to apply the pattern to the coating.[1] The quality of the coating was assessed by static water contact angle measurement, X-ray photoelectron spectroscopy, white light interference microscopy, and cell culture.

Cell culture and animal experiments

Bovine carotid artery ECs (BCAECs) were isolated from bovine carotid arteries and were maintained as previously described.[2] Briefly, cells were cultured in minimum essential medium (MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 5% fetal bovine serum (5%-MEM). In some experiments, BCAECs were labeled using PKH26GL Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, St. Louis, MO), according to the manufacturer's protocol.

Seven-week-old Balb/c nu-nu mice were used for surgical procedures, all of which performed in accordance with the guidelines of the Tokyo Medical and Dental University Animal Care Ethics.

Establishment of aequorea coerulescens-green fluorescent protein–expressing BCAECs

An aequorea coerulescens (Ac)-green fluorescent protein (AcGFP) retroviral vector was constructed by ligation of an AcGFP fragment to a pQCXIN vector (BD Biosciences, San Jose, CA). Retrovirus was obtained by cotransfection of an AcGFP retroviral vector and a packaging vector pCL-10A1 (Imgenex, San Diego, CA) into HEK293 cells with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). BCAECs were infected with culture medium containing the retrovirus. AcGFP-expressing BCAECs (AcGFP-BCAECs) were obtained by G418 selection.

Preparation of amniotic membrane

Human amniotic membranes (AM) were prepared using placentas, as described elsewhere.[3] Human placentas used in this study were obtained from cesarean section of women negative for human immunodeficiency virus, hepatitis virus types B and C, and syphilis and stored at −80°C during 2004–2006. Human samples were handled according to the Declaration of Helsinki, with the approval of university review boards.

Patterning of BCAECs

BCAECs were seeded on FAS or PEG substrates at a density of $2.0–2.5\times10^5/3.6\,cm^2$/piece and cultured in 5%-MEM for 16–24 h. The cells in 0.3%-MEM were gently agitated on a shaker for a further 2–4 h to promote patterning. The substrate (patterned cells facing down) was placed onto AM covered with 5%-MEM (200 μL/piece) and the resultant layers of the substrate–cells–AM were incubated in 5%-MEM for 24 or 48 h. When the substrate was removed, patterned cells were transferred onto the AM.

Observation of patterning and tube formation by BCAECs

PKH26GL-labeled BCAECs on the substrates or on AM were observed under a fluorescent microscope (Biozero BZ8000; Keyence, Osaka, Japan).

The structures constituted by BCAECs on AM were analyzed by transmission electron microscopy. Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) for 2 h, then washed overnight at 4°C in the same buffer, and postfixed with 1% OsO_4 in 0.1 M PBS for 2 h. The cells were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in Epon 812 (TAAB Laboratories Equipment, Aldermaston, UK). Ultrathin (90 nm) sections were collected on copper grids, double-stained using uranyl acetate and lead citrate, and then examined using an H-7100 transmission electron microscope (H-7100; Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan).

Nude mouse ear flap model

Seven-week-old Balb/c nu-nu mice were anesthetized with pentobarbital (30–50 mg/kg) by intraperitoneal injection and set in a prone position. Epidermis of the ears was disinfected with 70% ethanol. A skin incision was made in a square U-shape and the dermis was detached from subcutaneous tissue to make a skin flap. The AM with the engineered capillaries was placed onto the detached dermis. Skin wounds were sutured with 10-0 silk string. The transplanted capillary structure was observed on days 0, 2, and 5 under a fluorescent stereo microscope (Leica MZFLIII; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Immunohistochemistry of engineered capillaries

Two days after the transplantation of engineered capillaries on AM into murine ears, the ear was excised for histological analysis. Thin sections (5–6 μm) were sliced with a cryostat (Leica CM1850, Leica MZFLIII; Leica Microsystems) and collected on a glass slide. Specimens were dried for 30 min and fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS for 10 min. After washing with PBS, specimens were incubated in blocking solution (BS; 2% bovine serum albumin and 0.2% Triton X-100 in PBS) for 1 h and then incubated with 4 μg/mL polyclonal antibody to human vascular endothelial (VE)-cadherin (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) in 1/10 (v/v) BS for 1 h. This antibody recognizes both human and mouse VE-cadherin. After three washes with PBS, specimens were incubated with 4 μg/mL Alexa Fluoro 488 goat anti-rabbit immunoglobulin G (Invitrogen) in 1/10 BS for 1 h, washed with PBS three times, and incubated with TO-PRO-3 (Invitrogen) for nuclear staining. After a tap water rinse, VE-cadherin signal in ECs was observed under a confocal microscope (LSM510META; Zeiss, Oberkochen, Germany).

Nude mouse abdominal subcutaneous model

Seven-week-old Balb/c nu-nu mice were prepared and a skin flap made in the abdomen as described earlier. AM with capillaries consisting of AcGFP-BCAECs was placed on the denuded area. Skin wounds were closed by suturing with 7-0 silk string.

In vivo *imaging analysis of engineered capillaries*

Five days after the transplantation of engineered capillaries into murine abdominal subcutaneous tissue, intravital blood flow in engineered and implanted capillaries was observed using an *in vivo* imaging system (Olympus, Tokyo, Japan).[4] Mice were anesthetized with fluorothane gas on a

stage maintained at 37°C. Then, a skin incision was made in a square U-shape to expose the abdominal skin with implanted capillaries beneath. Immediately after tail vein injection of 50 μL of AngioSense 750 (VisEn Medical, Woburn, MA), blood flow in the implanted capillaries was detected with a probe under a prototype multichannel upright laser scanning fluorescence microscope (IV100; Olympus).[4] Data were obtained with FluoView imaging software (Olympus).

Nude mouse hind limb ischemia model

Seven-week-old Balb/c nu-nu mice were prepared as described earlier. Epidermis of the right inguinal thigh area was disinfected with 70% ethanol. The right femoral artery was ligated with 9-0 silk string at its proximal end and at the point where it bifurcates into the saphenous and popliteal arteries, and the ligated portion of the femoral artery and all side branches were dissected and excised. AM with engineered capillaries or AM alone (a sham control) was placed onto the site of excised arteries. In some experiments, the same number of BCAECs used for implanted capillary structures was injected at three sites along the site of femoral artery excised. Skin wounds were closed by suturing with 7-0 silk string.

In vivo *assessment of limb perfusion*

Blood flow in the hind limbs from the inguinal line to the toe was measured with a laser Doppler blood flow meter (Laser Doppler Imager; Moor Instruments, Devon, UK) at the indicated times. Perfusion was expressed as a ratio of ischemic limb/nonischemic limb.

In vivo *assessment of limb function and ischemic damage*

Semiquantitative assessments of impaired use and damage to the ischemic limb were performed serially using a modification of previously described protocols.[5,6] Ambulatory impairment score: 0 = flexing the toes to resist gentle traction on the tail; 1 = foot flexion; 2 = no dragging but no plantar flexion to resist gentle traction on the tail; 3 = dragging of foot. Ischemic damage score: 0 = no difference from the left hind limb; 1 = mild discoloration; 2 = moderate discoloration; 3 = severe discoloration or ulceration; 4 = amputation.

Statistical analysis

The statistical significance of differences was evaluated by use of analysis of variance, with p-values calculated with the Tukey–Kramer method. A p-value of <0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Patterning on substrates, transfer, and tubule formation on AMs

BCAECs were seeded on substrates with 60-μm-wide hydrophilic lines separated by 300-μm-wide hydrophobic spaces. The cells migrated and adhered to linear hydrophilic regions of the PEG and FAS substrates (Fig. 1A, top row; right vs. left and previously reported,[1] respectively). After 24-h incubation of the substrate with the patterned cells on AM, the patterned cells transferred from the substrate to AM as shown previously.[1] Attachment of the patterned cells to AM resulted in a change of morphology, as cells shifted from linear, tandem arrays to tube-like structures with indistinguishable cell junctions (Fig. 1A, middle row). The structures lasted for at least 48 h (Fig. 1A, bottom row). Electron microscopy revealed a lumen in the tube-like structures on AM using the PEG substrate for patterning (Fig. 1B) as well as the FAS substrate.[1]

Capillary structure retains patterns for 5 days following implantation

Next, we investigated whether the capillary pattern of the structures was retained *in vivo*. For this purpose, we developed and employed a nude mouse ear flap model as

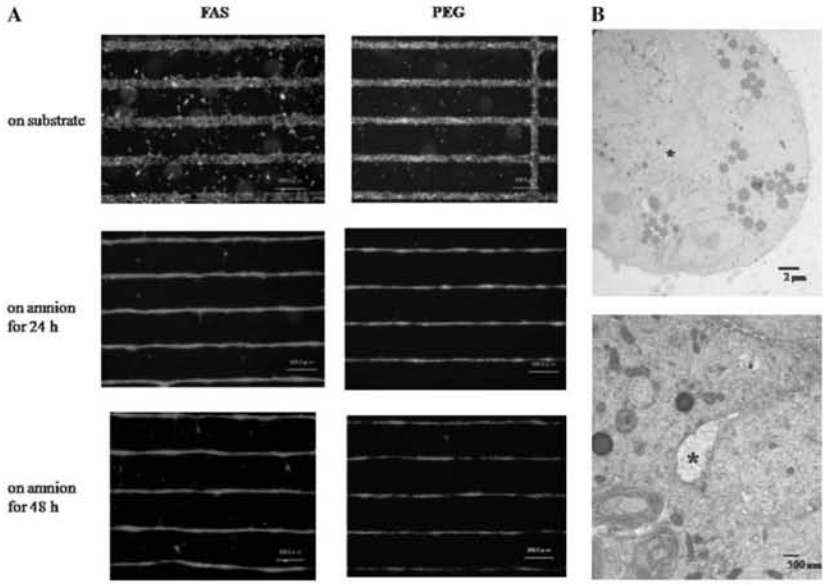


FIG. 1. *Ex vivo* capillary formation using optical lithographic techniques. (**A**) Top: BCAECs were labeled with PKH26GL and incubated on a FAS substrate (left) or a PEG substrate (right). The patterned structure of BCAECs was then transferred onto AM and incubated for 24 h (middle) or 48 h (bottom). (**B**) Transmission electron microscopy of tube-like structures consisting of BCAECs incubated on AM for 24 h. The asterisk indicates the lumen. BCAECs, bovine carotid artery endothelial cells; FAS, fluoro-alkyl-silane; PEG, polyethyleneglycol; AM, amniotic membrane. Color images available online at www.liebertonline.com/ten.

described in the Materials and Methods section. The implanted capillaries of PKH26GL-labeled BCAECs could be observed through the thin ear skin of nude mice under a fluorescent stereoscope without invasive procedures (Fig. 2A, B). The patterns of engineered structures could be observed for at least 5 days *in vivo* (Fig. 2C, D).

Implanted capillary structures function in vivo as blood vessels

Two days after implantation, we analyzed the ear histologically and found that the implanted capillaries contained red blood cells (data not shown) as previously reported.[1] Moreover, the lumens of the implanted capillaries positive for PKH26GL and VE-cadherin were open as were those of host blood vessels (Fig. 3A).

Next, to clarify whether implanted capillary structures functioned as blood vessels, we developed a nude mouse abdominal subcutaneous model and employed *in vivo* imaging system analysis to detect blood flow in implanted capillaries. We engineered capillary structures *ex vivo* using AcGFP-BCAECs and implanted them into the abdominal subcutaneous tissue of nude mice. On day 5, intravital blood flow was observed with a multichannel laser scanning fluorescence microscope and recorded immediately upon tail vein injection of AngioSense 750, a vascular imaging probe. The implanted capillaries maintained structure (Fig. 3B, left panel), and intravital blood flow was detected as a red stream (Fig. 3B, middle panel). We also observed blood actively flowing through implanted capillaries into host vessels (Fig. 3B, right panel). These data show that engineered capillary structures connect with host blood vessels and function as such when transplanted into an ischemic area.

Implantation of engineered capillary structures increases blood flow in hind limb ischemia

Next, we investigated whether the engineered capillary network could be used therapeutically in the treatment of ischemic disease. For this study, a nude mouse hind limb ischemia model was used. As shown in Figure 4A, implantation of capillary structures on AM increased blood perfusion significantly earlier than control (AM only) and restored blood flow in the ischemic limbs to a level corresponding to the nonischemic limb at 9 days after implantation. In contrast, injection of the same number of single cells as used for implanted capillaries had no effect on perfusion in the ischemic limb compared with AM only (Fig. 4B).

Implantation of engineered capillary structures reduces both tissue damage and ambulatory impairment in hind limb ischemia

Finally, we investigated whether blood flow recovery leads to objective (measurable) improvements of symptoms in the ischemic limb. Therefore, ischemic tissue damage and ambulatory impairment were scored by a graded index of characteristics and evaluated as described in the Materials and Methods section. The beneficial effects of implantation of engineered capillary structures on ischemic tissue damage (Fig. 5A) and ambulatory impairment (Fig. 5B) became obvious as early as 3 days after surgery. The improvement in ischemic symptoms (Fig. 5) correlated with the recovery of blood perfusion (Fig. 4A).

Discussion

Investigation into angiogenesis made antiangiogenic therapy possible for a range of diseases[7] and subsequently

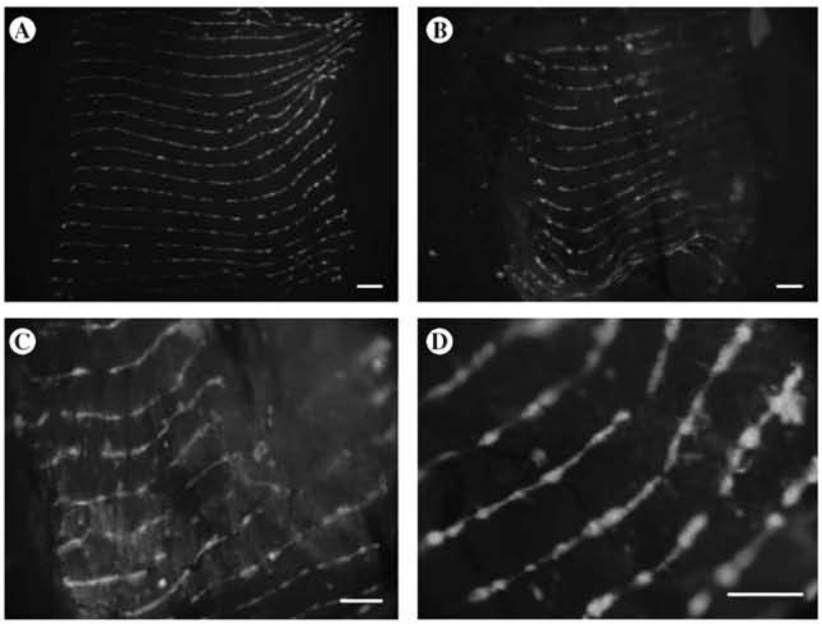


FIG. 2. The structure of engineered capillaries persists *in vivo* for at least 5 days. Capillary structure on AM labeled with PKH26GL was implanted in the ears of nude mice as described in the Materials and Methods section and observed under a fluorescent stereoscope on days 0 (**A**), 2 (**B**), and 5 (**C, D**). Scale bars = 300 μm. Color images available online at www.liebertonline.com/ten.

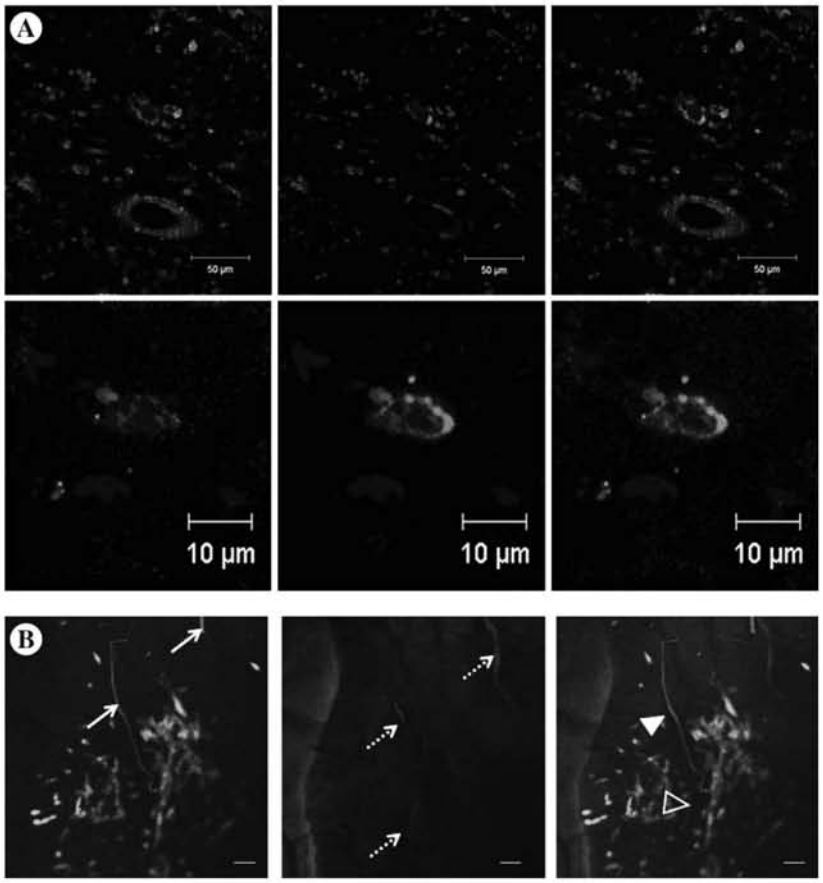


FIG. 3. Implanted capillary structures function *in vivo* as blood vessels. (**A**) Immunohistochemistry of a murine ear implanted with engineered capillaries at day 2. A capillary consisting of BCAECs (red, PKH26GL; green, vascular endothelial (VE)-cadherin) and the host blood vessels (green, VE-cadherin) was observed under a confocal microscope. (**B**) Intravital blood flow in engineered and implanted capillaries (arrow head in the right panel) in murine subcutaneous tissue was observed at day 5 using an *in vivo* imaging system as described in the Materials and Methods section. Blood flow was detected with AngioSense 750 (red; dashed arrow in the middle panel) in transplanted capillaries of aequorea coerulescens (Ac)-green fluorescent protein–expressing BCAECs (green; arrow in the left panel). Scale bars = 200 μm.

led to the development of approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic diseases. The initial strategy for angiogenic therapy was supply of angiogenic growth factors via gene therapy or protein administration. More recently, angiogenic cell therapy emerged as a method to supply MNCs as endothelial progenitor cells, a constituent of neovessels. However, later studies revealed that MNCs are heterogeneous cells that could differentiate into not only ECs but also other cells[8] and enhance angiogenesis in adults primarily via the secretion of angiogenic growth factors rather than incorporation into vessel walls.[9,10] These therapeutic regimens have been evaluated in animal models of myocardial and hind limb ischemia and were promptly extended to human trials of PAD and myocardial infarction. The outcomes of these therapies have been reported to be effective or at least feasible. However, further clinical trials and detailed evaluation will be needed because some results have been inconsistent.[11,12]

The two preceding therapies targeted blood vessels less than 1 mm in diameter, that is, capillaries. We succeeded in making a capillary network with a diameter of micrometer order by the use of a novel optical lithographic technique and mature ECs.[1] In this study, we investigated whether capillary networks could function as blood vessels when transplanted into ischemic region. We labeled BCAECs with PKH26GL to distinguish them from host blood vessels. However, dye transfer between donor and acceptor cells can occur. To reduce the possibility of cell-to-cell transfer, we washed cells three times after labeling, and samples were transferred to new tubes between washes. The implanted capillary labeled with PKH26GL (red) is distinguishable from host blood vessel (green), and dye transfer from BCAECs to ECs of mouse blood vessel was not observed (Fig. 3A).

The engineered capillaries could be observed *in vivo* for at least 5 days (Fig. 2) and intravital blood flow was observed in the implanted capillaries (Fig. 3B). These results indicate that the implanted capillaries were fused to host blood vessels. It is known that hypoxia in ischemic tissue induces sprouting from preexisting vessels.[13] Hypoxia and hypoxia-induced angiogenic growth factors in our ischemic models are thought to activate ECs at the open ends of the implanted capillaries and of preexisting host vessels and induce sprouting from both. We speculated that sprouting vessels in proximity met and were fused to each other, resulting in blood flow through the implanted capillaries from host. To our knowledge, this is the first report of blood flowing through implanted capillaries engineered *ex vivo*.

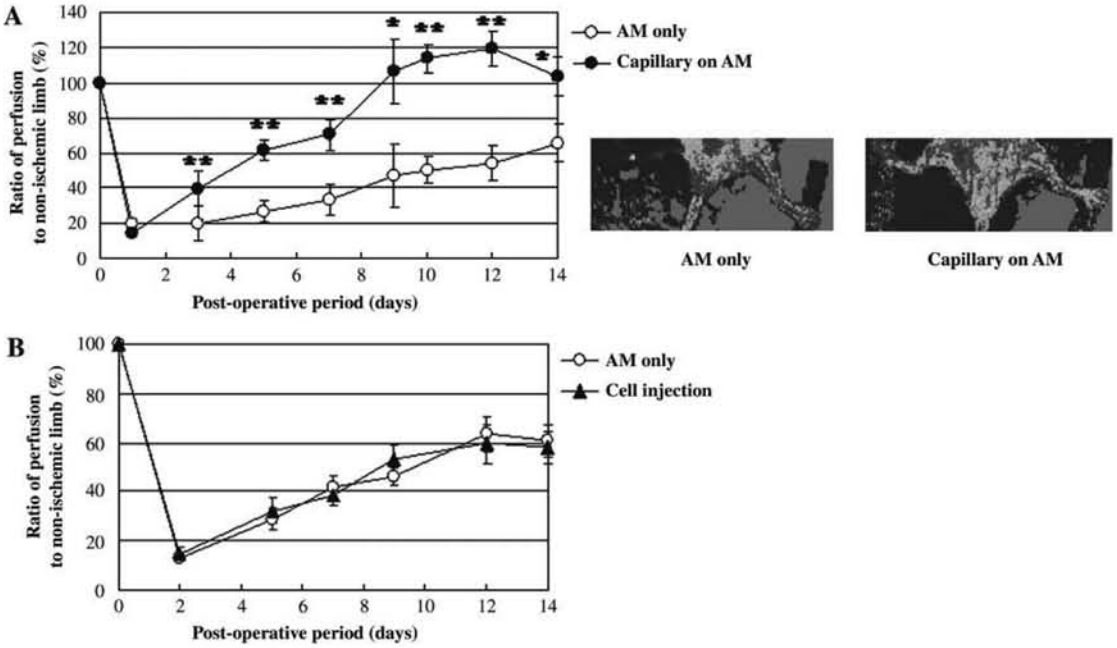


FIG. 4. Effects of capillary implantation on blood flow in an ischemic hind limb. (**A**) Either AM only (open circle) or a capillary structure on AM (closed circle) was implanted in the ischemic hind limb and blood flow was measured using a laser Doppler blood flow meter. The perfusion ratio was expressed as ischemic limb/nonischemic limb. Scale bars = standard error. There were five nude mice per group. $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ versus AM only. Representative laser Doppler images at day 5 are shown. (**B**) The perfusion ratio of an AM implantation group (open circle) or a cell injection group (closed triangle) was analyzed and expressed as above. The number of nude mice per group was 10.

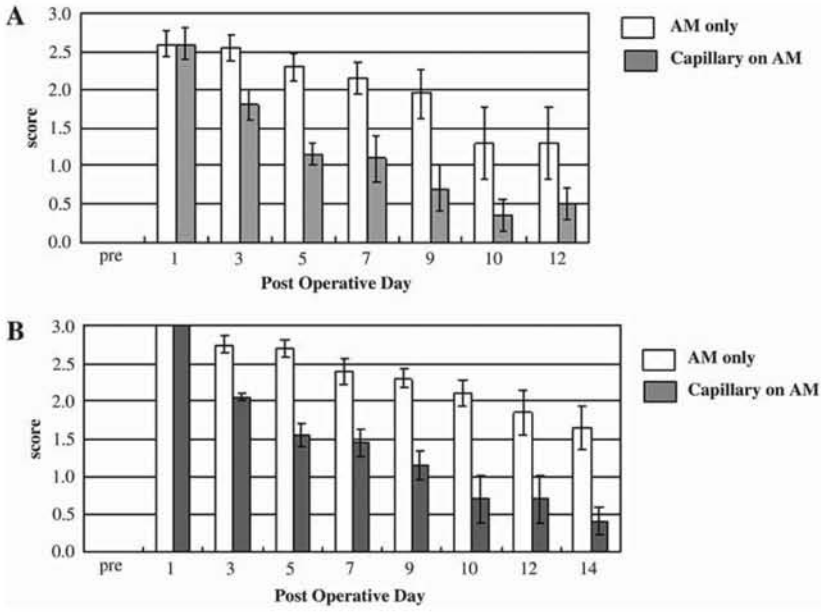


FIG. 5. Implantation of capillaries reverses tissue damage and reduces clinical symptoms caused by ischemia. Ischemic tissue damage (**A**) and ambulatory impairment (**B**) were evaluated as described in the Materials and Methods section. Scale bars = standard error, with five nude mice per group.

Moreover, engineered capillaries significantly increased blood perfusion (Fig. 4A), whereas the injection of single ECs did not improve blood flow recovery in ischemic hind limbs of mice compared with AM only (Fig. 4B), as reported by Kalka *et al.*[14] Although laser Doppler imaging is limited to superficial flow, it is used to assess the treatment for PAD. Additionally, inflammation reaction and the vasodilatory growth factors from BCAECs might cause increase in superficial blood flow. However, Figure 4 indicates that the effect of implanted capillaries on the increase in blood flow is not due to inflammatory reaction from surgical procedures and/or implanted AM, and the effect of cytokines from BCAECs on vasodilation is negligible. Further, healing of ischemic tissue damage and reversal of ambulatory impairment accompanied the increase in reperfusion (Fig. 5).

Thus, implantation of a capillary network engineered *ex vivo* from autologous cells may have therapeutic potential for the treatment of ischemic diseases. We are currently examining which cells could be utilized as autologous and mature ECs for this method.

Acknowledgment

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (grant nos. 17590235, 20592423, 20390470, and 20659306).

Disclosure Statement

All authors disclose no financial support or relationship that may pose a conflict of interest.

References

1. Kobayashi, A., Miyake, H., Hattori, H., Kuwano, R., Hiruma, Y., Nakahama, K., Ichinose, S., Ota, M., Nakamura, M., Takeda, S., and Morita, I. *In vitro* formation of capillary networks using optical lithographic techniques. BBRC **358,** 692, 2007.
2. Wang, J., Morita, I., Onodera, S., and Murota, S. Induction of KDR expression in bovine arterial endothelial cells by thrombin: involvement of nitric oxide. J Cell Physiol **190,** 238, 2002.
3. Koizumi, N., Fullwood, N.J., Bairaktaris, G., Inatomi, T., Kinoshita, S., and Quantock, A.J. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci **41,** 2506, 2000.
4. Arwert, E., Hingtgen, S., Figueiredo, J.L., Bergquist, H., Mahmood, U., Weissleder, R., and Shah, K. Visualizing the dynamics of EGFR activity and antiglioma therapies *in vivo*. Cancer Res **67,** 335, 2007.
5. Rutherford, R.B., Baker, J.D., Ernst, C., Johnston, K.W., Porter, J.M., Ahn, S., and Jones, D.N. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. J Vasc Surg **26,** 517, 1997.
6. Stabile, E., Burnett, M.S., Watkins, C., Kinnaird, T., Bachis, A., La Sala, A., Miller, J.M., Shou, M., Epstein, S.E., and Fuchs, S. Impaired arteriogenic response to acute hind limb ischemia in CD4-knockout mice. Circulation **108,** 205, 2003.
7. Kerbel, R.S. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? Science **312,** 1171, 2006.
8. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., and Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature **418,** 41, 2002.
9. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., and Epstein, S.E. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. Circulation Res **95,** 354, 2004.
10. Purhonen, S., Palm, J., Rossi, D., Kaskenpää, N., Rajantie, I., Ylä-Herttuala, S., Alitalo, K., Weissman, I.L., and Salven, P. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA **105,** 6620, 2008.
11. van Weel, V., van Tongeren, R.B., van Hinsbergh, V.W., van Bockel, J.H., and Quax, P.H. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. Ann Vasc Surg **22,** 582, 2008.
12. Sieveking, D.P., and Ng, M.K.C. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. Vasc Med **14,** 153, 2009.
13. Neeman, M., Abramovitch, R., Schiffenbauer, Y.S., and Tempel, C. Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. Int J Exp Pathol **78,** 57, 1997.
14. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W.M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J.M., and Asahara, T. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci USA **97,** 3422, 2000.

Address correspondence to:
Mayumi Abe, M.D., Ph.D.
Department of Nanomedicine (DNP)
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Tokyo Medical and Dental University
1-5-45 Yushima
Tokyo 113-8549
Bunkyo-ku
Japan

E-mail: mayumi.dnp@tmd.ac.jp

Received: February 12, 2009
Accepted: October 14, 2009
Online Publication Date: November 24, 2009

MEMO

顎口腔外科分野

小村　健

医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻
口腔機能再建学／医学博士・教授

1）研究の課題名

「片側頸部郭清後の嚥下動態の経時的変化」

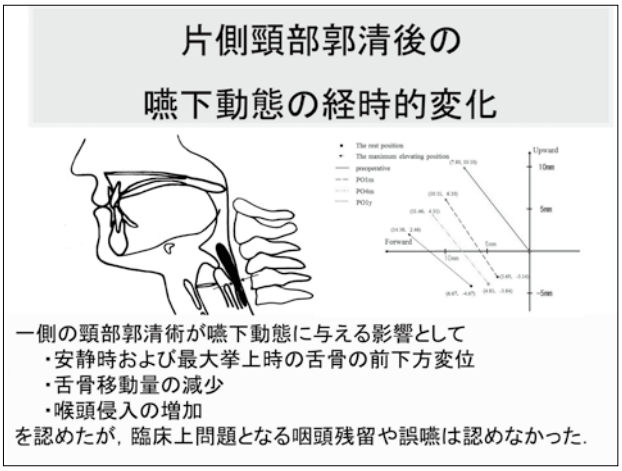
Sequential evaluation of swallowing function in patients with unilateral neck dissection

頭頸部癌において頸部郭清術は頸部リンパ節転移に対し最も確実な治療法である。頸部郭清術を施行した患者は術後にしばしば嚥下障害を訴えるが、咽頭期の嚥下機能を詳細に評価した報告はほとんどない。今回われわれは、Videofluoroscopic Swallowing Study（VFSS）とVideoendoscopic Swallowing Study（VESS）を用い片側頸部郭清術施行患者の経時的な嚥下機能評価を行った。

本研究での評価項目は（1）安静時の舌骨位置、（2）嚥下時の舌骨最大挙上位置、（3）食道入口部の最大開大量、（4）咽頭通過時間、（5）咽頭残留の有無、（6）喉頭侵入および誤嚥の有無、とし、術前、術後1か月、4か月で嚥下機能評価を行った。

片側頸部郭清術が嚥下機能に及ぼした影響は安静時と最大挙上時の舌骨の前下方変位、舌骨移動量の減少、喉頭侵入の増加であった。顎二腹筋前腹・後腹、茎突舌骨筋、肩甲舌骨筋の切除、また術後の浮腫や瘢痕が原因であると考える。咽頭通過時間、食道入口部の最大開大量や咽頭期のタイミングは術前と比べ有意差は認められなかった。臨床的に問題となる咽頭残留や誤嚥は全検査において認めなかった。頸部郭清術は嚥下障害の危険因子の1つではあるが、本研究において嚥下障害を示した患者は認めなかった。

2）



3）研究内容についての英文要約

Preoperative concurrent chemotherapy with S-1 and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity: Phase I trial

This study was conducted to identify a recommended dose for S-1, used in combination with 40-Gy radiation. Thirty patients, 15 each with stage III and IVA oral carcinoma, were enrolled. All patients received a total dose of 40-Gy. For the S-1 treatment, patients were given either the standard Japanese dose, calculated according to body surface area, or a reduced dose. Groups consisting of at least three patients were given S-1 according to one of 8 regimens. Hematologic toxicity was mild and reversible. The most common nonhematologic toxicity was mucositis. At level 8 that was the standard S-1 dose for 5 days per week for 4 weeks, dose-limiting toxicity was observed when 2 patients had grade 4 mucositis. This level was thus deemed the maximum tolerated dose for the regimen. The recommended dose of S-1 with concurrent radiotherapy was the reduced dose of S-1 given for 5 days per week, for 4 consecutive weeks. Preoperative S-1 and concurrent radiotherapy was well tolerate and feasible and warrants a phase II study.

Effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone formation in rabbit mandibular distraction models using b-tricalcium phosphate

This study was designed to evaluate the effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) on the amount and period of new bone formation in rabbit mandibular distraction models using b-tricalcium phosphate (b-TCP) as a bone graft substitute. Sixteen male Japanese White rabbits were divided into the following four experimental groups: 1, distraction alone; 2, distraction with b-TCPgranules; 3, distraction with rhFGF-2 (25 mg/50 mL) injected into b-TCP granules; and 4, distraction with rhFGF-2 (100 mg/50 mL) injected into b-TCP granules. The bones were harvested at 4 weeks after the operation and examined using soft radiography, micro-computed tomography (micro-CT), and peripheral quantitative computed tomography (pQCT). The dissected mandibles were stained using the Villanueva bone staining method, and the amount of new bone formed, bioresorption of b-TCP, and new blood vessel formation were morphometrically calculated using bone histomorphometry. Radiopaque areas were observed more frequently in the distracted area of groups 3 and 4. Micro-CT analysis revealed partial new bone formation in the central region of the distracted area in groups 3 and 4. pQCT analysis revealed increased bone mineral density in groups 3 and 4. Histomorphometric analysis revealed increased newly formed bone and blood vessel areas in groups 3 and 4. In group 4, the number of osteoclasts around the b-TCP granules had significantly increased. The present findings suggested that the combined use of rhFGF-2 and b-TCP reduced the treatment period for distraction osteogenesis and accelerated the formation of a new high-quality bone.

Sequential evaluation of swallowing function in patients with unilateral neck dissection

Neck dissection is the most reliable treatment for cervical lymph node metastases in head and neck cancer. However, it is unknown whether neck dissection can cause dysphagia. The aim of this study was to evaluate swallowing function after neck dissection. By using videofluoroscopic and videoendoscopic methods, swallowing function was evaluated in 17 patients prior to, 1 month after, and 4 months after neck dissection. In comparison with preoperative observations, swallowing function after neck dissection was affected by the following changes: a forward and downward displacement of the hyoid bone at rest and at its highest position, a decrease in the distance traversed by the hyoid bone during swallowing, and an increase in laryngeal penetration. Pharyngeal residue and aspiration were not observed in any of the patients. Although swallowing function is affected by neck dissection, serious clinical problems are not likely to occur.

Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers. Significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells

We investigated the roles of interleukin-6 (IL-6) and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) -induced osteoclast formation. Microarray analyses performed on 43 human OSCC specimens revealed that many of the specimens overexpressed PTHrP mRNA, but a few overexpressed IL-6 mRNA. Immunohistochemical analysis revealed that IL-6 was expressed not only in cancer cells but also in fibroblasts and osteoclasts at the tumor-bone interface. Many of the IL-6-positive cells coexpressed vimentin. Conditioned medium (CM) derived from the culture of oral cancer cell lines (BHY, Ca9-22, HSC3, and HO1-u-1) stimulated Rankl expression in stromal cells and osteoclast formation. Antibodies against both human PTHrP and mouse IL-6 receptor suppressed Rankl in ST2 cells and osteoclast formation induced by CM from BHY and Ca9-22, although the inhibitory effects of IL6 antibody were greater than those of PTHrP antibody. CM derived from all of the OSCC cell lines effectively induced IL-6 expression in stromal cells, and the induction was partially blocked by anti-PTHrP antibody. Xenografts of HSC3 cells onto the periosteal region of the parietal bone in athymic mice presented histology and expression profiles of RANKL and IL-6 similar to those observed in bone-invasive human OSCC specimens. These results indicate that OSCC provides a suitable microenvironment for osteoclast formation not only by producing IL-6 and PTHrP but also by stimulating stromal cells to synthesize IL-6.

Orbital approach via swinging eyelid procedure

The swinging eyelid approach is a surgical approach to the orbit and is a variation of the transconjunctival approach combined with a lateral canthotomy. This approach is not common in the field of oral and maxillofacial surgery. However, it can provide a large surgical field without a cosmetic disadvantage. We performed a reduction of an orbital floor fracture in a 44-year-old female via the swinging eyelid approach. We exposed the orbital floor and obtained excellent cosmetic results without any complications. The swinging eyelid approach is very useful in the repair of orbital floor fractures, and may even be used in the field of oral and maxillofacial surgery.

Osteonecrosis of the mandible associated with bisphosphonate therapy: report of a case with surgical intervention

Nitrogen-containing bisphosphonates have been widely administered to patients with metastases because of their high efficacy in skeletal complications. Although the exact

mechanism of bisphosphonate-mediated osteoclast inhibition has not been completely elucidated, it was reported recently that nitrogen-containing bisphosphonates could cause complications of osteomyelitis or osteonecrosis of the jaw. This article reports the long-term results with an advanced breast cancer patient who suffered osteonecrosis of the mandible when receiving nitrogen-containing intravenous bisphosphonates therapy. There were serious concerns about the possibility of pathological fracture resulting from the developing osteonecrosis, the patients' quality of life and ultimately their survival prognosis. After consultation with her oncologists about her physical condition and the general surgical risks, we provided positive surgical interventions. At present, the patient has no radiographic or clinical evidence of recurrence 34 months after the surgeries. This report provides information on the benefits of minimal surgical intervention on the quality of life, compared to a wide bone resection performed after pathological fracture has already occurred.

A case of primary combined neuroendocrine carcinoma with squamous cell carcinoma in the upper gingiva

Neuroendocrine carcinoma is a rare neoplasm that occurs widely in various organs and tissues. The biological behavior of this tumor in the oral region remains poorly understood. We encountered an extremely rare case of combined neuroendocrine carcinoma with squamous cell carcinoma, occurring at the buccal gingiva in a 62-year-old woman. Left partial maxillectomy was performed. Histological examinations revealed solid nests with extensive necrosis and nuclear palisading at the periphery. The tumor also showed areas of stratified neoplastic squamous differentiation. Immunohistochemically, tumor nests stained positive for synaptophysin, chromogranin, N-CAM（CD56）, and neuron-specific enolase. Strong positivity was seen for K14 and K17 in the squamous component and for K7 in the neuroendocrine component. Both components showed K19 staining. Cells with squamous differentiation and K14 staining occasionally expressed p63. The patient showed no evidence of disease as of 23 months postoperatively. Given the aggressive characteristics of neuroendocrine carcinoma, strict follow-up has been performed.

Malignant fibrous histiocytoma of the jaws: A report of 3 cases

Malignant fibrous histiocytoma（MFH）of the jaws aggressively invades adjacent tissues with a high local recurrence rate. Although radical excision with adequate tumor-free margins is essential, from the anatomical point of view wide resection is often difficult in the head and neck region. We reported 3 cases of MFH arising in the jaws. All three cases were males with 36–51 years old. One disease occurred in the mandible and the others in the maxilla. All cases underwent wide local excision and followed by adjuvant chemotherapy of 2 cycles consisting ifosfamide（IFO）, cisplatin（CDDP）and doxorubicin（DOX）. In 2 cases, neither tumor recurrence nor metastasis developed at follow-up of 78 months and 70 months. In one case, the patient died from tumor recurrence at follow-up of 2 months. The effects of combined treatment with surgery and adjuvant chemotherapy forMFHof jaws will be assessed by further follow-up.

DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma

The Fas-associated death domain-containing protein, FADD, is an adaptor for relaying apoptotic signals. However, recent studies have shown that FADD also plays an important role in the growth and regulation of the cell cycle. The purpose of this study was to elucidate the role of FADD in oral squamous cell carcinoma（SCC）. The DNA amplification of FADD from 30 samples of tongue SCC was analyzed using real-time PCR and the protein expression of FADD from 60 samples of tongue SCC was analyzed using immunohistochemistry. The DNA amplifications of FADD were observed in 13 cases（44.3%）and were significantly correlated with the histopathological differentiation grade of SCCs. FADD expression levels compared with the matched adjacent epithelium increased significantly. Additionally, the positive expressions of FADD were significantly correlated with lymph node metastasis of SCCs and the 5-year disease-specific survival rates . A positive association between FADD expression level and the histopathological differentiation grade was found to be limited to T1 SCCs. DNA amplification was moderately correlated（correlation coefficient = 0.406, with expression of FADD in 30 samples of tongue SCC. In tongue SCCs, the expression of FADD was higher when compared with that of adjacent areas, which might be determined via genomic amplification in 11q13.3. Thus, SCC cells with the expression of FADD are possibly more likely to become metastatic and to worsen survival rates.

Uptake and kinetics of 5-aminolevulinic acid in oral squamous cell carcinoma

Photodynamic diagnosis（PDD）is a form of cancer detection based on the administration of an exogenous photo-activated compound that accumulates in malignant cells, followed by appropriate photo irradiation. The authors describe a spectroscopic study of 5-aminolevulinic acid（5-ALA）-generated photosensitizer protoporphyrin IX（PpIX）fluorescence in human oral squamous cell carcinoma（OSCC）cell lines to validate its clinical use. 5-ALA-induced PpIX fluorescence intensity was measured in the presence and absence of deferoxamine mesylate（DFO）. Two, one and two cell lines produced poorly,

moderately and well differentiated carcinomas, respectively, on transplantation in scid mice. The fluorescence intensity was high in the poorly differentiated cell lines, followed by the moderately differentiated cell line; the intensity of the well differentiated cell lines was low and not significantly different from that of normal keratinocytes in the absence of DFO. It was elevated to the level of poorly differentiated cell lines following DFO treatment. This elevation was not observed in normal keratinocytes. The results indicate that DFO enhances the photodynamic sensitivity of 5-ALA in non-responsive carcinoma cells as a result of increased cellular accumulation by inhibiting haeme biosynthesis. This PDD system can be applied clinically to the detection of OSCC irrespective of the degree of differentiation.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

硬組織領域における教育、研究、臨床について優れた実績を上げるため、平成15年度より開始の21世紀COEプログラム「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」において形成した研究基盤をさらに発展させ、一方、特別教育研究経費による「硬組織疾患ゲノムセンター」との密なる連携を図りつつ、口腔扁平上皮癌などの口腔外科学領域における悪性腫瘍を中心とした硬組織疾患のテーラーメイド医療の実現とともに、トランスレーショナル・リサーチへの発展を視野にいれた研究を展開している。

B（研究教育環境）

教育・研究基盤をさらに発展させ、基礎医・歯学分野から臨床分野までの融合型国際教育研究拠点の強化･拡大を図ることによって、博士課程学生に優れた教育環境・プログラムを提供し、国内外の研究機関とも連携して“国際的創造型科学者”の育成を目指す。

C（人材確保）

基礎医・歯学分野から臨床分野までの様々な情報・技術交流を目指し、学外研究所等との大学院生・教員の相互的な派遣・受け入れの体制を整備し、基礎研究、臨床研究の両分野について先端的かつ十分な知識と技術を持つ人材の確保に取り組んでいる。

D（人材育成）

顎顔面疾患におけるテーラーメイド医療の実現とQOLの向上をも目指したトランスレーショナル・リサーチを推進することによって、基礎医・歯学分野から臨床・応用医学分野までを両立させた“国際的創造型科学者”を養成する。

E（国際化）

国際的な情報交換と技術交流を目指し、アジア各国からの留学生を大学院生として受け入れて研究を遂行し、相互の発展に寄与している。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

臨床情報を具備した口腔扁平上皮癌症例の外科切除試料の系統的な収集と本学に既に設置済みのバイオリソースセンターにおける保存を進めつつ、これらの臨床検体を用いた網羅的発現解析によって口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移診断モデルを構築するとともに、口腔扁平上皮癌細胞株での網羅的ゲノム・エピゲノム解析などにより新規口腔癌抑制遺伝子を単離・同定し、口腔扁平上皮癌における遺伝子変異の同定などについても明らかにすべく研究を推進してきた。また、硬組織疾患ゲノムセンターとの密接な学内連携のもと、これらのバイオリソースを用いた分子・細胞・組織・個体すべてのレベルにおける分子メカニズムの解明、顎顔面疾患の新たな診断から外科的治療法の開発を目指した系統的研究基盤の整備をすすめている。

6）英文原著論文

1. Gutwald R, Haberstroh J, Stricker A, Rüther E, Otto F, Xavier SP, Oshima T, Marukawa E, Seto I, Enomoto S, Hoogendijk CF, Schmelzeisen R, Sauerbier S: Influence of rhBMP-2 on bone formation and osseointegration in different implant systems after sinus-floor elevation. An in vivo study on sheep. J Craniomaxillofac Surg. 38（8）:571-579, 2010.
2. Harada H, Omura K: Preoperative concurrent chemotherapy with S-1 and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity: Phase I trial. J Exp Clin Cancer Res. 29:33, 2010.
3. ◎Higuchi Y, Kabasawa Y, Sato M, Kikuchi T, Aoki K, Ohya O, Maruoka Y, Omura K: Effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone formation in rabbit mandibular distraction models using β-tricalcium phosphate. Congenit Anom. 50（2）:95-104, 2010.
4. Hirai H, Omura K, Harada H, Tohara H: Sequential evaluation of swallowing function in patients with unilateral neck dissection. Head Neck. 32（7）:896-904, 2010.
5. ◎Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita KI, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A: Roles of interleukin-6 and parathyroid

hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers. Significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. Am J Pathol. 176（2）:968-980, 2010.
6. Miyazaki H, Omura K, Kakizaki H: Orbital approach via swinging eyelid procedure. Asian J Oral Maxillofac Surg 22（1）:17-19, 2010.
7. Mochizuki Y, Omura K, Kaneoya A, Kayamori K, Yamaguchi A: Osteonecrosis of the mandible associated with bisphosphonate therapy: report of a case with surgical intervention. Oral Surgery. 2:153-157, 2010.
8. Mochizuki Y, Omura K, Sakamoto K, Nakanishi S, Satoh K, Marukawa E, Yamaguchi A: A case of primary combined neuroendocrine carcinoma with squamous cell carcinoma in the upper gingiva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 109（4）:e34-e39, 2010.
9. Mochizuki Y, Omura K, Harada H, Kayamori K, Okada N, Yamaguchi A: Malignant fibrous histiocytoma of the jaws: A report of 3 cases. Asian J Oral Maxillofac Surg. 22（3）:143-147, 2010.
10. Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, Yao S, Tsushima F, Narazaki H, Anand S, Liu Y, Strome SE, Chen L, Tamada K: B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. Blood. 116:1291-1298, 2010.
11. ◎Prapinjumrune C, Morita K, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K:DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 39（7）:525-532, 2010.
12. Ritprajak P, Hashiguchi M, Tsushima F, Chalermsarp N, Azuma M: Keratinocyte-associated B7-H1 directly regulates cutaneous effector CD8+T cell responses. J Immunol. 184: 4918-4925, 2010.
13. ◎Uekusa M, Omura K, Nakajima Y, Hasegawa S. Harada H, Morita KI, Tsuda H: Uptake and kinetics of 5-aminolevulinic acid in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 39（8）:802-805, 2010.

7）総説ならびに著書

総説

1. 丸川恵理子、小村　健: 骨再生療法に用いる分化・増殖因子および足場の現状. クインテッセンス・デンタル・インプラントロジー―　4:61-70, 2010.
2. 根岸綾子、尾野雅哉、増田万里、小村　健、山田哲司: 口腔癌のプロテオーム解析. 病理と臨床　28（5）:506-511, 2010.

著書

1. 小村　健: 口腔癌取扱い規約　日本口腔腫瘍学会編　共著　金原出版　2010年1月
2. 小村　健: 再建部位別の標準的な皮弁手術 下顎再建形成外科診療プラクティス　191-195頁　文光堂　2010年4月
3. 小村　健: こんな事故が起こったら　ポケットブック　トラブルVSリカバリー 抜歯時に対合歯を損傷させた 40-41頁 抜歯後・小手術後、血がとまらない 42-43頁 デンタルダイヤモンド社　2010年9月
3. 小村　健: 家庭医学大全科　六訂版　頬粘膜がん 1591-1593頁　舌がん 1598-1600頁　顎骨腫瘍 1607-1608頁　法研　2010年

8）平成22年度までの自己評価

平成15年度より開始の21世紀COEプログラム「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」において形成した研究基盤をさらに発展させ、硬組織領域における教育、研究、臨床については世界的にトップレベルの優れた実績を上げ、一方、特別教育研究経費による「硬組織疾患ゲノムセンター」との密なる連携を図りつつ、口腔扁平上皮癌などの口腔外科学領域における悪性腫瘍を中心とした硬組織疾患のテーラーメイド医療の実現とともに、トランスレーショナル・リサーチへの発展を視野にいれた研究が展開できた。

9）和文原著論文

1. 小村　健、原田浩之、島本裕彰: 遊離血管柄付き骨による下顎再建. 日本口腔腫瘍学会誌　22（2）:61-68, 2010.
2. 北村良平、川元龍夫、宮本　順、樺沢勇司、小村　健、黒原一夫、天笠光雄、森山啓司: 馬蹄形骨切り併用Le Fort I 型骨切り術と下顎枝矢状分割術を施行した骨格性下顎前突症例の術後の形態変化について. 日本顎変形症学会雑誌　20（3）:211-219, 2010.
3. 工藤雅範: 舌癌手術症例における構音・咀嚼機能の経時的変化. 口腔病学会雑誌 77（1）:27-34, 2010.
4. 栗林悠里、櫻井仁享、伊東大典、小村　健: 口腔粘膜に初発した尋常性天疱瘡10例の臨床的検討. 日本口腔外科学会雑誌　56（3）:189-193, 2010.
5. 高　楠旻、櫻井仁享、小村　健: 骨破壊を伴った放線菌性下顎骨骨髄炎の1例. 日本口腔外科学会雑誌 56（2）:90-94, 2010.
6. 島本裕彰、小村　健: 当科における血管柄つき肩甲骨皮弁による下顎再建. 日本口腔腫瘍学会誌 22（4）:122-127, 2010.
7. 原田浩之、小村　健: 上顎歯肉・硬口蓋扁平上皮癌の治療. 頭頸部癌　36（4）:383-387, 2010.

8. 平井秀明、三澤常美、河西八郎、小山敏雄: 下唇に発生した血管平滑筋腫の1例　口腔領域報告例の臨床病理学的検討. 山梨県立中央病院年報　36:67-70, 2010.
9. 本田　綾、馬場祥行、片岡恵一、鈴木聖一、森田圭一、小村　健、森山啓司: Le Fort I 型骨切り術により幅の広い顎裂を閉鎖した成人片側性口唇口蓋裂の1症例. 日本顎変形症学会雑誌　20（3）:258-265, 2010.
10. 丸川恵理子、吉田文彦、宮崎英隆、櫻井仁亨、石井良昌、小村　健: 口腔内に初発症状を呈した急性骨髄性白血病の3例. 日本口腔外科学会雑誌　56（5）:323-327, 2010.
11. 森田圭一、菊池　剛、今泉史子、根岸綾子、辻美千子、小村　健: 新規創内固定型上顎骨延長装置を用いて治療した両側唇顎口蓋裂術後上顎後退症の1例. 日本口腔外科学会雑誌　56（7）:450-454, 2010.

10）学会発表（英文）

1. Kabasawa Y, Sato M, Kikuchi T, Sato Y, Higuchi Y, Takahashi Y, Omura K: Analysis of postoperative clinical results of BSSRO by monocortical fixation using locking plate fixation - Comparison with bicortical screw fixation. XX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. September 14-17 2010. Bruges, Belgium
2. Tanaka K, Harada H, Nakajima Y, Ikuta M, Shimamoto H, Tomioka H, Kaneoya A, Omura K: A clinicopathological study of intraoral minor salivary gland carcinomas. 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. November 25-28 2010. Kuala Lumpur, Malaysia

11）学会発表（和文）

1. 礒部　薫、森田　圭一、菊池　剛、小村　健: 治療方針に苦慮したエナメル上皮線維腫の1例. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
2. 島田泰如、森田圭一、菊池　剛、中川　聡、栗林悠里、田口貴英、小村　健: 基底細胞母斑症候群14例の臨床的検討. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
3. 田口貴英、森田圭一、菊池　剛、角倉可奈子、島田泰如、小村　健: 過去9年間に当科で経験した角化嚢胞性歯原性腫瘍93例の臨床的検討. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
4. 富岡寛文、釘本琢磨、金親あや乃、田中香衣、島本裕彰、生田　稔、中島雄介、原田浩之、小村　健: 治療前の外科処置が下顎歯肉扁平上皮癌に与える影響. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月28-29日　東京
5. 花畑泰子、中島雄介、森田圭一、栢森　高、小村　健: EGFR の kinase independent pathway における SGLT1の発現解析. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
6. 平井秀明、三澤常美、河西八郎: 下唇に発生した血管平滑筋腫の1例. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月28-29日　東京
7. 望月裕美、小村　健、坂本　啓、中西正一、丸川恵理子、佐藤　潔、山口　朗: 上顎歯肉に発生した扁平上皮がんへの分化を伴う神経内分泌がんの1例.第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
8. 吉本光洋、森田圭一、小村　健: 経過観察中に癌化した口腔白板症19例の検討. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月27-29日　東京
9. 小村　健: 口腔癌治療の現況と課題. 第3回硬組織疾患ゲノムセンターシンポジウム　2010年2月16日　東京
10. 森田圭一、伊東大典、小村　健: 口腔癌における先端的診断法開発のための分子基盤解析の変遷. 第3回硬組織疾患ゲノムセンターシンポジウム　2010年2月16日　東京
11. 田中香衣、金親あや乃、富岡寛文、島本裕彰、生田　稔、中島雄介、原田浩之、小村　健: T1、T2舌癌手術症例の検討. 第34回日本頭頸部癌学会総会　2010年6月10-11日　東京
12. 富岡寛文、釘本琢磨、金親あや乃、田中香衣、島本裕彰、生田　稔、中島雄介、原田浩之、小村　健: 治療前に外科処置が行われた上・下顎歯肉扁平上皮癌の検討. 第34回日本頭頸部癌学会総会 2010年6月10-11日　東京
13. 樺沢勇司、佐藤　昌、菊池　剛、佐藤百合子、樋口佑輔、松本佳奈子、小村　健: 上下顎移動術を行った鎖骨頭蓋異形成症の1例. 第20回日本顎変形症学会総会　2010年6月15-16日　札幌市
14. 佐藤　昌、菊池　剛、樺沢勇司、佐藤百合子、樋口佑輔、高橋由貴子、小村　健: 上顎移動術術後の鼻腔通気度の検討. 第20回日本顎変形症学会総会　2010年6月15-16日　札幌市
15. 菊池　剛、森田圭一、松川　祥、樺沢勇司、佐藤　昌、小村　健: Le Fort I 型骨切り術後に皮下気腫を生じた1例. 第189回日本口腔外科学会関東地方会　2010年6月19日　下都賀郡

16. 小村　健、原田浩之、島本裕彰: 口腔癌の咽頭後リンパ節転移例の検討. 第64回日本口腔科学会総会　2010年6月24-25日　札幌市
17. 大迫利光、小村　健、原田浩之: 下唇粘膜部に発生した筋上皮癌の1例. 第64回日本口腔科学会総会　2010年6月24-25日　札幌市
18. 生田　稔、樺沢勇司、森田圭一、小村　健: 下顎骨関節突起骨折の予後に関する臨床的検討. 第12回日本口腔顎顔面外傷学会総会　2010年7月17日　広島市
19. 栗林悠里、森田圭一、吉本光洋、松本佳奈子、津島文彦、佐藤　昌、小村　健: 口腔白板症の切除後再発に関する臨床病理学的検討. 第20回日本口腔粘膜学会総会　2010年7月31-8月1日　枚方市
20. 中川　聡、高　楠旻、角倉可奈子、依田　泰、塚原宏泰、宮村壽一、森田　伸、小村　健: 下顎頭に発生した内軟骨腫の1例. 第23回日本顎関節学会総会　2010年7月24-25日　東京
21. 木下淳博、大谷啓一、荒木孝二、吉田直美、小長谷光、樺沢勇司、大山　篤、近藤圭子、須永昌代、和達礼子、中村輝保: コンピュータシュミレーション教育システムによる診療模擬実習の展開. 平成22年度ICT利用による教育改善研究発表会　2010年8月7日　東京
22. 大山　篤、須永昌代、樺沢勇司、荒木孝二、俣木志朗、木下淳博: 医歯学シュミレーション教育システムの概要. 日本テスト学会第8回大会　2010年8月31日　東京
23. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta F, Imoto I, Omura K, Inazawa J: Functional screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer cell lines. 第69回日本癌学会学術総会　2010年9月22-24日　大阪市
24. 猪俣謙次、丸川恵理子、高橋幸伸、大林尚人、小村　健: 頬側裂開を伴う顎骨欠損にβ - リン酸三カルシウム（β-TCP）を応用した歯槽堤保存法の検討. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
25. 上杉篤史、森田圭一、小村　健: 機能的スクリーニングによる口腔癌関連新規癌抑制遺伝子型microRNAの検索. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
26. 樺沢勇司、今泉史子、田口貴英、丸川恵理子、栢森　高、岡田憲彦、小村　健: 疼痛および病変の拡大を繰り返した多発性の下顎骨筋線維芽細胞性腫瘍の1例. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16日　千葉市
27. 工藤雅範、津島文彦、堀　大樹、根岸綾子、持田薫利、石井良昌: 関節リウマチ患者の下顎歯肉より肺に転移したメソトレキセート誘発悪性リンパ腫の1例. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
28. 中島雄介、小村　健: 当科におけるビスフォスフォネート系薬剤関連顎骨壊死患者の治療概要. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
29. 丸川恵理子、礒部　薫、畠山一朗、小村　健: 歯牙移植における予後因子の臨床的検討. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
30. 森田圭一、松川　祥、根岸綾子、今泉史子、小村　健: 片側性唇顎口蓋裂患者における顎矯正手術の必要性の予測. 第55回日本口腔外科学会総会　2010年10月16-18日　千葉市
31. 田中香衣、原田浩之、中島雄介、生田　稔、島本裕彰、富岡寛文、金親あや乃、小村　健: 小唾液腺癌37例の臨床病理学的検討. 第48回日本癌治療学会総会　2010年10月28-30日　京都市
32. 原田浩之、中島雄介、生田　稔、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、金親あや乃、小村　健: 口腔扁平上皮癌のpN別の治療成績. 第48回日本癌治療学会総会　2010年10月28-30日　京都市
33. 丸川恵理子、猪俣謙次、高橋幸伸、小村　健: β - リン酸三カルシウムを用いた頬側裂開を伴う抜歯窩歯槽堤保存法の検討. 第8回日本再生歯科医学会総会　2010年10月29-30日　名古屋市
34. 丸川恵理子、小村　健: 血漿の骨再生における影響について―in vitro, in vivoによる検討.　第2回PRP（多血小板血漿）療法研究会　2010年11月7日　大阪市
35. 工藤雅範、根岸綾子、持田薫利、石井良昌: 病院紹介. 第4回神奈川県歯科医師会・口腔外科学術集会　2010年11月14日　横浜市
36. 高橋幸伸、丸川恵理子、猪俣謙次、小村　健: 新規材料β-リン酸三カルシウム/コラーゲン複合体を用いたイヌ抜歯窩における歯槽堤保存法の検討. 第14回日本顎顔面インプラント学会総会　2010年12月4-5日　浦安市

12）受賞

1. 丸岡　豊、今井英樹、小村　健: 第55回日本口腔外科学会　優秀口演発表賞　2010年10月16-18日　「ケモカイン受容体異常に起因する骨軟骨代謝異常と進行性下顎頭吸収に関する研究」
2. 大山　篤、須永昌代、樺沢勇司、荒木孝二、俣木志朗、木下淳博: 日本テスト学会大会発表賞　2010年11月

20日受賞 「医歯学シミュレーション教育システムの概要」

13）外部資金の獲得状況

1. 日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究C
「ナノサイズパーティクルを用いた口腔癌レセプターターゲティングDDSの開発」
研究代表者:中島雄介
期間:平成22-24年度
130万円-110万円-80万円
2. 日本学術振興会科学研究費補助金・基盤研究C
「難治性口腔粘膜疾患における免疫抑制分子の解析と新規制御法開発のための基礎的研究」
研究代表者:津島文彦
期間:平成20-22年度
170万円-143万円-80万円
3. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究B
「ビスフォスフォネート長期投与による骨髄炎モデルの確立とその骨代謝機構に対する解明」
研究代表者:今泉史子
期間:平成20-23年度
140万円-90万円-50万円-50万円
4. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究B
「パラフィン包埋組織からのプロテオーム解析による新規口腔がんマーカーの開発」
研究代表者:根岸綾子
期間:平成22-23年度
160万円-140万円
5. 日本学術振興会科学研究費補助金・若手研究B
「新規免疫療法の確立を目指した口腔癌患者に誘導されている多能性免疫担当細胞の解析」
研究代表者:田中香衣
期間:平成21-24年度
70万円-70万円-70万円-80万円
6. 共同研究費　オリンパス株式会社
「機能性生体材料の顎口腔外科分野での応用検討」
研究代表者:小村　健
平成21年10月01日から平成23年9月30日
250万円+735万円
7. 受託研究費　オリンパステルモバイオマテリアル株式会社
「新規材料β-リン酸三カルシウム/コラーゲン複合体の抜歯窩への応用」
研究代表者:小村　健
平成21年09月25日から平成22年12月31日
475万円
8. 厚生労働科学研究費補助金
「進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究」
研究分担者:小村　健
平成22年度
100万円

14）特別講演、招待講演、シンポジウム

講演

1. Omura K: Mandibular reconstruction - scapular bone subscapular artery system flaps. AOCMF Focused Seminar on Distraction Bone in Reconstruction of Jaws.　2010年2月13-14日　東京
2. Marukawa E, Omura K:　Autogenous, alloplastic and bone substitutes and cytokines. AOCMF Focused Seminar on Distraction Bone in Reconstruction of Jaws.　2010年2月13-14日　東京
3. 小村　健: 口腔癌、前癌病変の診断と治療. 第1回日本頭頸部癌学会教育セミナー　2010年6月9日　東京
4. 小村　健: がん診療ガイドライン　口腔がん. 第11回臨床腫瘍夏期セミナー　2010年7月22日　東京
5. 小村　健: 口腔癌におけるセンチネルナビゲーション手術. 岩手医科大学　2010年9月3日　盛岡市

シンポジウム

1. 島本裕彰、原田浩之、小村　健: 当科における血管柄つき肩甲骨皮弁による下顎再建. 第28回日本口腔腫瘍学会総会　2010年1月28-29日　東京
2. 森田圭一、佐藤　豊、馬場祥行、飯田敏朗、壬生美智子、福山英治、立川敬子、吉増秀實、天笠光雄、森山啓司、谷口　尚、小村　健: 両側唇顎口蓋裂の二次症例に対する東京医科歯科大学歯学部附属病院CLP合同カンファレンスによる対応. 第34回日本口蓋裂学会総会　2010年5月27-28日　東京
3. 原田浩之、小村　健: 上顎歯肉・硬口蓋癌の治療. 第34回日本頭頸部癌学会総会　2010年6月10-11日　東京

15）主催学会

学会・研究会・講演会の主催

1. 第28回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2010年1月27-29日　東京
2. AOCMF Focused Seminar on Distraction Bone in Reconstruction of Jaws 2010年2月13-14日　東京
3. 第6回 紹介医のための口腔外科セミナー　2010年5月30日　東京
4. C.E.D. 日常診療に活かす口腔外科の知識と基本 2010年7月11日、22日　東京
5. 第7回 紹介医のための口腔外科セミナー　2010年11月14日　東京

16）新聞、雑誌、TV報道

雑誌

1. 暮らしと健康 2010年7月号　保健同人社　口唇粘液のう胞　76頁
2. NHK きょうの健康　2010年8月号　日本放送出版協会　舌の痛みが治りません　127頁

新聞・雑誌

1. どうしました　鼻の横に歯が残る 朝日新聞　2010年3月5日　朝刊
2. 体とこころの通信簿　親知らず 朝日新聞　2010年7月5日　夕刊

17）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

教　授　小村　健

講　師　原田浩之, 中島雄介

助　教　生田　稔, 樺沢勇司, 島本裕彰, 丸川恵理子, 佐藤　昌, 森田圭一（～3月）, 宮崎英隆（～3月）, 田中香衣（4月～）, 富岡寛文（4月～）

硬組織疾患ゲノムセンター特任講師　伊東大典（～3月）, 森田圭一（4月～）

大学院生　花畑泰子（～3月）, 上杉篤史, 猪俣謙次, 松本佳奈子, 釘本琢磨, 佐藤　潔, 高橋幸伸, 吉本光洋, 大迫利光, 島田泰如, 畠山一朗, 松川　祥, 田口貴英, 山本信祐,高橋由貴子, 白川順平（4月～）, 木村　敦（4月～）, プラディット・ルシャタムカヤヌント（4月～）

Congenital Anomalies
THE JAPANESE TERATOLOGY SOCIETY
doi:10.1111/j.1741-4520.2010.00272.x
Congenital Anomalies 2010; **50**, 95–104

ORIGINAL ARTICLE

Effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone formation in rabbit mandibular distraction models using β-tricalcium phosphate

Yusuke Higuchi[1], Yuhji Kabasawa[1], Masaru Sato[1], Tsuyoshi Kikuchi[1], Kazuhiro Aoki[2], Keiichi Ohya[2], Yutaka Maruoka[3], and Ken Omura[1,4]

[1]Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Sciences, [2]Pharmacology, Department of Hard Tissue Engineering, Division of Bio-Matrix, Graduate School, and [4]Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, and [3]Division of Dentistry and Oral Surgery, Toyama National Hospital, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

ABSTRACT **This study was designed to evaluate the effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) on the amount and period of new bone formation in rabbit mandibular distraction models using β-tricalcium phosphate (β-TCP) as a bone graft substitute. Sixteen male Japanese White rabbits were divided into the following four experimental groups: 1, distraction alone; 2, distraction with β-TCP granules; 3, distraction with rhFGF-2 (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; and 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules. The bones were harvested at 4 weeks after the operation and examined using soft radiography, micro-computed tomography (micro-CT), and peripheral quantitative computed tomography (pQCT). The dissected mandibles were stained using the Villanueva bone staining method, and the amount of new bone formed, bioresorption of β-TCP, and new blood vessel formation were morphometrically calculated using bone histomorphometry. Radiopaque areas were observed more frequently in the distracted area of groups 3 and 4. Micro-CT analysis revealed partial new bone formation in the central region of the distracted area in groups 3 and 4. pQCT analysis revealed increased bone mineral density in groups 3 and 4. Histomorphometric analysis revealed increased newly formed bone and blood vessel areas in groups 3 and 4. In group 4, the number of osteoclasts around the β-TCP granules had significantly increased. The present findings suggested that the combined use of rhFGF-2 and β-TCP reduced the treatment period for distraction osteogenesis and accelerated the formation of a new high-quality bone.**

Key Words: β-TCP, bone formation, distraction osteogenesis, rabbit mandible, RhFGF-2

INTRODUCTION

Distraction osteogenesis was first reported as a technique for limb lengthening in 1952 by Ilizarov (mentioned in Ilizarov 1989), and more recently, McCarthy *et al*. (1992) reported the first clinical case of mandibular distraction using an extraoral device. Mandibular bones contain fewer bone marrow cells than long bones; therefore, it is crucial to assess vascularization, mineralization, and the overall healing process in the case of mandibular deformities.

Mandibular distraction has been widely applied in the treatment of severe congenital mandibular hypoplasias (Pradel *et al*. 2009; Sadakah *et al*. 2009); for example, Pierre Robin syndrome is a congenital facial abnormality in humans that is characterized by an unusually small mandible. The most important medical problems faced by individuals with such abnormality are difficulties in breathing and swallowing. In some cases, distraction osteogenesis can be effectively used to move the jaw forward to overcome the upper airway obstruction caused by the positioning of the tongue.

Sagittal split ramus osteotomy (SSRO) is one of the most commonly used methods for surgical correction of mandibular deformities, but distraction osteogenesis offers the following advantages. First, the operation stress is lesser in distraction osteogenesis than in SSRO; second, bone distraction allows the soft tissue around the distracted region to expand.

Distraction osteogenesis also has major clinical disadvantages, such as the requirement of a long treatment period, the risk of poor bone formation when used for large-scale lengthening, and the delay in callus maturation and bone healing. The process of distraction osteogenesis is generally divided into the following three phases: latency, distraction, and consolidation. Long-term distraction and consolidation can result in complications, such as pin infection and bone infection and can also cause psychological problems (Primrose *et al*. 2005; Kanellopoulos and Soucacos 2006).

There are various methods for promoting bone formation in distraction osteogenesis; these include the use of ultrasound, shockwaves, hyperbaric oxygen, bone graft substitutes, growth factors, cytokines, and stem cells (Okazaki *et al*. 1999; al Ruhaimi 2001; Li *et al*. 2002; Narasaki *et al*. 2003; Uglow *et al*. 2003; Sakurakichi *et al*. 2004; Song *et al*. 2004; Luna Gonzalez *et al*. 2005; Eralp *et al*. 2007; Kim and Cho 2007; Abbaspour *et al*. 2008). To promote bone formation in distraction osteogenesis, bone graft substitutes are applied to the initial gap during the operation and to the lengthened bone after the completion of the distraction (al Ruhaimi 2001; Kim and Cho 2007; Wang *et al*. 2009). Highly purified β-tricalcium phosphate (β-TCP), a biodegradable material with prominent osteoconductive properties, is widely used clinically as a bone graft substitute. It has been applied to bone defects occurring after operative procedures such as bone tumor resection, bone fracture correction, and maxillary sinus floor augmentation (Ogose *et al*. 2002;

Correspondence: Yusuke Higuchi, DDS, Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Restitution, Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan. Email: yusuke-u.osur@tmd.ac.jp

Received November 18, 2009; revised and accepted January 3, 2010.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

Hirata *et al*. 2006; Ogose *et al*. 2006; Suba *et al*. 2006). β-TCP is superior to hydroxyapatite (HA) materials with respect to its early bioresorption by osteoclasts. Generally, the latter are not readily absorbed and remain in the body for a prolonged period as a foreign substance (Hoogendoorn *et al*. 1984). In contrast, β-TCP is efficiently absorbed and does not remain as a foreign substance in the body; it is therefore considered to be a suitable bone graft substitute in distraction osteogenesis. Wang *et al*. (2009) reported that the combined application of HA-TCP block and distraction osteogenesis to the tibia could reduce the treatment time and enhance bone consolidation in bone defect management, although the drawback was that HA remained in the body as a foreign substance. We speculated that the application of β-TCP might result in more effective bone formation during distraction osteogenesis of the mandibles.

Several authors have reported that growth factors or cytokines play important roles in the process of ossification during distraction osteogenesis (Okazaki *et al*. 1999; Cillo *et al*. 2000; Li *et al*. 2002; Yates *et al*. 2002; Abbaspour *et al*. 2008). One such growth factor is the recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2), which is a potent mitogen for bone cells such as osteoblasts and fibroblasts and can stimulate angioneogenesis. Okazaki *et al*. (1999) reported that a single-shot injection of rhFGF-2 promoted bone formation in a rabbit tibial distraction model. Moreover, rhFGF-2 is a component of the bone matrix and is involved in the regulation of bone remodeling (Power *et al*. 2002). Because it is necessary to establish a rich blood supply in the distracted area for promoting bone formation (Aronson 1994; Ohashi *et al*. 2005), we considered that the use of rhFGF-2 might promote both β-TCP bioresorption and bone formation. We hypothesized that a local injection of rhFGF-2 in combination with β-TCP would reduce the treatment periods of distraction and consolidation and improve the quality of the bone formed after distraction osteogenesis.

The present study was conducted to evaluate the effect of the combined administration of rhFGF-2 and β-TCP granules at the site of distraction osteogenesis on early bone consolidation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sixteen male Japanese White rabbits weighing between 3000 and 3500 g (20 weeks old) were used in this study. All study protocols were reviewed and approved by the Animal Research Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Anesthesia and surgical procedures

Surgical procedures were conducted as described by Sato *et al*. (2007) and Kunimori *et al*. (2007). The surgeries were performed using sterile techniques under general anesthesia induced by an intramuscular injection of 0.15 mL/kg medetomidine (Domitor; Meiji Seika Kaisya, Tokyo, Japan) and 0.5 mL/kg ketamine (Ketalar; Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan). In addition, 1.0 mL of a local anesthetic (2% lidocaine with adrenaline, 1:80 000) was injected at the surgical site. After a unilateral skin incision was made along the inferior border of the mandible, the periosteum was incised and the bone surface on the lateral side of the mandible was exposed. The distraction device (Intraoral Vertical Ramus Distractor; Medicon, Tuttlingen, Germany) was positioned parallel to the mandibular body and secured using self-tapping screws (Synthes cortical screws; diameter: 1.5 mm, length: 6 mm; Synthes Corp., Tokyo, Japan). A full-thickness osteotomy of the region immediately posterior to the mental foramen was performed using a reciprocating saw. The distraction device was activated to allow direct force transduction without any interference. We set the initial gap (i.e. the space to be filled with β-TCP) to 3 mm.

β-TCP granules

The β-TCP (OSferion) granules used in the present study were obtained from Olympus Biomaterial, Tokyo, Japan. β-TCP is a white porous material with an absorptive property (porosity, 75%; macropore size range, 100–400 μm). β-TCP granules weighing 0.05 g were tightly packed in the initial gap.

Recombinant human fibroblast growth factor-2

RhFGF-2 was obtained from Wako Pure Chemical, Osaka, Japan. It was dissolved in 50 μL of Tris-HCl and injected into the center of the initial gap filled with β-TCP granules using a 23 G needle. The injected rhFGF-2 subsequently infiltrated into the interstices between the β-TCP granules.

Distraction osteogenesis

The experimental animals were divided into the following four groups: group 1 ($n = 4$), in which the initial gap was left empty (control); group 2 ($n = 4$), in which the initial gap was filled with β-TCP granules; group 3 ($n = 4$), in which the initial gap was filled with β-TCP granules followed by a local injection of 25 μg/50 μL rhFGF-2; and group 4 ($n = 4$), in which the initial gap was filled with β-TCP granules followed by a local injection of 100 μg/50 μL rhFGF-2.

The schedule for the procedures performed in this study is shown in Figure 1.

Distraction commenced at a rate of 1 mm/day. On the basis of the latency period previously reported in rabbit mandibles, we considered that 4 or 5 days would be sufficient to induce substantial new bone formation and accordingly adopted a latency period of 4 days (Aida *et al*. 2003). Distraction was continued for 10 days, resulting in a final lengthening of 13 mm (Fig. 2). After the completion of

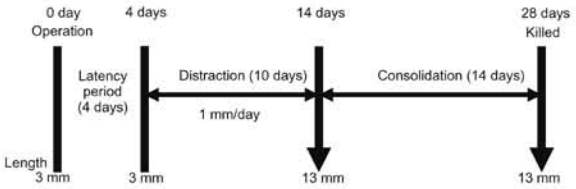


Fig. 1 Experimental design.

Fig. 2 Photograph of the distracted rabbit mandible using the distraction device.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

distraction, we monitored the animals for 2 weeks until consolidation of the lengthened bone was achieved. All the rabbits were killed by an overdose of pentobarbital at 4 weeks after the operation. Subsequently, the mandibles were removed and fixed in phosphate-buffered saline (PBS)-buffered glutaraldehyde (2.5%)–formaldehyde (4%) fixative (pH 7.4) for 7 days at 4°C. The fixed mandibles were subsequently washed with PBS for a day to remove any traces of the fixative and then used for radiological assessment, which was performed in accordance with Nagahama *et al*. (2004).

Radiographic studies

At 4 weeks after the operation, radiographs were obtained using a soft X-ray apparatus (Type SRO-M50; Sofron, Tokyo, Japan) in order to evaluate new bone formation at the distracted area.

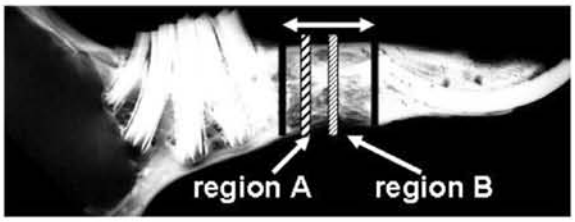


Fig. 3 Area analyzed by peripheral quantitative computed tomography (pQCT) and histomorphometry. pQCT analysis and histomorphometric measurements were performed on a 1.0-mm wide area in regions A and B (diagonal strips). Region A, distal bone edge; region B, center of the distracted area.

Micro-computed tomographic studies

New bone formation in the distracted area was assessed using a nondestructive measurement tool, the micro-computed tomography (CT) scanner (ScanXmate-E090; Comscan Tecno, Yokohama, Japan), with a voxel size of 70 mm/pixel. Tri/3D-Bon software (RATOC System Engineering, Tokyo, Japan) was used to generate a 3-D reconstruction from the obtained set of scans.

Peripheral quantitative computed tomography studies

For cross-sectional analyses, peripheral quantitative computed tomography (pQCT) (XCT Research SA+; Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) was used to analyze 1.0-mm thick slices. The bone mineral density (BMD) of the cortical and total bone areas of the cross-sectional area, excluding the root, was calculated. In this study, calcified tissue with a BMD greater than 267 mg/cm^3 was defined as the total bone area, and that with a BMD greater than 690 mg/cm^3 was defined as the cortical bone area (Louis *et al*. 1996). Region A in the scanned image shown in Figure 3 is a representation of the area between the distal bone edge and the center of the distracted area. Region B is the representation of the center of the distracted area. The mechanical properties of regions A and B were analyzed (Fig. 3).

Histology and histomorphometry

After radiological analysis, the mandibles were stained using the Villanueva bone staining method, dehydrated in graded solutions of ethanol, and embedded in methyl methacrylate resin. Undecalcified 30-μm thick histologic sections in the coronal plane were prepared. The sections were observed under a light microscope.

Histomorphometric measurements of regions A and B were performed in a 1-mm wide area using an image analyzing system (KS400; Carl Zeiss, Jena, Germany). The values of the histomorphometric parameters measured in this study are shown in Table 1

Table 1 Histomorphometric measurements, calculations, and abbreviations

	Abbreviation	Definition	Unit
Measured parameters			
Newly formed bone volume	NfB.V	Total newly formed bone area in the measured area	μm^2
Bone surface	BS	The perimeter of the newly formed bone area	μm
β-TCP area	β-TCP area	Total β-TCP area in the measured area	μm^2
Osteoclast surface	Oc.S	The perimeter of osteoclasts	μm
Osteoclast number	N.Oc	The number of osteoclasts	N
β-TCP surface	β-TCP surface	The perimeter of the β-TCP area	μm
Blood vessel area	Blood vessel area	Total blood vessel area in the measured area	μm^2
Tissue volume	TV	Total tissue volume in the measured area	μm^2
Calculated parameter			
The newly formed bone volume	NfB.V/TV	NfB.V/TV × 100	%
The newly formed bone thickness	NfB.Th	2 × NfB.V/BS	μm
The newly formed bone number	NfB.N	BS/(2 × TV)	N/mm
The newly formed bone separation	NfB.Sp	(1/NfB.N)-NfB.Th	μm
The β-TCP area	β-TCP area/TV	β-TCP area/TV × 100	%
The osteoclast surface	Oc.S/β-TCP surface	Oc.S/β-TCP surface × 100	%
The number of osteoclasts	N.Oc/β-TCP surface	N.Oc/β-TCP surface × 1000	N/mm
The blood vessel area	Blood vessel area/TV	Blood vessel area/TV × 100	%

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

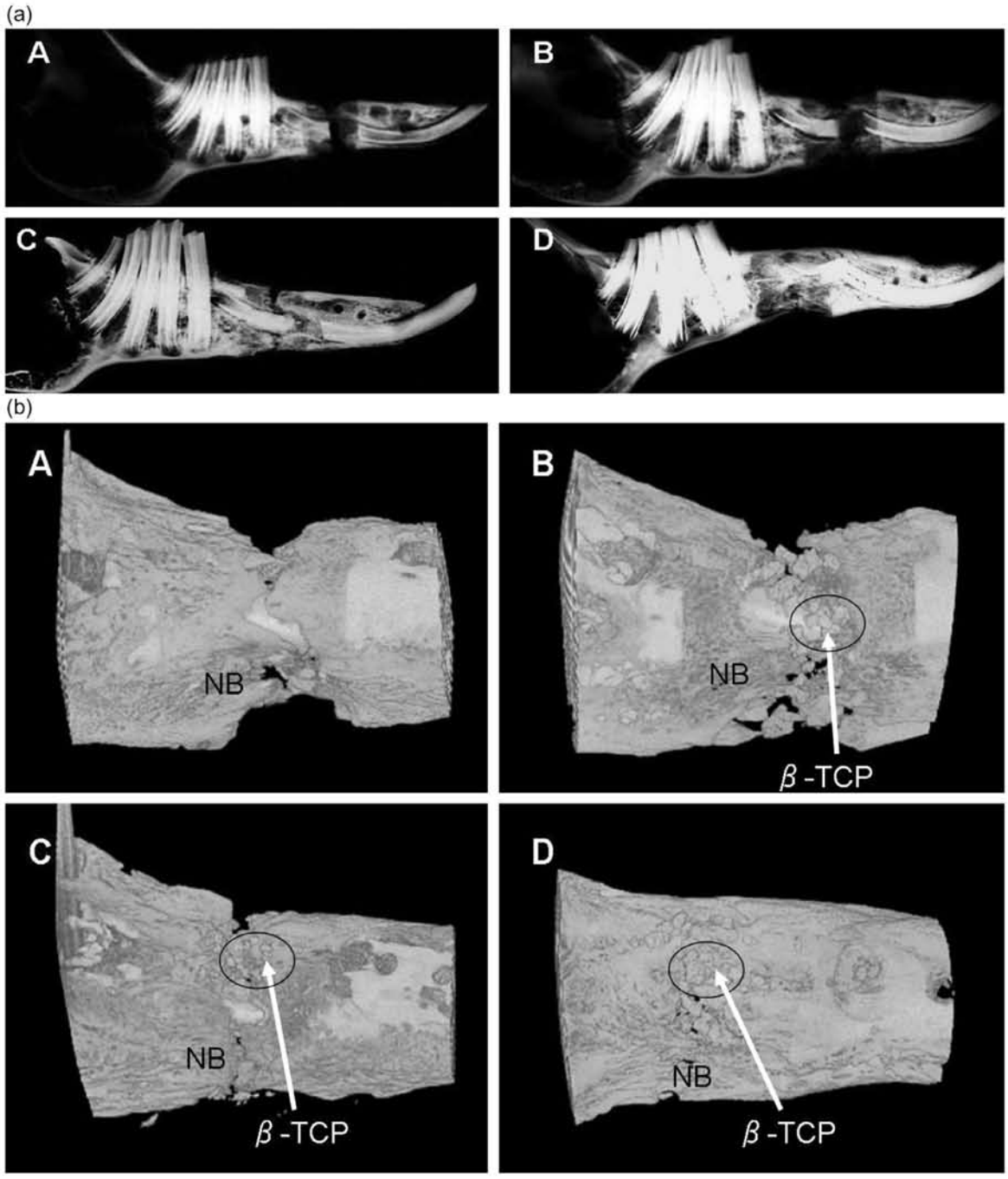


Fig. 4 (a) Radiographs obtained at 4 weeks after the operation. (A) Group 1, distraction alone; (B) group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; (C) group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; (D) group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules. The radiopacity in groups 3 and 4 was higher than that in groups 1 and 2. (b) Micro-computed tomography (micro-CT) images at 4 weeks after the operation. (A) Group 1, distraction alone; (B) group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; (C) group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; (D) group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules. In groups 2, 3, and 4, β-TCP granules were visible in the central region of the distraction area. The area of new bone in the distraction area was greater in groups 3 and 4 than in groups 1 and 2. NB, new bone; β-TCP, β-TCP granules.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

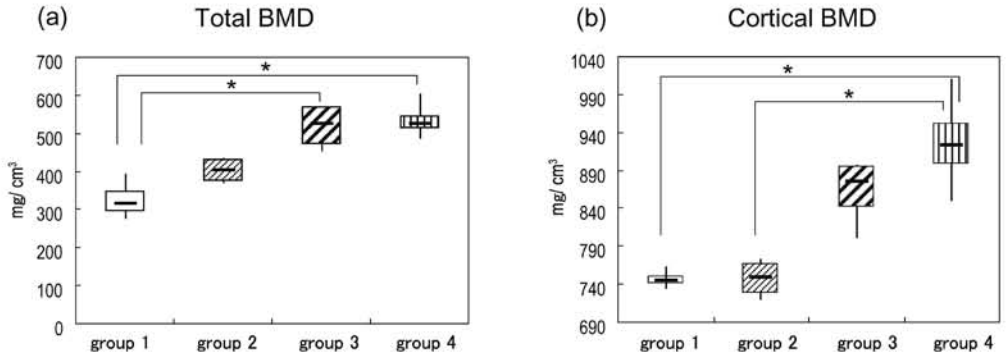


Fig. 5 Peripheral quantitative computed tomography (pQCT)-mediated measurements of total bone mineral density (BMD) (a) and cortical BMD (b) in region A at 4 weeks after the operation. $^*P < 0.05$. The total and cortical BMD in groups 3 and 4 were higher than those in group 1. Group 1, distraction alone; group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules.

(Parfitt *et al*. 1987; Noji *et al*. 2000). In region A, the following parameters were measured: the newly formed bone volume/tissue volume (NfB.V/TV: NfB.V/TV × 100, %), the newly formed bone thickness (NfB.Th: 2 × NfB.V/BS, μm), and the newly formed bone number (NfB.N: BS/[2 × TV], N/mm). We also measured the distance between the newly formed bones. It was termed as the newly formed bone separation (NfB.Sp: [1/NfB · N] − NfB.Th, μm). In region B, the following parameters were measured: the β-TCP area (β-TCP area/TV: β-TCP area/TV × 100, %), the osteoclast surface (Oc.S/β-TCP surface: Oc.S/β-TCP surface × 100, %), and the number of osteoclasts (N.Oc/β-TCP surface: N.Oc/β-TCP surface × 1000, N/mm). In both regions A and B, we measured the blood vessel area (blood vessel area/TV: blood vessel area/TV × 100, %).

Statistical analysis

All the values are represented as mean ± standard deviation (SD). Statistical significance was determined using a non-parametric one-way analysis of variance test (Kruskal–Wallis test), followed by multiple pairwise comparisons using Dunn's test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Radiographic findings

Figure 4a shows the soft X-ray scans of rabbit mandibles obtained at 4 weeks after the operation. In all the groups, bone formation progressed gradually from each side of the host bone. In groups 1 and 2, radiolucent areas were observed in the distracted area. In groups 3 and 4, radiopaque areas were observed in most of the distracted area, and their radiopacity was higher than that of groups 1 and 2.

Micro-computed tomographic findings

Figure 4b shows the micro-CT images at 4 weeks after the operation. In groups 2, 3, and 4, β-TCP granules were visible in the central region of the distracted area. In groups 3 and 4, although β-TCP granules were visible, the area of new bone in the distracted area was greater than that in groups 1 and 2.

pQCT studies

Figure 5 shows the BMD data for region A obtained by pQCT. There were no differences in the total and cortical BMD values between groups 1 and 2. The total BMD in groups 3 and 4 was higher than that in group 1, and the cortical BMD in group 4 was higher than that in groups 1 and 2. In region B, fibrous tissue or β-TCP granules were observed, and therefore, the total and cortical BMD in groups 2, 3, and 4 were higher than those in group 1 (data not shown).

Histological findings

Figure 6 shows the results of the histological analysis of region A. In all the groups, osteoblasts were observed around the new bone trabeculae. In groups 1 and 2, the new bone trabeculae extending in the direction of distraction were thin and immature, while those in groups 3 and 4 were wider and longer. The new bone trabeculae observed in group 4 were more mature than those in the other groups. In groups 3 and 4, many new blood vessels were observed around the new bone trabeculae.

Figure 7 shows the results of the histological analysis of region B. In group 1, the central region was filled with fibrous tissue consisting of collagen fibers. In contrast, in groups 2, 3, and 4, β-TCP granules were distributed over the entire central region. Osteoclasts were more frequently observed around the β-TCP granules in group 4 (Fig. 7D,E). In groups 3 and 4, many new blood vessels were observed around the β-TCP granules.

Histomorphometry

In region A, NfB.V/TV (Fig. 8A) was significantly higher in groups 3 and 4 than that in group 1. Compared to the NfB.Th of group 1 (Fig. 8B), those of groups 3 and 4 increased, with a significant increase in group 4. NfB.N (Fig. 8C) was significantly higher in groups 3 and 4 than in group 1. NfB.Sp (Fig. 8D) was significantly lower in groups 3 and 4 than in group 1. There were no significant differences between groups 1 and 2 with respect to NfB.V/TV (Fig. 8A), NfB.Th (Fig. 8B), NfB.N (Fig. 8C), and NfB.Sp (Fig. 8D). In region B, there were no significant differences

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

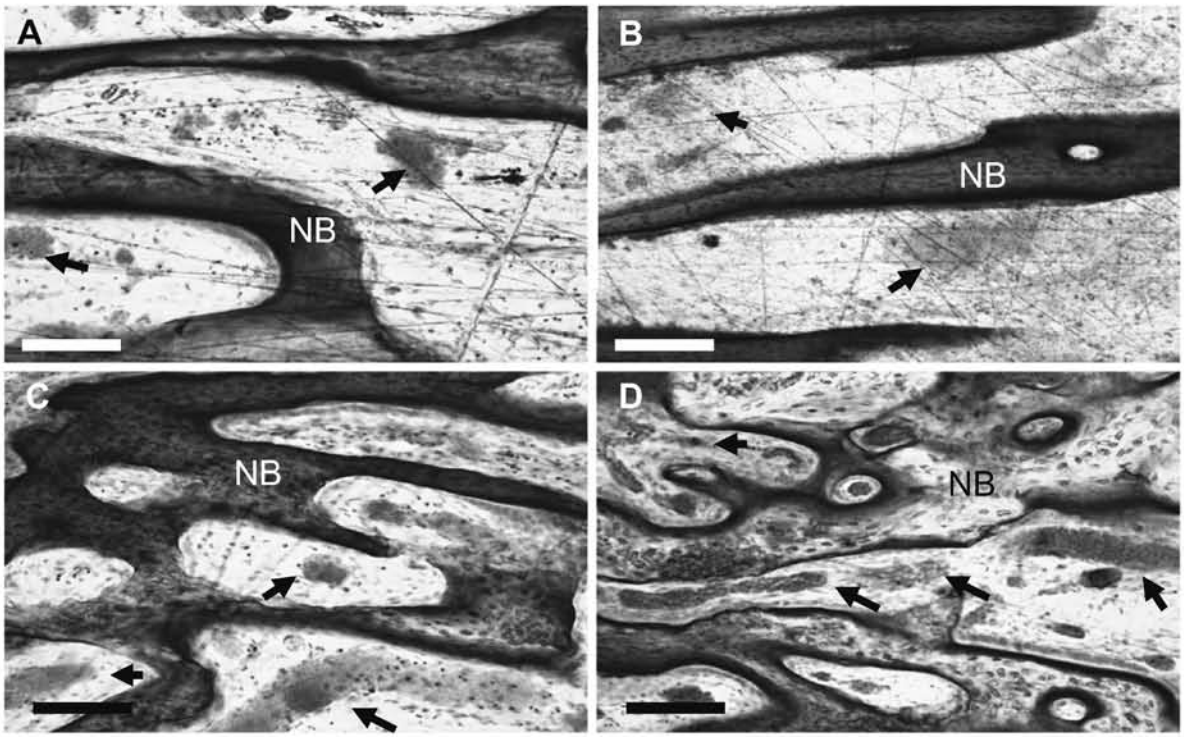


Fig. 6 Histological observations (Villanueva bone staining) in region A at 4 weeks after the operation. (A) Group 1, distraction alone; (B) group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; (C) group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; (D) group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules. The new bone trabeculae were wider and longer in groups 3 and 4 than in groups 1 and 2. Numerous blood vessels were observed in groups 3 and 4. Bar, 100 μm. NB, new bone. Arrows indicate blood vessels.

between the groups with respect to β-TCP area/TV (Fig. 9A). However, the Oc.S/β-TCP (Fig. 9B) and N.Oc/β-TCP surface (Fig. 9C) of groups 2 and 3 were significantly lower than those of group 4. Blood vessel area/TV (Fig. 10) showed a significant increase in group 4.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report on the combined use of β-TCP granules and rhFGF-2 for performing distraction osteogenesis of mandibles. When β-TCP was used alone, new bone formation was not prominently observed, and some β-TCP granules remained in the central region of the distracted area (Figs 4b,7).

RhFGF-2 slightly facilitated the bioresorption of β-TCP, although the effect was not significant. Moreover, administration of 100 μg of rhFGF-2 markedly increased the number of osteoclasts compared to that when 25 μg of rhFGF-2 was administered (Fig. 9).

RhFGF-2 has been used for various purposes in the treatment of fractures and bone defects, as well as in distraction osteogenesis (Bland *et al*. 1995; Kato *et al*. 1998; Okazaki *et al*. 1999; Abbaspour *et al*. 2008). Information on rhFGF-2 dosage and duration of administration is highly valuable because these factors are important aspects for considering rhFGF-2 for clinical purposes. Bland *et al*. (1995) reported that 3 μg of rhFGF-2 injected around the fracture site in rabbit tibiae did not have any beneficial effects, whereas Kato *et al*. (1998) injected different doses (50, 100, 200, and 400 μg) of rhFGF-2 in the form of saline into a segmental bone defect in rabbits and documented enhanced healing of the defect when doses of more than 100 μg of rhFGF-2 were used. Okazaki *et al*. (1999) demonstrated that a single local injection of 200 μg rhFGF-2 after the completion of distraction stimulated new bone formation in rabbit tibia and suggested that this might reduce the consolidation period. However, Abbaspour *et al*. (2008) reported that continuous local injection of rhFGF-2 (14.28 μg/day) during the consolidation period of tibial distraction in rabbits stimulated bone healing during either the latency period or the distraction period, but had only a small overall effect on bone healing.

Currently, the rabbit model of mandibular distraction is considered to be a well-established one (Al-Sebaei *et al*. 2005). The rabbit model has been found to be appropriate for studying human bone physiology because the patterns of bone accretion and peak bone mass profiles of rabbits are similar to those of humans (Norris *et al*. 2001). However, whereas most studies on distraction osteogenesis in rabbits have been performed on the tibia or other long bones, we focused on rabbit mandibles to elucidate the effect on the bone

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

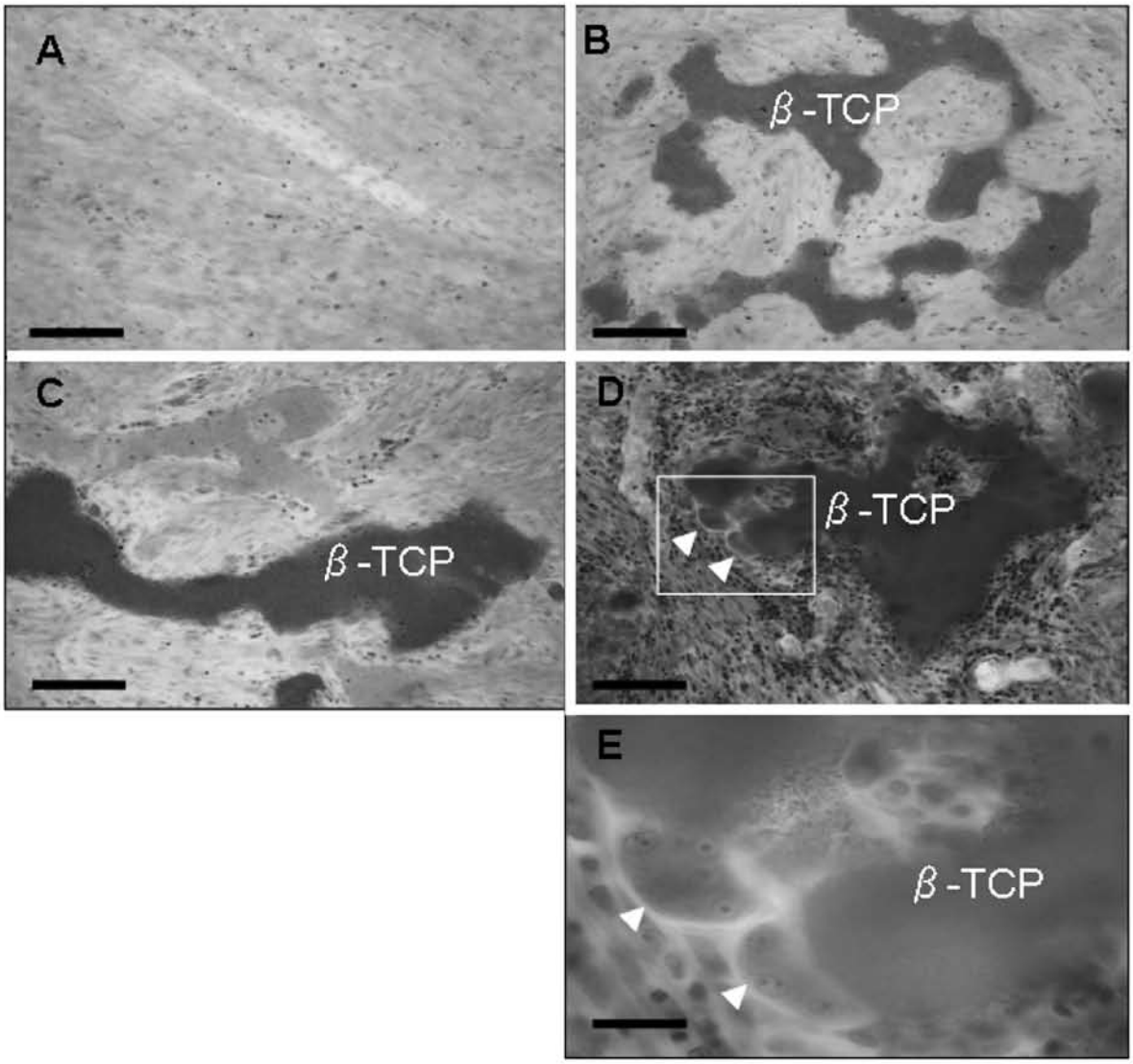


Fig. 7 Histological observations (Villanueva bone staining) in region B at 4 weeks after the operation. (A) Group 1, distraction alone; (B) group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; (C) group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; (D) group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules. (E) Higher magnification of the rectangular area in Figure 7D. In groups 2, 3, and 4, β-TCP granules were observed. In group 4, osteoclasts were frequently observed around β-TCP granules. Scale bars in Figure A–C, and D represent 100 μm. Bar in Fig. E, 25 μm. β-TCP, β-TCP granules. Arrowheads indicate osteoclasts.

healing process after distraction osteogenesis, with the hope that this procedure might be useful in correcting maxillofacial deformities in humans.

We performed an acute distraction for an initial 3-mm gap in the mandibles. This is a typical clinical procedure and has been reported by Kawashima (2003).

Abbaspour *et al*. (2008) mentioned that it was essential to assess the nature of the rhFGF-2 carrier because a low dose of rhFGF-2 (14.28 μg/day), administered during either the latency period or distraction period, might rapidly leak into the surrounding tissue. Moreover, Kato *et al*. (1998) reported that only less than 10% of rhFGF-2 remained at the injected site at 24 h after the injection.

In contrast, Tohyama *et al.* (2004) reported that 40 μg rhFGF-2 atherocollagen sponge complex applied at the time of operation accelerated new bone formation. Because the beneficial effect of rhFGF-2 was observed at a lower dose in our study than that reported by Tohyama *et al*. we speculated that the combined administration of rhFGF-2 and β-TCP, which was used as a

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

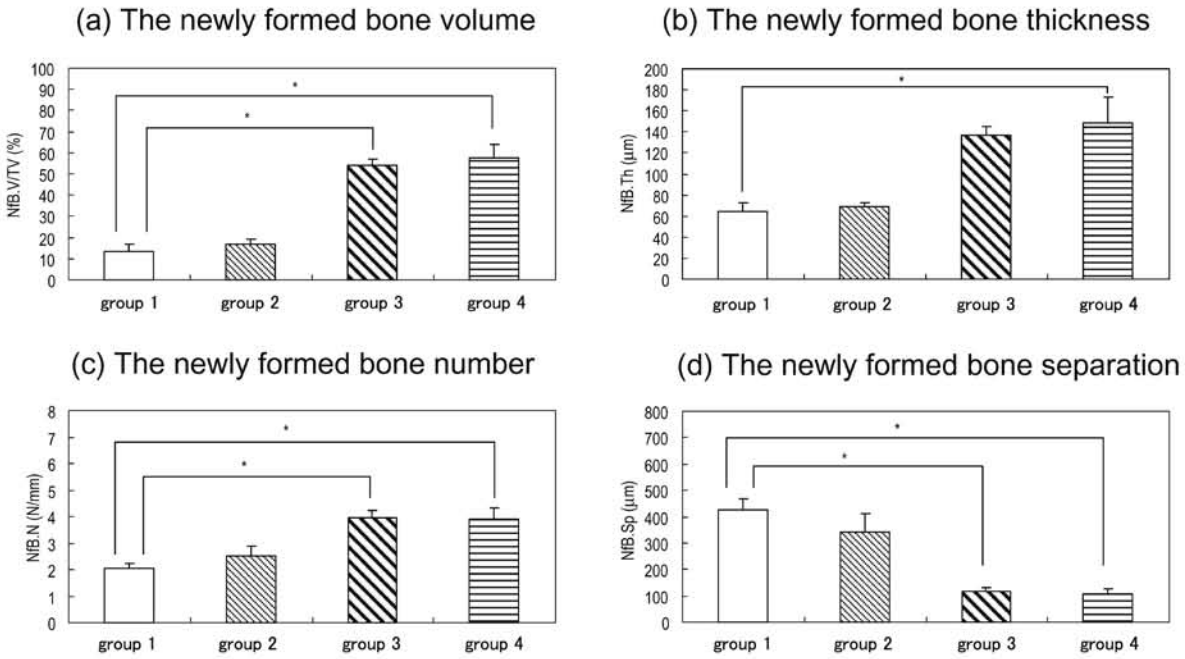


Fig. 8 Histomorphometric analysis of region A at 4 weeks after the operation. (a) The newly formed bone volume (NfB.V/TV). (b) The newly formed bone thickness (NfB.Th). (c) The newly formed bone number (NfB.N). (d) The newly formed bone separation (NfB.Sp). $*P < 0.05$. In groups 3 and 4, NfB.V/TV, NfB.Th, and NfB.N had increased, whereas NfB.Sp had decreased. Group 1, distraction alone; group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules.

scaffold, might reduce the amount of and delay the duration of leakage into the surrounding tissue.

In this study, rhFGF-2 was injected locally on the day of operation, and a low dose of 25 μg was sufficient to stimulate bone formation after mandibular distraction (Fig. 8). Moreover, high-dose local injection of rhFGF-2 (100 μg) effectively accelerated bone maturation (Figs 5,6). Although the optimal dosage of rhFGF-2 for mandibular distraction has not yet been established, we showed that it is possible to promote new bone formation using a low-dose rhFGF-2 in conjunction with β-TCP.

We presume that rhFGF-2-induced mesenchymal cell proliferation and angiogenesis is responsible for the promotion of bone formation and appearance of osteoclasts around β-TCP. Recently, rhFGF-2 was shown to indirectly regulate osteoclastogenesis and bone resorption in the bone marrow or organ cultures through the osteoblast-mediated mechanism and to directly stimulate bone pit resorption of mature osteoclasts through signal transduction pathways involving receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL), cyclo-oxygenase-2 (COX-2)-mediated prostaglandin (PG) production, and p42/p44 mitogen-activated protein kinase activation (Hurley *et al*. 1998; Kawaguchi *et al*. 2000; Collin-Osdoby *et al*. 2002). Chazono *et al*. (2004) reported that a coupling-like phenomenon occurred in bone defects after β-TCP implantation. Hence, it is reasonable to assume that if rhFGF-2 acts in the same manner in the presence of β-TCP as it would in a normal bone, it would mediate the promotion of bone formation and appearance of osteoclasts around β-TCP. However, further study will be required to evaluate the stability of the remodeled bone over a prolonged period.

In the present study, β-TCP infilling was followed by a local injection of rhFGF-2 on the day of the operation. Unlike in the case where β-TCP implantation and rhFGF-2 administration are performed after the completion of distraction, a second operation was unnecessary in our method. In addition, the combined use of β-TCP and rhFGF-2 for bridging the initial gap could increase the distracted length and shorten the distraction period. Acute distraction can be achieved to a limited extent depending on the length of the initial gap that needs to be filled. The adverse effect of acute distraction on soft tissues, which is the main limiting factor of this procedure, needs to be considered in the future.

In summary, the present findings suggest that the combined use of rhFGF-2 and β-TCP reduced the treatment period for distraction osteogenesis and accelerated the formation of a new high-quality bone.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Olympus Biomaterial for providing the β-TCP granules. This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research in Japan (Grant No. 19791493).

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

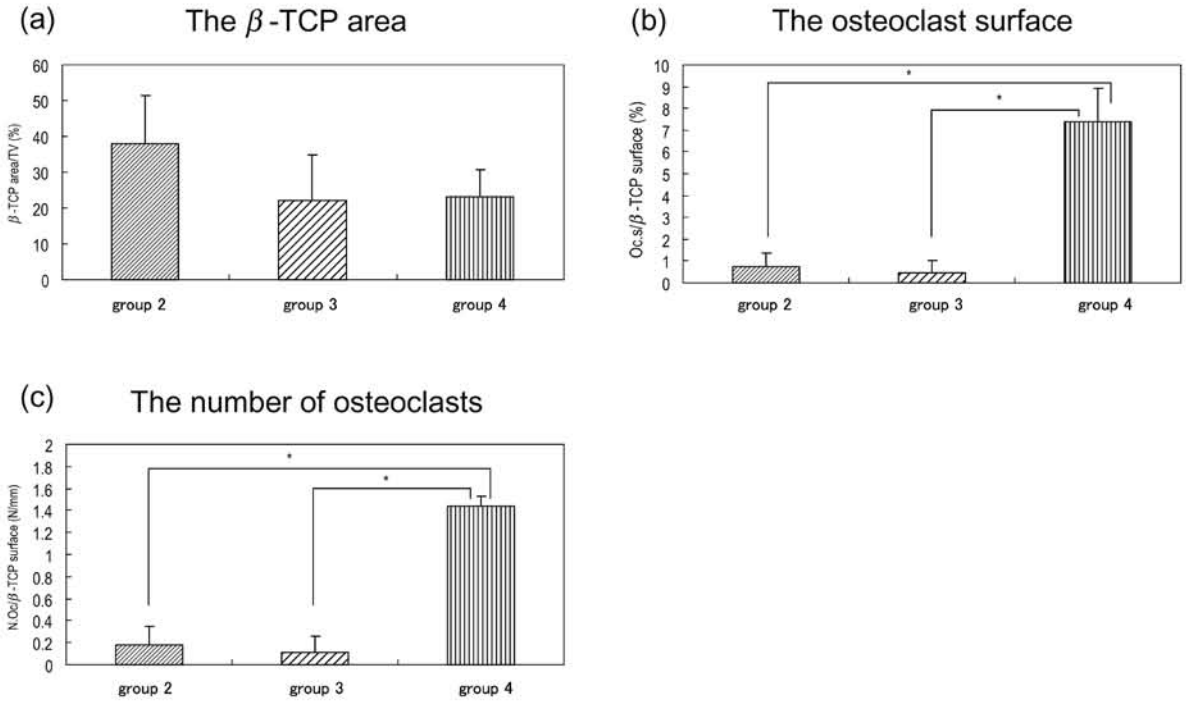


Fig. 9 Histomorphometric analysis of region B at 4 weeks after the operation. (a) The β-tricalcium phosphate (β-TCP) area (β-TCP area/TV). (b) The osteoclast surface (Oc.S/β-TCP surface). (c) The number of osteoclasts (N.Oc/β-TCP surface). $*P < 0.05$. There was no significant difference in β-TCP area/TV across the groups. Oc.S/β-TCP surface and N.Oc/β-TCP surface were significantly increased in group 4. Group 2, distraction with β-TCP granules; group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules.

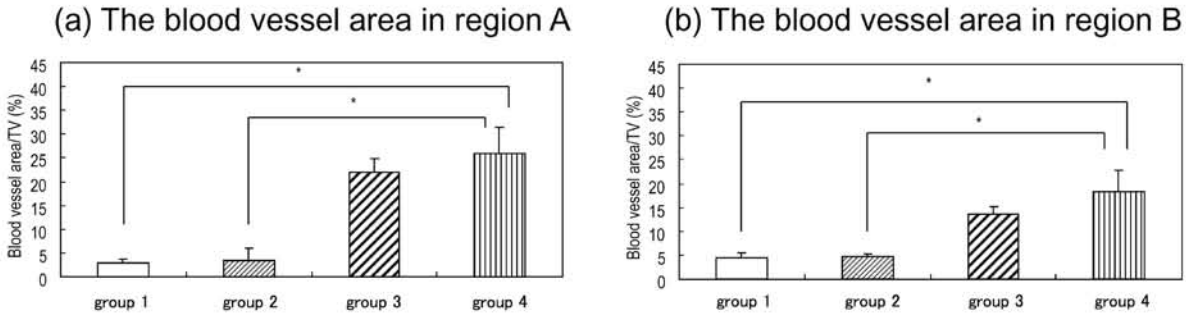


Fig. 10 Histomorphometric analysis of the blood vessel area (blood vessel area/TV) in regions A and B at 4 weeks after the operation. (a) The blood vessel area in regions A. (b) The blood vessel area in region B. $*P < 0.05$. Blood vessel area/TV increased in groups 3 and 4. Group 1, distraction alone; group 2, distraction with β-tricalcium phosphate (β-TCP) granules; group 3, distraction with recombinant human fibroblast growth factor-2 (rhFGF-2) (25 μg/50 μL) injected into β-TCP granules; group 4, distraction with rhFGF-2 (100 μg/50 μL) injected into β-TCP granules.

REFERENCES

Abbaspour A, Takata S, Sairyo K, Katoh S, Yukata K, Yasui N (2008) Continuous local infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment. *Bone* **42**: 98–106.

Aida T, Yoshioka I, Tominaga K, Fukuda J (2003) Effects of latency period in a rabbit mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **32**: 54–62, discussion 63.

Al Ruhaimi KA (2001) Effect of calcium sulphate on the rate of osteogenesis in distracted bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* **30**: 228–233.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

Al-Sebaei MO, Gagari E, Papageorge M (2005) Mandibular distraction osteogenesis: a rabbit model using a novel experimental design. *J Oral Maxillofac Surg* **63**: 664–672.

Aronson J (1994) Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 124–131.

Bland YS, Critchlow MA, Ashhurst DE (1995) Exogenous fibroblast growth factors-1 and -2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta Orthop Scand* **66**: 543–548.

Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K (2004) Bone formation and bioresorption after implantation of injectable β-tricalcium phosphate granules hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Master Res A* **70**: 542–549.

Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ (2000) Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**: 147–154.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P (2002) Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res* **17**: 1859–1870.

Eralp L, Ozkan K, Kocaoglu M *et al.* (2007) Effects of hyperbaric oxygen therapy on distraction osteogenesis. *Adv Ther* **24**: 326–332.

Hirata M, Murata H, Takeshita H, Sakabe T, Tsuji Y, Kubo T (2006) Use of purified beta-tricalcium phosphate for filling defects after curettage of benign bone tumours. *Int Orthop* **30**: 510–513.

Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermans LM, Visser W, Wittebol P (1984) Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora. *Clin Orthop Relat Res* 281–288.

Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, Bernecker P, Lorenzo J (1998) Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* **22**: 309–316.

Ilizarov GA (1989) The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res* 249–281.

Kanellopoulos AD, Soucacos PN (2006) Management of nonunion with distraction osteogenesis. *Injury* **37** (Suppl 1): S51–S55.

Kato T, Kawaguchi H, Hanada K *et al.* (1998) Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res* **16**: 654–659.

Kawaguchi H, Chikazu D, Nakamura K, Kumegawa M, Hakeda Y (2000) Direct and indirect actions of fibroblast growth factor-2 on osteoclastic bone resorption in cultures. *J Bone Miner Res* **15**: 466–473.

Kawashima K (2003) [Analysis of initial gap and remodeling by distraction osteogenesis in canine mandible]. *Hokkaido Igaku Zasshi* **78**: 239–251. (In Japanese.)

Kim JY, Cho BC (2007) Effect of calcium sulfate pellets on early bone mineralization in distraction osteogenesis for craniofacial microsomia in adults. *J Craniofac Surg* **18**: 1309–1321.

Kunimori K, Maruoka Y, Sato M, Harada K, Omura K (2007) The effect of mandibular distraction osteogenesis on the histology and immunohistology of keratinized gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**: 738–744.

Li G, Bouxsein ML, Luppen C *et al.* (2002) Bone consolidation is enhanced by rhBMP-2 in a rabbit model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* **20**: 779–788.

Louis O, Soykens S, Willnecker J, Van den Winkel P, Osteaux M (1996) Cortical and total bone mineral content of the radius: accuracy of peripheral computed tomography. *Bone* **18**: 467–472.

Luna Gonzalez F, Lopez Arevalo R, Meschian Coretti S, Urbano Labajos V, Delgado Rufino B (2005) Pulsed electromagnetic stimulation of regenerate bone in lengthening procedures. *Acta Orthop Belg* **71**: 571–576.

McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH (1992) Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* **89**: 1–8, discussion 9–10.

Nagahama K, Aoki K, Nonaka K *et al.* (2004) The deficiency of immunoregulatory receptor PD-1 causes mild osteopetrosis. *Bone* **35**: 1059–1068.

Narasaki K, Shimizu H, Beppu M, Aoki H, Takagi M, Takashi M (2003) Effect of extracorporeal shock waves on callus formation during bone lengthening. *J Orthop Sci* **8**: 474–481.

Noji H, Yoshimasu H, Aoki K, Ohya K, Amagasa T (2000) Non-invasive densitometric and histomorphometric study of the regenerated bone in the distraction gap in rabbits. *J Med Dent Sci* **47**: 197–207.

Norris SA, Pettifor JM, Gray DA, Buffenstein R (2001) Calcium metabolism and bone mass in female rabbits during skeletal maturation: effects of dietary calcium intake. *Bone* **29**: 62–69.

Ogose A, Hotta T, Hatano H *et al.* (2002) Histological examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur. *J Biomed Mater Res* **63**: 601–604.

Ogose A, Kondo N, Umezu H *et al.* (2006) Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials* **27**: 1542–1549.

Ohashi S, Ohnishi I, Kageyama T *et al.* (2005) Effect of vascularity on canine distracted tibial callus consolidation. *Clin Orthop Relat Res* **438**: 253–259.

Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T, Mamada K, Kawaguchi H (1999) Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* **64**: 542–546.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH *et al.* (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* **2**: 595–610.

Power RA, Iwaniec UT, Wronski TJ (2002) Changes in gene expression associated with the bone anabolic effects of basic fibroblast growth factor in aged ovariectomized rats. *Bone* **31**: 143–148.

Pradel W, Lauer G, Dinger J, Eckelt U (2009) Mandibular traction – an alternative treatment in infants with Pierre Robin sequence. *J Oral Maxillofac Surg* **67**: 2232–2237.

Primrose AC, Broadfoot E, Diner PA, Molina F, Moos KF, Ayoub AF (2005) Patients' responses to distraction osteogenesis: a multi-centre study. *Int J Oral Maxillofac Surg* **34**: 238–242.

Sadakah AA, Elshall MA, Farhat AA (2009) Bilateral intra-oral distraction osteogenesis for the management of severe congenital mandibular hypoplasia in early childhood. *J Craniomaxillofac Surg* **37**: 216–224.

Sakurakichi K, Tsuchiya H, Uehara K, Yamashiro T, Tomita K, Azuma Y (2004) Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. *J Orthop Res* **22**: 395–403.

Sato M, Maruoka Y, Kunimori K *et al.* (2007) Morphological and immunohistochemical changes in muscle tissue in association with mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* **65**: 1517–1525.

Song HR, Oh CW, Kyung HS *et al.* (2004) Injected calcium sulfate for consolidation of distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Pediatr Orthop B* **13**: 170–175.

Suba Z, Takacs D, Matusovits D, Barabas J, Fazekas A, Szabo G (2006) Maxillary sinus floor grafting with beta-tricalcium phosphate in humans: density and microarchitecture of the newly formed bone. *Clin Oral Implants Res* **17**: 102–108.

Tohyama T, Sato J, Hayashi K (2004) An experimental study on the bone formation of distraction osteogenesis using rhbFGF atherocollagen sponge complex. *Tsurumi Univ Dent J* **30**: 63–76.

Uglow MG, Peat RA, Hile MS, Bilston LE, Smith EJ, Little DG (2003) Low-intensity ultrasound stimulation in distraction osteogenesis in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 303–312.

Wang Y, Ni M, Tang PF, Li G (2009) Novel application of HA-TCP biomaterials in distraction osteogenesis shortened the lengthening time and promoted bone consolidation. *J Orthop Res* **27**: 477–482.

Yates KE, Troulis MJ, Kaban LB, Glowacki J (2002) IGF-I, TGF-beta, and BMP-4 are expressed during distraction osteogenesis of the pig mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* **31**: 173–178.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Teratology Society

MEMO

インプラント
口腔再生医学分野

春日井 昇平

医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻
摂食機能制御学・教授

1）研究の課題名

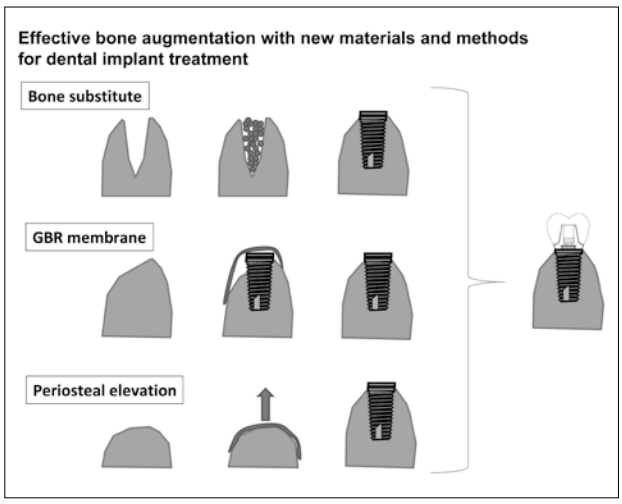
骨造成法の開発（Development of bone augmentation）

骨芽細胞のBMP2転写活性を促進するsimvastatinを含有するリン酸カルシウム系骨補填材（alpha-TCP）が、骨再生に有効であることを動物実験で再確認し、この補填材の有効性と安全性に関する臨床試験を継続した。GBR法に有効2種類の膜（cholesterol pulluran nanogel膜, gelatin膜）の2種類を開発し、この有効性を動物の骨欠損モデルで明らかにした。垂直的骨造成を可能にする骨膜挙上法を開発した。移植材を用いない上顎洞挙上法を改良し、その有効性と安全性を臨床的に明らかにした。

歯科インプラントの開発（Development of dental implant）

インプラント埋入部位の骨の形態がメカニカルストレス分布に及ぼす影響を明らかにし、インプラント周囲のメカニカルストレスを減らすインプラントデザインを考案した。

2)



3）研究内容についての英文要約

We have developed effective bone augmentation with the following new materials and methods: GBR membranes of cholesterol-pulluran nanogel, GBR membrane of gelatin and periosteal elevation. We demonstrated effectiveness of these materials and methods in animal experiments. Alpha-TCP containing simvastatin, which we had developed previously, was continuously evaluated clinically. The periosteal elevation makes the vertical augmentation possible, which will solve the most difficult problem in dental implant treatment in the future although further study for developing a compact device. We examined effects of bone shape on stress distribution around the implant and clarified the implant design which decreases the mechanical stress around the implant. We applied this design to thin hydroxyapatite coated implant, which we had developed with a dental implant company. This new dental implant will be appeared in the market this year.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

Gothenburgd大学のBiomaterial研究室（Peter Thomsen教授）の研究室と骨再生とインプラント開発に関する共同研究を開始し、研究者の交流を開始した。

D（人材育成）

2010年6名、2011年6名の博士課程学生の学位指導をおこなった。

E（国際化）

海外からの留学生の受け入れ（韓国、中国、タイ、ミャンマー、インド、ヨルダン、エジプト、リビア、ドミニカ共和国の10カ国から12名の博士課程学生、韓国から1名の専攻生）、海外研究者（中国1名、台湾1名）、JICA研修生（アルゼンチン1名、ドミニカ共和国1名）の受け入れをおこなった。

Gothenburg大学のBiomaterial教室に、研究室の大学院生が3ヶ月滞在し研究指導を受けた。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

臨床の問題点を抽出し、それを解決するため研究テーマの推進を継続しておこなった。研究室内でのセミナー、研究報告でのディスカッションの活性化、国際学会での発表の奨励、国際交流の促進をおこなった。

6）英文原著論文

Murakami I, Murakami Y, Clifford DK, Palacci P, Kasugai S. Panoramic implant notation sytem – A mothod to denote implant position and prosthodontic modalities. Journal of Prosthodontic Research in press

◎Hudieb MI, Wakabayashi N, Kasugai S. Magnitude and Direction of Mechanical Stress at the Osseointegrated Interface of the Microthread Implant. Journal of Periodontology in press 2010 Dec 28. [Epub ahead of print]

◎Hudieb M, Kasugai S. Biomechanical effect of crestal bone osteoplasty before implant placement: a three-dimensional finite element analysis. International Journal of Oral Maxillofacial Surgery in press. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]

Fueki K, Igarashi Y, Maeda Y, Baba K, Koyano K, Akagawa Y, Sasaki K, Kuboki T, Kasugai S, Garrett NR. Factors related to prosthetic restoration in patients with shortened dental arches: a multicentre study. Journal of Oral Rehabilitation in press 2010 Nov 20 [Epub ahead of print]

◎Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by combination of green tea catechin and α-tricalcium phosphate. Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials in press

Kuroda S, Goto N, Suzuki M, Kaneda K, Ohya K, Shimokawa H, Kasugai S. Regeneration of bone and tendon/ligament-like tissue induced by gene transfer of bone morphogenetic protein-12 in a rat bone defect. Journal of Tissue Engineering in press

Ozeki M, Kuroda S, Kon K, Kasugai S. Differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a self-assembling peptide hydrogel: in vitro and in vivo studies. J Biomater Appl. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]

◎Hudieb M, Wakabayashi N, Suzuki T, Kasugai S Morphologic classification and stress analysis of the mandibular bone in the premolar region for implant placement. Int J Oral Maxillofac Implants. 25（3）:482-90, 2010

◎Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. Journal of Biomedical Materials Research Part B; Applied Biomaterials 93（1）:65-73, 2010

Maruo K, Sato D, Machida T, Kasugai S. Effects of alpha-tricalcium phosphate containing simvastatin on alveolar ridge augmentation. Journal of Oral Tissue Engineering 7（3）:143-152, 2010

Machida T, Nyan M, Kon K, Maruo K, Sato H, Kasugai S. Effect of hydroxyapatite fiber material on rat incisor socket healing. Journal of Oral Tissue Engineering 7（3）:153-162, 2010

7）総説ならびに著書

和泉雄一、春日井昇平、荒川真一.インプラント周囲炎とは.インプラント周囲炎を治療する（和泉雄一、吉野敏郎編）、医学情報社、pp6-11, 2010

8）平成22年度までの自己評価

インプラント治療に必要な骨造成法として、様々な材料と方法を開発し、動物実験でその効果を確認し、その一部については臨床応用をおこなっている。これら一連の研究は国内外で高く評価されている。インプラント周囲の骨へのストレスを軽減するデザインを明らかにし、我々が共同で開発した薄膜ハイドロキシアパタイトのインプラントにこのデザインを付与し、医薬品医療機器総合機構に承認申請をおこなった。これらの研究は、インプラント治療における問題点の解決に繋がる点で高く評価できる。

9）学会発表（英文）

Kasugai S. Challenge to treat atrophied posterior maxilla: Are there evidences to support your decision? Bagkok Implant Syposium 2010.11.30-12.3 Pullman Bagkok King Power & Theatre Bagkok Thailand （口頭）

Kasugai S. Advantages of HA-coated implant in our daily practice: Dental implant treatment for posterior maxilla. VIP Seminar of Japan Medical Material 2010.11.21 新宿NSビル 東京 （口頭）

Kasugai S. What we really need for bone augmentation? 17th Alexandria Internationl Dental Cogress 2010.11.2-4 Hilton Alexandria Green Plaza, Alexandria, Egypt （口頭）

Kimura J, Shiota M, Kon K, Machida T, Fujii M, Kasugai S. Application of hydroxyapatite fiber for bone augmentation. 19th annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration 2010.10.6-7 Glasgow Convention Center , Glasgow, UK （示説）

Kasugai S, Ueno N, Kondo H, Sato D, Kuroda S. Clinical study of new bone substitute: alpha-TCP containing simvastatin. 19th annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration 2010.10.6-7 Glasgow Convention Center , Glasgow, UK （示説）

Miyahara T, Nyan M, Shimoda A, Hao J, Rodoriguez R, Kobayashi H, Kuroda S, Shiota M, Akiyoshi K, Kasugai K. Early bone regeneration by novel nanogel cross linking membrane. 19th annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration 2010.10.6-7 Glasgow Convention Center , Glasgow, UK （示説）

Miyahara T, Koizumi H, Nyan M, Pluemsakunthai W, Shimizu Y, Shiota M, Kasugai S. Novel material for mouth guard composed of two materials. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （示説）

Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Application of epigallocatechin-3-gallate -tricalcium phosphate combination for bone regeneration. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Hosokawa R, Torii S, Makino M, Sekine J, Kasugai S. Clinical outcome of immediate-loaded implants: 12-year multicenter study in Japan. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Date Y, Ota M, Yokoyama Y, Iseki S, Kasugai S. Isolation of the genes involved in tooth root morphogenesis. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （示説）

Noritake K, Kuroda S, Nyan M, Atsuzawa Y, Kasugai S. Feasibility of a modified gelatin hydrogel membrane for GBR. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Kuroda S, Noritake K, Hao J, Nakata H, Kasugai S. Interference in PPAR γ 2 and transgene for Osterix may reprogrammed osteogenesis. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Rungsiyanont S, Swasdison S, Dhanesuan N, Kasugai S. Biocompatibility evaluation of gelatin–hydroxyapatite crosslinked scaffold for tissue engineering. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Kondo H, Kihara S, Kobayashi T, Suzuki T, Kuroda S, Kasugai S. Multiple attachment system for the implant retained removable denture. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （示説）

Hudieb M, Wakabayashi N, Kasugai S. Stress transferring mechanism around microthreaded and smooth dental implants. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （示説）

Rojbani H, Nyan M, Kasugai S. Osteoconductivity Of alfa, betaTCP and HA with/without simvastatin. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Zakaria O, Kon K, Kasugai S. Evaluation of a new biodegradable periosteal distractor. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain （口頭）

Kasugai S. Dental implant treatment at posterior maxilla: Why I use POI-FINATITE? JMM台湾歯科医師向け講演会 2010.05.29 JMM本社 大阪 （口頭）

Miyahara T, Nyan M, Nagayama T, Hao J, Rodoriguez R, Yamamoto Y, Shimoda A, Kuroda S, Tachikawa N, Shiota M, Akiyoshi K, Kasugai S. Novel GBR membrane consisting of cholesterol-bearing pullulan nanogel. The 25th Annual Meeting of Academy of Osseointegration 2010.3.4-7 Walt Disney World Dolphin Resort Hotel, Orland, USA （口頭）

Kasugai S, Takebayashi A, Furusawa K. Novel surgical guiding system with a laser beam. 25th Annual Meeting of Academy of Osseointegration 2010.3.4-7 Walt Disney World Dolphin Resort Hotel, Orland, USA （口頭）

Hao Jia、黒田真司、大谷啓一、青木秀希、春日井昇平.Osteoclast response to a thin sputtered hydroxyapatite coating. 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.18-19 広島国際会議場 広島（口頭）

Hisham Rojbani, Myat Nyan, 大谷啓一、春日井昇平. Evaluating osteoconductiviry of alpha-TCT, beta-TCP and HA with or without combination with simvastatin. 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.18-19 広島国際会議場　広島 （口頭）

Reena Rodriguez, 近藤尚知、Myat Nyan, Hao Jia, 宮原宇将、大谷啓一、春日井昇平.Local application of EGCG for bone regeneration. 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.18-19広島国際会議場　広島 （口頭）

Osama Zakaria,　今一裕、春日井昇平.Evaluation of a new design of soft tissue and periosteal distraction. 第9回日本再生医療学会総会 2010.3.18-19 広島国際会議場　広島 （口頭）

Srilatha Bhargava, 黒田真司、Hao Jia、Myat Nyan、大谷啓一、青木秀希、春日井昇平.An in vitro study of osteoblast differentiation on surface modified Y-TZP zirconia. 第9回日本再生医療

10）学会発表（和文）

春日井昇平.歯科領域で使用する骨補填材.第1回バイインテグレーション学会　2011.01.24 東京医科歯科大学MDタワー大講堂　東京

春日井昇平.骨欠損を伴うインプラント治療の現状:骨造成に必要なものは何か？ Dentistry, Quo Vadis? 2010.12.04-05　野口記念会館　東京

春日井昇平.インプラント臨床の世界的潮流.Dentistry, Quo Vadis?　2010.12.04-05　野口記念会館　東京

作山葵、宗像源博、立川敬子、清水勇気、春日井昇平.インプラント周囲炎を生じた患者に対する細菌学的検討.　第14回日本顎顔面インプラント学会学術大会　201012.04-05　明海大学浦安キャンパス　浦安

山口葉子、塩田真、春日井昇平.　インプラント維持力の経時的変化に関する模擬骨を用いた実験的研究.　第14回日本顎顔面インプラント学会学術大会　201012.04-05　明海大学浦安キャンパス　浦安

原口美穂子、立川敬子、宗像源博、向山仁、春日井昇平、谷口尚。インプラントを応用した下顎顎補綴の長期経過観察―固定性ブリッジ症例と可撤性部分床義歯症例―.　第14回日本顎顔面インプラント学会学術大会　201012.04-05　明海大学浦安キャンパス　浦安

原口美穂子、立川敬子、宗像源博、柳沢治之、向山仁、春日井昇平、谷口尚.インプラントを応用した下顎顎補綴の長期観察　固定性ブリッジ症例と可撤性部分床義歯症例.日本補綴歯科学会東京支部総会・第14回学術大会　2010.10.16-17　昭和大学　東京

小奈正弘、若林則幸、Malik Hudieb、春日井昇平、五十嵐順正.マイクロスレッド構造がインプラント周囲骨の応力と歪み分布に及ぼす影響.日本補綴歯科学会東京支部総会・第14回学術大会　2010.10.16-17　昭和大学　東京

藤井政樹、塩田真、木村純一、今一裕、春日井昇平.新規吸収性ハイドロキシアパタイトファイバーによる骨造成効果.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

宮原宇将、永山友子、小林裕史、黒田真司、春日井昇平.新規GBRナノゲルクロスリンキングメンブレン　ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるドライタイプとウェットタイプの骨治癒比較評価.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

宗像源博、立川敬子、大林尚人、誉田栄一、春日井昇平.ビスフォスフォネート経口投与が下顎骨に与える影響.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

竹林晃、春日井昇平.新発想のCT撮影用テンプレートと光学式サージカルガイドを用いたナビゲーションシステムの開発.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

秋野徳雄、立川敬子、丸尾勝一郎、宗像源博、春日井昇平.口腔内から採取された自家骨の細菌学的汚染度の検討　生理的食塩水による洗浄効果について.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

丸尾勝一郎、近藤尚知、鬼原英道、立川敬子、春日井昇平.シンバスタチン-α-TCPリン酸カルシウム複合体のラット抜歯窩への骨造成効果のX線学的評価.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

渡邉武、塩田真、春日井昇平.上顎洞外側壁における後上歯槽動脈の分布.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

岡田常司、宗像源博、立川敬子、春日井昇平.β-TCPを用いた上顎洞挙上術の経時的変化の観察　歯科用コーンビームCTによる分析.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

小林賢一、小林弘清、春日井昇平.合理的なオーバーデンチャー製作法.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

山口葉子、長尾浩史、宗像源博、立川敬子、塩田真.下顎後方シングルスタンディングインプラントのアバットメントが破折した一症例.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

春日井昇平.骨粗鬆症患者へのインプラント治療における注意点.シンポジウム　第8回日本歯科骨粗鬆症研究会　2010.4.4　東京医科歯科大学　東京

春日井昇平.CAD/CAMはインプラント治療を大きく変えた.特別講演　第1回歯科CAD/CAM学会　2010.03.27　都市センターホテル　東京

黒田真司、中田秀美、則武加奈子、Hao Jia、春日井昇平.脂肪細胞分化において、PPARγ制御およびOsterix強制発現による骨芽細胞分化誘導の可能性.第9回日本再生医療学会総会2010.3.18-19 広島国際会議場　広島

森田梨津子、池田悦子、中尾一久、石田研太郎、山本照子、小川美帆、水野光政、春日井昇平、辻孝.成体口腔内で成長した再生歯の長期的な機能安定性の解析.第9回日本再生医療学会総　2010.3.18-19 広島国際会議場　広島

春日井昇平.成功するインプラント治療:ガイドラインの作成は可能か?　総合インプラント研究センター講演会　2010.2.20　新宿ニューシティホテル、東京

春日井昇平.骨再生の基礎.第2回Academy of Minimally Invasive Implant Treatment学術大会　2010.1.24　学術センター、東京

春日井昇平.インプラント治療のトラブルと対策:失敗しないインプラント治療のための留意点.補綴学会教育セミナー 2010.1.10　パシフィコ横浜、横浜

11）受賞

Academy of Osseointegration（AO） Best Clinical Innovation Award: Miyahara T, Nyan M, Nagayama T, Hao J, Rodoriguez R, Yamamoto Y, Shimoda A, Kuroda S, Tachikawa N, Shiota M, Akiyoshi K, Kasugai S. Novel GBR membrane consisting of cholesterol-bearing pullulan nanogel. The 25th Annual Meeting of Academy of Osseointegration 2010.3.4-7 Walt Disney World Dolphin Resort Hotel, Orland, USA

日本口腔インプラント学会　最優秀発表賞: 宮原宇将、永山友子、小林裕史、黒田真司、春日井昇平.新規GBRナノゲルクロスリンキングメンブレン　ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるドライタイプとウェットタイプの骨治癒比較評価.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

日本口腔インプラント学会　デンツプライ賞: 渡邉武、塩田真、春日井昇平.上顎洞外側壁における後上歯槽動脈の分布.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

日本口腔インプラント学会　デンツプライ賞: 岡田常司、宗像源博、立川敬子、春日井昇平.β-TCPを用いた上顎洞挙上術の経時的変化の観察　歯科用コーンビームCTによる分析.第40回日本口腔インプラント学会学術大会　2010.9.17-19　札幌コンベンションセンターおよび札幌市産業振興センター、札幌

International Association for Dental Research（IADR）, Implantology Research Group, Young Invesitigator Prize: Rungsiyanont S, Swasdison S, Dhanesuan N, Kasugai S. Biocompatibility evaluation of gelatin–hydroxyapatite crosslinked scaffold for tissue engineering. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain

International Association for Dental Research（IADR）, Implantology Research Group, Young Invesitigator Prize: Rojbani H, Nyan M, Kasugai S. Osteoconductivity Of alfa, betaTCP and HA with/without simvastatin. General Session（88th）and Exhibition of International Association for Dental Research 2010.7.14-17. Barcelona, Spain

12）外部資金の獲得状況

寄付金-研究助成金　5,134,010円

受託研究　9,090,910円

科学研究補助金

文部科学　基盤研究（A）550,000円　短縮歯列への補綴介入に関するマルチセンター・リサーチ 代表　五十嵐順正（本学）　分担研究者　春日井昇平

文部科学　基盤研究（A）1,500,000円　歯の再生医療システムに向けた基盤技術の開発　代表　辻孝（東京理科大学）　分担研究者　春日井昇平

文部科学　挑戦的萌芽　1,100,000円　上顎洞挙上のためのX線透過性吸収性材料の開発　代表　春日井昇平

厚生科学　厚生科研費　7,200,000円　実験的再生歯の臨床応用に関する研究　代表者　山口朗（本学、GCOE事業推進担当者）　分担研究者　春日井昇平

文部科学　基盤研究（C）900,000円　生分解性ポリマーステントを利用した口腔難組織再建　代表者　立川敬子　分担研究者　春日井昇平

文部科学　挑戦的萌芽　500,000円　粘膜・骨再生法による、新しい口蓋ろう孔閉鎖の試み　代表者　黒田真司　分担研究者　春日井昇平

文部科学　若手研究（B）1,400,000円　インプラント埋入時顎骨に生じる内部応力の解明に関するシミュレーション実験　研究代表者　山口葉子

文部科学　若手研究（B）1,600,000円　新規開発遅延型吸収性ナノゲルメンブレンを用いた骨造成における有効性の評価　研究代表者　小林裕史

13）特別講演、招待講演、シンポジウム

春日井昇平.歯科領域で使用する骨補填材.第1回バイオインテグレーション学会　2011.01.24 東京医科歯科大学MDタワー大講堂　東京

春日井昇平.インプラント治療の問題からのトラブル回避.UCLAインプラントアソシエーションJAPAN.2011.01.16 鶴見大学会館ホール　横浜

春日井昇平.骨欠損を伴うインプラント治療の現状:骨造成に必要なものは何か？ Dentistry, Quo Vadis? 2010.12.04-05　野口記念会館　東京

春日井昇平.インプラント臨床の世界的潮流.Dentistry, Quo Vadis? 2010.12.04-05　野口記念会館　東京

Kasugai S. What we really need for bone augmentation? 17th Alexandria Internationl Dental Cogress 2010.11.2-4 Hilton Alexandria Green Plaza, Alexandria, Egypt

春日井昇平.最新の再生医療の現状と課題:最近開発された新しい骨補填材を中心に.歯周病インプラントシンポジウム　2010.7.31 千葉県保健協会　千葉

春日井昇平.診査・診断・治療計画:成功するインプラント治療を目指して.日本口腔インプラント学会専門医臨床技術向上講習会 2010.07.17　東京歯科水道橋病院　東京

春日井昇平.骨粗鬆症患者へのインプラント治療における注意点.シンポジウム　第8回日本歯科骨粗鬆症研究会　2010.4.4　東京医科歯科大学　東京

春日井昇平.CAD/CAMはインプラント治療を大きく変えた.特別講演　第1回歯科CAD/CAM学会 2010.03.27　都市センターホテル　東京

Kasugai S. Clinical Impact of surface modification and design of dental implant surface modification and design of dental implant. 東京医科歯科大学GCOEプログラムシンポジウム 2010.2.11　東京医科歯科大学、東京

春日井昇平.骨再生の基礎.第2回Academy of Minimally Invasive Implant Treatment学術大会　2010.1.24　学術センター、東京

春日井昇平.インプラント治療のトラブルと対策:失敗しないインプラント治療のための留意点.補綴学会教育セミナー 2010.1.10　パシフィコ横浜、横浜

14）主催学会

第1回バイオインテグレーション学会　2011.1.23　東京医科歯科大学　東京（大会長）

Nobel Biocare Symposium Asia-Pacific 2010　2010.8.21-22　グランドプリンスホテル新高輪　東京　(Scientific Committee Member, Chairman, Mederators)

東京医科歯科大学Global COEプログラム「歯と骨の分子疾患学の国際研究拠点」 公開シンポジウム 「歯科インプラントのデザインと表面改変」2010.2.11　東京医科歯科大学、東京　(Chairman)

第 2 回 AMII（ Academy of minimally invasive Implantology、MII研究会） 2010.1.24　学術総合センター、東京（大会長）

15）新聞、雑誌、TV報道

Bloom 「附属病院診療科訪問　インプラント外来　国内トップの実績を誇るインプラント治療」
2010年12月号　12ページ

週刊朝日MOOK おんなの気になる病気と医療の新常識「欠損歯にも対応できるインプラント治療」
2010年12月15日

NHKラジオ朝一番健康ライフ 「安全なインプラント治療とは」2010年9月20-24日

ビズモ（BIZMO）「いい歯科医を選びには？ 歯科医の競争激化でインプラントのトラブル多発」2010年8月
NHKラジオ朝一番健康ライフ 「安全なインプラント治療とは」 2010年6月14-18日

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授:塩田真
講　師:立川敬子
助教師:黒田真司、宗像源博
大学院生:木村純一、○伊達佑生、○則武加奈子、宮原宇将、Hisham Rojbani,　○ Hao Ja, ○ Reena Rodoriguez, ○ Srilatha Bhargava,　秋野徳雄、永山友子、藤井政樹、○古市祥子、Osama Zakaria,　高尚、下岸将博、陳康、羽田康叙、湯川健、Marwa Madi,　山本麻衣子、高宅花織、Zayar Lin,　干淼、○Warunee Pluemsakunthai, 山下優

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など

AISSの選考に問題があると強く感じています。当分野にはAISSが7名、QISSが4名おります。残念なことに当分野の7名のAISSは海外の学会で賞をとっていません。一方、QISSの2名は海外の学会において口頭で発表して、学会賞をもらっており、もう1名のQISSは海外の学会賞の候補者となりました。現在のように、短時間のプレゼンで、限られた事業担当推進者（私自身最近面接に参加することが少なく申し訳ございません）採点で選考されている状況では、適切な選考をおこなうことは無理です。英語でのプレゼンの出来が良いと印象が良いので、その結果外国人留学生がAISSとなる機会が多いことは、国際化として良いのでしょうが、GCOEの原資は国の税金ですから、日本人の若手研究者を育てることも真剣に考えるべきではないでしょうか。

Molecular and Tissue Responses in the Healing of Rat Calvarial Defects After Local Application of Simvastatin Combined With Alpha Tricalcium Phosphate

Myat Nyan,[1,2,3] Takayuki Miyahara,[1,2] Kanako Noritake,[1,2] Jia Hao,[1,2] Reena Rodriguez,[1,2] Shinji Kuroda,[1] Shohei Kasugai[1,2]

[1] Department of Oral Implantology and Regenerative Dental Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

[2] Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

[3] Department of Prosthodontics, University of Dental Medicine, Yangon, Myanmar

Received 29 May 2009; revised 20 August 2009; accepted 27 September 2009
Published online 18 December 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.b.31559

Abstract: We have previously reported that healing of rat calvarial defects was enhanced by application of alpha tricalcium phosphate (αTCP) combined with simvastatin, a cholesterol synthesis inhibitor. The purpose of the present study was to investigate the cellular and molecular mechanisms in this phenomenon. Rat calvarial defects were grafted with αTCP with or without simvastatin or left untreated. Animals were sacrificed on 3, 7, 10, 14, and 21 days postoperatively and histological changes in the defect region were assessed. Gene expression patterns were examined by RT-PCR. Proliferation and migration of osteoprogenitor cells from the dura mater were increased in simvastatin group from day 3 to day 10 ($p < 0.01$). New bone formation was significantly increased in simvastatin group on day 14 and day 21 ($p < 0.01$). BMP-2 expression was significantly higher in simvastatin group on day 3 and day 14 ($p < 0.05$) and maintained until day 21. Increased upregulation of TGF-β1 was also observed in the simvastatin group on day 7 ($p < 0.05$) which was maintained until day 14. These findings suggest that the proliferation and recruitment of osteoprogenitor cells were critical steps in early stage of bone healing and that these steps were enhanced by TGF-β1 and BMP-2, which were stimulated by simvastatin. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 93B: 65–73, 2010

Keywords: bone healing; simvastatin; alpha tricalcium phosphate; BMP-2; TGF-β; bone formation

INTRODUCTION

For regeneration of defective or lost bone tissue, various techniques for tissue engineering have been introduced. *In situ* bone regeneration therapy is one of them in which osteoconductive scaffolds combined with bioactive molecules are applied to stimulate the local host cells to upregulate osteoblastic differentiation and subsequent bone formation. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are promising candidates for this approach of tissue engineering; however, there are still some problems to be solved for clinical application.[1] Simvastatin is one of the most commonly prescribed cholesterol lowering drugs, which has been shown to stimulate expression of BMP-2 *in vitro* and promote bone formation *in vivo*.[2] Recently, many research works have been emphasized on the local application of statins for *in situ* bone regeneration and repair.[3–16] We have also reported in our previous study that optimal dose of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate (αTCP) stimulated bone regeneration in the calvarial osteotomy defects in rats.[17] The objective of the present study was to investigate the molecular and cellular mechanisms in the early stage of bone healing by the application of simvastatin-αTCP combination in the rat calvarial defects.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation and Measurement of *In Vitro* Drug Release

αTCP particles (Advance Co., Tokyo, Japan) having 500–700 μm in diameter and porous structure (mean pore size

Correspondence to: M. Nyan (e-mail: myatnyan@gmail.com)
Contract grant sponsors: Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

~5 μm, mean porosity ~27%) were used. The samples were prepared according to the methods previously described.[17] Simvastatin (OHARA Pharmaceutical Co. Ltd., Koka, Shiga, Japan) was dissolved in ethanol and the solution was applied to the αTCP particles by dropping under sterile conditions. Ethanol was dried out completely in a laminar flow hood. Each sample was composed of 0.1 mg simvastatin combined with 14 mg αTCP particles. This dose was determined as the optimal dose for combining with αTCP to stimulate bone regeneration in the previous study. The loading efficacy was determined by dividing the retained amount of simvastatin by the initial loaded simvastatin concentration multiplied by 100%.

The release of simvastatin was measured using a UV-Visible spectrophotometer, Nanodrop, ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington). The spectrometer was calibrated using 6 standards of simvastatin solution at 37°C. The absorbance was measured at 238 nm and working curve for calculation of simvastatin concentrations was established from the absorbance values. The samples were placed in 500 μL of 0.1*M* tris buffer solution (pH 7.4), and positioned in an Taitec Personal 11 Shaker (Taitec Corp., Tokyo, Japan) set at 100 rpm and 37°C. The amount of drug released into the tris buffer was measured 24 hr after the initial immersion, then every day for 14 days. The cumulative concentration was calculated using the previously determined working curve.

Animal Procedures

The animal experiment protocol was approved by the institutional committee for animal experiments. Bilateral parietal bone defects were created according to the method previously reported. Male Wistar rats (16 weeks old) were anesthetized with a combination of ketamine-xylazine (40 and 5 mg/kg). The dorsal part of the cranium was shaved and prepared aseptically for surgery. A 20-mm long incision in the scalp along the sagittal suture was made, and the skin, subcutaneous tissue and periosteum were reflected, exposing the parietal bones. Two full-thickness bone defects of 5 mm diameter were trephined in the dorsal part of the parietal bone lateral to the sagittal suture. A 5-mm trephine bur was used to create the defects under constant irrigation with sterile physiologic solution to prevent overheating of the bone edges. Care was taken during the surgical procedure to prevent damage to dura mater. In TCP group, each defect was filled with 14 mg of αTCP (30 rats) and in simvastatin group, with 14 mg of simvastatin-αTCP combination (30 rats). In 30 animals, both defects were left unfilled to serve as control group.

Histological Observation

For histological observations, three rats from each group were sacrificed at 3, 7, 10, 14, and 21 days after surgery. The specimens were fixed in 10% neutralized formalin for 1 week, decalcified in EDTA for 4 weeks, and then embedded in paraffin. Coronal sections of about 5 μm thickness were cut, stained with haematoxylin-eosin and observed under an optical microscope (Biozero, Keyence, Tokyo, Japan). The image analysis was performed by using a computer-based image analyzing software (Image J, NIH) to measure the cell density and to quantify the newly formed bone area within the defect. The cell counter tool in the Image J software was applied to count the number of osteoprogenitor-like cells by clicking on the image of each cell manually after these cells were visually determined according to their morphology. The cell counter tool marked the counted cells so that repeated counting was avoided. The bone fill percentage (%) was calculated from the values of total defect area and area of newly formed bone.

Real-Time PCR Analysis

For gene expression analysis, three rats from each group were sacrificed at 3, 7, 10, 14, and 21 days after surgery. Two bone samples incorporating the individual defect region were obtained from parietal bones of each rat. Total RNA was extracted from the bone samples by using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Complementary DNAs (cDNAs) were synthesized using a commercial kit (Superscript III First-Strand Synthesis Supermix, Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers were designed for amplification of messenger RNA (mRNA) encoding the following genes: ratGAPDH (forward: 5′-AACTCCCATTCTTCCACCTT-3′, reverse: 3′AGGGCCTCTCTCTTGCTCT-5′), ratBMP-2 (forward: 5′-AAGGCACCCTTTGTATGTGG-3′, reverse: 3′-CATGCCTTAGGGATTTTGGA-5′), ratTGF-beta1 (forward: 5′-CAACAATTCCTGGCGTTACC-3′, reverse: 3′-TGGGACTGATCCCATTGATT-5′) and ratVEGF (forward: 5′-TTGAGACCCTGGTGGACATC-3′, reverse: 3′-CTCCT-ATGTGCTGGCTTTGG-5′).

Real-time PCR quantification was performed with SYBR green PCR master-mix (Applied Biosystems) on an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (ABI, Foster City, CA). Expression levels were determined using the relative threshold cycle (C_T) method as described by the manufacturer of the detection system. Expression levels were stated in terms of fold increase or decrease relative to un-operated normal rats of the same age. This was calculated for each gene by evaluating the expression $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T$ is the result of subtracting $[C_{T\text{gene}} - C_{T\text{GAPDH}}]_{(\text{unoperated calibrator})}$ from $[C_{T\text{gene}} - C_{T\text{GAPDH}}]_{(\text{experimental group})}$.

Statistical Analysis

Data were firstly analyzed by one-way ANOVA. When this analysis suggested a significant difference between groups ($p < 0.05$), the data were further analyzed by Tukey *post hoc* multiple comparison tests.

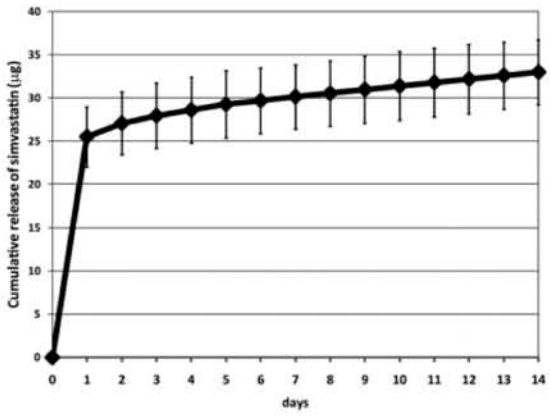


Figure 1. *In vitro* release pattern of simvastatin from αTCP. Values were shown as mean ± SD, $n = 5$.

RESULTS

In Vitro Release Behavior of Simvastatin From Alpha-Tricalcium Phosphate

The observed drug loading efficacy of αTCP for simvastatin was 93.4 ± 5.8%. Approximately 25% of adsorbed simvastatin was released after 24 hr. This initial burst release was followed by the gradual and stable release of the drug that was maintained until 2 weeks (Figure 1).

Histological Features

At day 3 after surgery, a significant thickening of dura mater was observed in simvastatin- αTCP combination group at the bone edges as well as in the middle of the defect. Round or cuboidal cells resembling undifferentiated mesenchymal cells and some osteoprogenitor-like cells migrated from dura mater to the area between the αTCP particles and dura mater. Some of these cells were also observed in the pores at the periphery of the particles which were located adjacent to the dura mater surface [Figure 2(c)]. On the other hand, control group showed the proliferation and migration of bone marrow mesenchymal cells from the bone edges and osteogenic cells from the periosteum over the bone edges. The middle of the defect was filled with connective tissue. Both control group and TCP group showed less extent of dura mater thickening and cell migration than simvastatin-αTCP combination group [Figure 2(a,b)].

At day 7, cell density became increased associated with formation of blood vessels in all groups. The cellular migration became more extensive in simvastatin-αTCP combination group at the center of the defect as well as near the bone edges. These cells took the morphology of proliferating preosteoblasts and recruited between αTCP particles and in the space between αTCP and bone edges. In some places, the cells resembling active osteoblasts condensed and began to lay down bone matrix [Figure 3(c,d)]. In the control group, the cellular proliferation was seen only at the bone edges whereas TCP group showed cell migration from dura mater at the middle of defect [Figure 3(a,b)].

At day 10, the osteogenic cells recruited between the TCP particles resembling preosteoblasts continued proliferation and migrating around the periphery of TCP particles. Some of these cells became differentiated into osteoblasts and began to lay down bone matrix in the simvastatin-αTCP combination group [Figure 4(c,d)]. Cell migration continued into the inner portion of TCP particles in both TCP and simvastatin-αTCP combination groups while many blood vessels were formed around the TCP particles [Figure 4(b,c)]. In the control group, the recruited cells at the bone edges differentiated into osteoblasts and began to form new bone [Figure 4(a)]. Cellular migration and proliferation were significantly higher in simvastatin-αTCP combination group at day 3 to day 10 ($p < 0.01$) (Figure 5).

At day 14, osteoblast differentiation and bone formation became extensive in the simvastatin-αTCP combination group so that the area between the αTCP particles became filled with newly formed bone. Active osteoblasts lined on this newly formed bone surface. The cells inside the αTCP particles also differentiated into osteoblasts and secreted bone matrix in this group [Figure 6(c)]. The cells recruited between αTCP particles in αTCP group also began to differentiate and synthesize bone matrix [Figure 6(b)]. In the control group, osteoblasts continued to form thin layer of new bone toward the center of the defect [Figure 6(a)].

At day 21, in simvastatin group, osteogenic cell migration and recruitment continued at many places eventually invading into the middle of the αTCP particles. New bone deposition was observed in the middle of the αTCP particles which were almost completely surrounded by the regenerated bone. Some parts of this new bone in contact with αTCP particles become mature and formed marrow spaces. New bone extensively replaced the αTCP particles which were located close to dura mater [Figure 7(c)]. In αTCP group, new bone was formed in the spaces between some particles but not as extensively as simvastatin group [Figure 7(b)]. In control group, osteoblasts lining along the newly formed bone surface became flattened and the center of the defect was filled with connective tissue [Figure 7(a)]. The percentage of new bone area was significantly higher in simvastatin-αTCP combination group at day 14 and day 21 ($p < 0.01$) (Figure 8).

Gene Expression Profiles

Gene expression experiments were conducted to investigate whether increased cellular proliferation and recruitment and augmented bone regeneration could be linked to TGF-β, BMP-2, and VEGF. All groups showed increased expression of TGF-β1 and BMP-2 from day 3 to 21. In simvastatin group, BMP-2 was upregulated since day 3 at a higher level than other groups ($p < 0.05$). All groups showed sim-

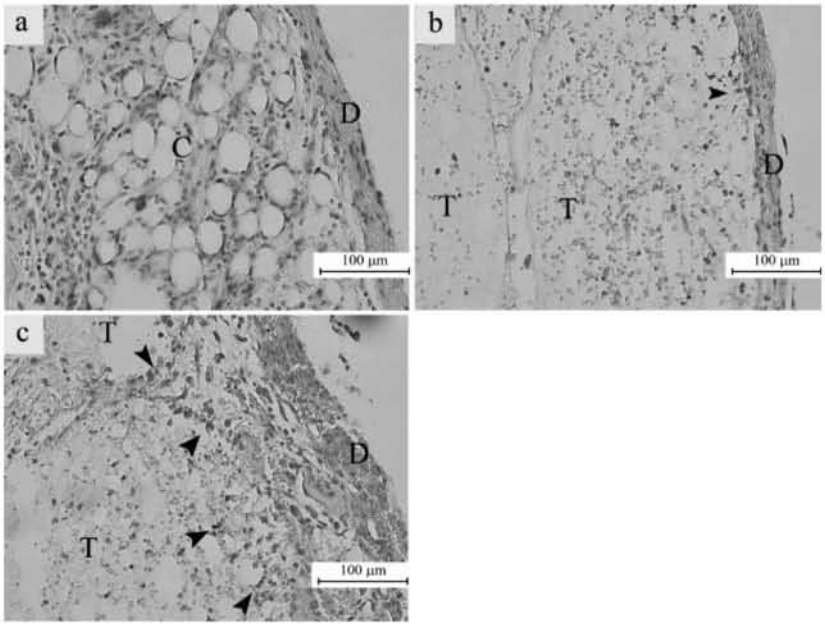


Figure 2. Photomicrographs of the calvarial defects at day 3 representing middle of the bone defects of (a) control (b) TCP and (c) simvastatin-αTCP combination groups. Arrow heads denote migrating osteogenic cells. D, dura mater; T, αTCP particles; C, connective tissue. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

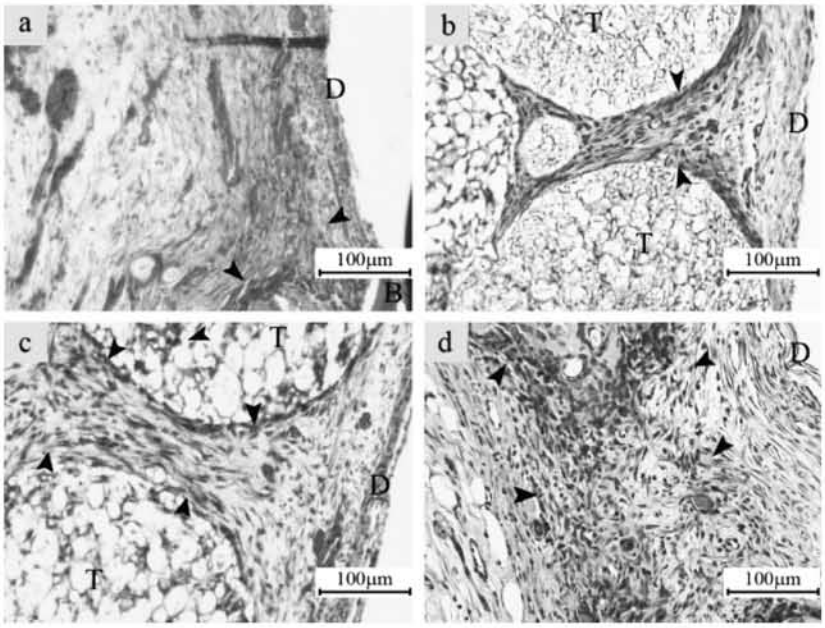


Figure 3. Photomicrographs of the calvarial defects at day 7 representing middle of the bone defects of (b) TCP and (c) simvastatin-αTCP combination groups. Panel (a) and (d) show control and simvastatin-αTCP combination groups near the bone edge. Arrow heads denote proliferating pre-osteoblasts. D, dura mater; T, αTCP particles; B, old bone. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

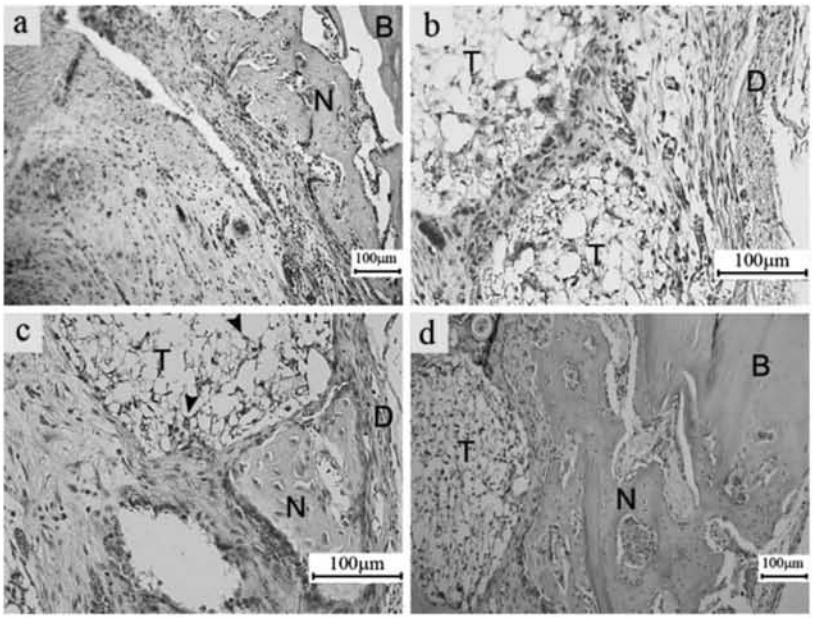


Figure 4. Photomicrographs of the calvarial defects at day 10 representing middle of the bone defects of (b) TCP and (c) simvastatin-αTCP combination groups. Panel (a) and (d) show control and simvastatin-αTCP combination groups near the bone edge. Arrow heads denote osteogenic cells migrating into αTCP particle. D, dura mater; T, αTCP particles; B, old bone; N, newly formed bone. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

ilar levels of BMP-2 mRNA expression at day 7 and day 10. The expression became higher again in simvastatin group at day 14 ($p < 0.05$) and maintained high expression until day 21.

All groups revealed slight increase in TGF-β1 expression at day 3. Then, from day 7 till day 21, the expression became increased in all groups. TGF-β1 expression was dramatically upregulated in simvastatin group at day 7 ($p < 0.05$) and maintained at higher levels until day 14. In contrast, VEGF mRNA expressions in all groups were increased at day 3 and day 7 compared with baseline (normal unoperated rats). At day 10 and 14, simvastatin group showed higher expressions of VEGF while expression levels in other groups tended to decrease toward the baseline level. However, the differences were not statistically significant. At day 21, all groups showed similar expression level (Figure 9).

DISCUSSION

Molecular and cellular mechanisms in the early healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin-αTCP combination were examined in this study.

We found increased proliferation and migration of the osteogenic cells mainly from dura mater and also from bone edges in simvastatin group at the initial stage of healing (day 3, 7, and 10). During bone healing, the mesenchymal stem cells play an important role providing the osteogenic cells. The potential sources of stem cells are the bone marrow, the granulation tissue, the periosteum, the endosteum, and the surrounding soft tissues.[18,19] The dura mater is a component of the meninges, a group of fibrous connective tissues which function to protect both the brain and spinal cord.[20] Many studies have demonstrated that the initial patterning and subsequent regeneration of the cranial vault is regulated by secreted cytokines and donated precursor cells from the dura mater.[21–24]

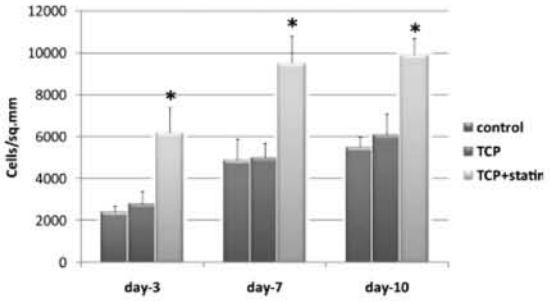


Figure 5. Cell density in the defect region at the middle of the bone defects of control, TCP and simvastatin-αTCP combination groups at day 3, 7, and 10. Values were shown as mean ± SD, $n = 6$. *$p < 0.01$ compared with control and TCP groups at corresponding time point. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

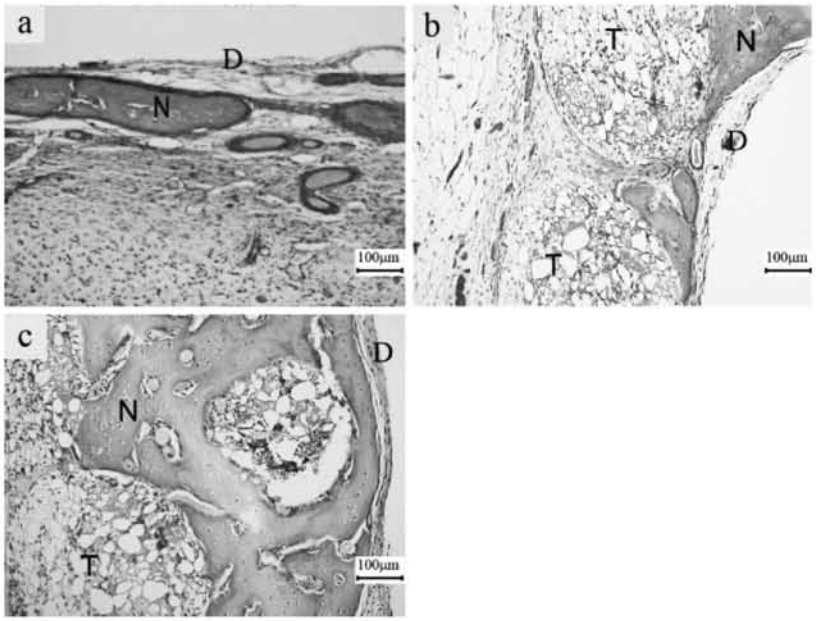


Figure 6. Photomicrographs of the calvarial defects at day 14 representing middle of the bone defects of (a) control (b) TCP and (c) simvastatin-αTCP combination groups. D, dura mater; T, αTCP particles; N, newly formed bone. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

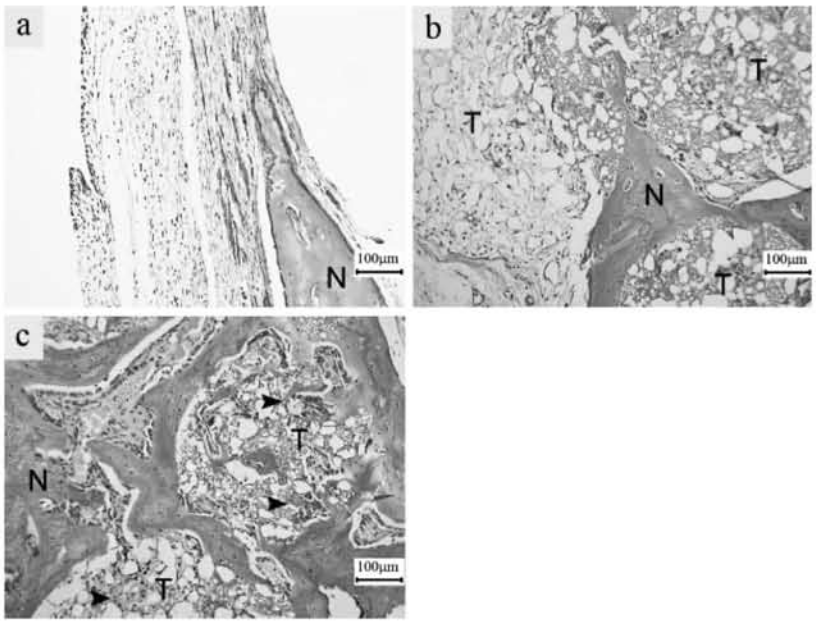


Figure 7. Photomicrographs of the calvarial defects at day 21 representing middle of the bone defects of (a) control (b) TCP and (c) simvastatin-αTCP combination groups. Arrow heads denote proliferating osteogenic cells. T, αTCP particles; N, newly formed bone. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

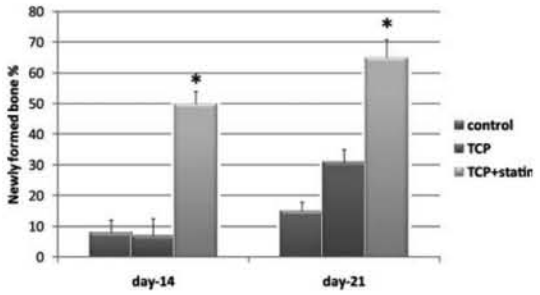


Figure 8. Comparison of new bone area between control, TCP, and simvastatin-αTCP combination groups at day 14 and day 21. Values were shown as mean ± SD, $n = 6$. *$p < 0.01$ compared with other groups at the same time point. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

The results of our *in vitro* experiment showed an initial burst release of simvastatin from αTCP. A similar pattern of release is expected in the bone defect and the released simvastatin would induce the dura mater for cytokine secretion and precursor cells stimulation at the initial phase of bone healing. This appears to be a critical step in the early stage of bone healing providing osteogenic cells which were recruited in the spaces between αTCP particles and between the particles and the dura mater by day 10.

Real-time PCR analysis revealed significantly augmented upregulation of BMP-2 at day 3 in simvastatin-αTCP combination group. It has been reported that BMP-2 stimulates chemotatic migration of mesenchymal progenitor cells and stromal osteoblasts.[25,26] Upregulation of BMP-2 at day 3 would be attributed to the initial migration and recruitment of osteogenic cells from dura mater in simvastatin-αTCP combination group. Transforming growth factor beta (TGF-β) is involved in fracture repair and it is produced by degranulated platelets after initial injury and also by osteoblasts and chondrocytes at later stages, which enhances the proliferation of these cells as well as that of mesenchymal cells and preosteoblasts.[27] TGF-β also appears to stimulate osteoblast proliferation, which presumably increases the pool of committed osteoblast precursors.[28,29] In addition, it has been shown to have strong osteoblast chemotatic effect.[30] In our experiment, TGF-β1 expression was highly upregulated in simvastatin-αTCP combination group at day 7, reaching peak at day 10 and maintained the high expressions until day 14. Histologically, extensive proliferation and migration of osteogenic cells were observed at day 7 and day 10, and continued, albeit to a less extent, at day 14 and day 21. These data suggest that TGF-β1 would play a role in early proliferation of osteogenic cells and continued proliferation and migration of osteoblasts in simvastatin-αTCP combination group.

At day 14, extensive differentiation of recruited cells to osteoblasts and active formation of new bone were evident in the simvastatin-αTCP combination group. Although pre-existing osteoblasts may be involved in the bone repair to some extent, the differentiation of pluripotential mesenchymal stem cells into osteoblasts and chondral cells is regarded as a critical step in the bone healing.[31] Expression of BMP-2 was upregulated significantly at day 14 and its expression was maintained until day 21 in simvastatin

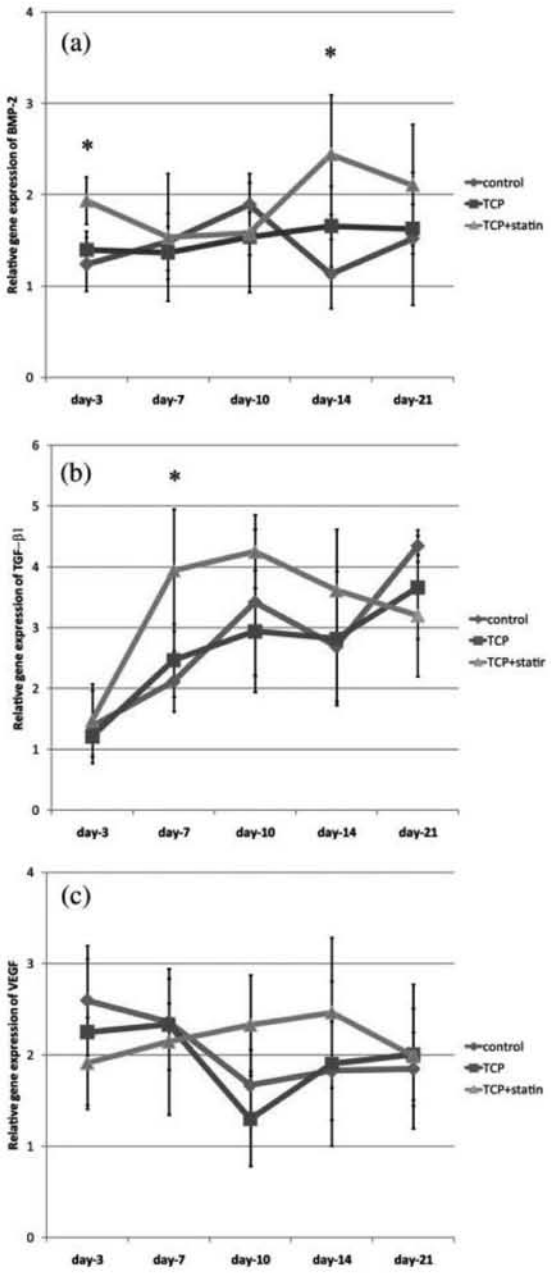


Figure 9. mRNA expression of (a) BMP-2, (b) TGF-β1 and (c) VEGF genes at different time points. Values were shown as mean ± SD, $n = 6$. *$p < 0.05$ compared with other groups at the same time point. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

group. This would contribute to increased differentiation of recruited osteogenic cells to osteoblasts and subsequently enhanced osteogenesis in the defect from day 14 to day 21. It is speculated that released simvastatin from resorbing αTCP stimulated the BMP-2 expression of osteogenic cells that were migrated from the dura mater and recruited around and inside αTCP particles at day 3. At later time points, auto- and paracrine upregulation of BMP-2 would play a role in continuing osteoblast differentiation and osteogenesis.

Maeda et al reported that statins augment vascular endothelial growth factor (VEGF) in osteoblastic cells *in vitro*.[32] In this animal study, VEGF was upregulated from day 7 to day 21 although the expression was not statistically different from control and TCP groups. Histologically, all groups revealed similar patterns of angiogenesis in the defect region.

Certain conditions must be considered when selecting an appropriate carrier or delivery system for drugs : (1) the ability of the system to deliver the drug at the appropriate time and in the proper dose, (2) the presence of a substratum that will enhance cell recruitment and attachment and will potentiate chemotaxis, (3) the presence of a void space to allow for cell migration and to promote angiogenesis, and (4) the ability of the delivery system to biodegrade without generating an immune or inflammatory response and without producing toxic waste products that would inhibit the repair process.[33] Alpha TCP used in this study fulfils all these requirements as a proper drug delivery system. It could release simvastatin sufficiently at the early time point when there is increased cellular proliferation and recruitment, thus augmenting the proliferation and recruitment of osteoprogenitor cells during this phase. Histological findings show that αTCP particles provided spaces into which osteogenic cells migrated and recruited. The particles also maintained spaces between them so that migrating osteogenic cells could be recruited and consequently differentiated and formed new bone whereas in control defects, middle of the bone defect was occupied by the connective tissue. Moreover, gradual dissolution of αTCP allowed a smooth exchange with newly formed bone without causing inflammatory response.

Although real-time PCR analysis indicated enhanced upregulation of BMP-2 and TGF-β1 mRNA expressions in simvastatin-αTCP combination group, it is not clear in which particular cell types these gene expressions were upregulated. Further studies using in-situ hybridization to detect the location of mRNAs would provide more information regarding the possible stimulatory effects of simvastatin on various cells in the bone defect. In addition, experiments to explore changes in the expression of other important genes such as FGF-2 and PDGF, which are also known to support cellular migration and proliferation, are also necessary for better understanding of the multiple effects of simvastatin in the molecular pathways that are involved in bone healing process.

In conclusion, within the limitation of this study, simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate induced bone regeneration in rat calvarial defects by augmenting osteogenic cell proliferation, migration, recruitment and differentiation in the early phase of bone healing which were associated with increased expression of BMP-2 and TGF-β1.

REFERENCES

1. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: Early experience and future development. J Bone Joint Surg Am 2003;85:82–88.
2. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 1999;18:53–57.
3. Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, Marx DV, Reinhardt RA. Effects of statin gels on murine calvarial bone. J Periodontol 2002;73:1141–1148.
4. Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair bone defects in the parietal bone of rabbits. Br J Oral Maxillofac Surg 2003;41:244–248.
5. Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, Mark DB, Cullen DM, Reinhardt RA. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. J Periodontol 2005;76:1861–1870.
6. Sato D, Nishimura K, Ishioka T, Kondo H, Kuroda S, Kasugai S. Local application of simvastatin to rat incisor socket: Carrier-dependent effect on bone augmentation. J Oral Tissue Eng 2005;2:81–85.
7. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. J Pharmacol Sci 2007;104:384–386.
8. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, Nyman J, McCluskey B, Flores A, Mundy GR. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. J Orthop Res 2007;25:1351–1357.
9. Ozec I, Kilic E, Gumus C, Goze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. J Craniofac Surg 2007;18:546–550.
10. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. Osteoporos Int 2007;18:1641–1650.
11. Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. Int J Oral Maxillofac Surg 2008;37:170–176.
12. Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, Collins ME, Reinhardt RA. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. Biomaterials 2008;29:1940–1949.
13. Ma B, Clarke SA, Brooks RA, Rushton N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. Acta Biomater 2008;4:149–155.
14. Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, Atsuta I, Koyano K. Topical application of statin affects bone healing around implants. Clin Oral Impl Res 2008;19:600–605.
15. Jeon JH, Piepgrass WT, Lin YL, Thomas MV, Puleo DA. Localized intermittent delivery of simvastatin hydroxyacid stimulates bone formation in rats. J Periodontol 2008;79:1457–1464.
16. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes

bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;107:336–342.
17. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. Clin Oral Impl Res 2009;20:280–287.
18. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop 1998;355S:7–21.
19. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem 2003;88:873–84.
20. Hobar PC, Masson JA, Wilson R, Zerwekh J. The importance of the dura in craniofacial surgery. Plast Reconstr Surg 1996;98:217–225.
21. Drake DB, Persing JA, Berman DE, Ogle RC. Calvarial deformity regeneration following subtotal craniectomy for craniosynostosis: A case report and theoretical implications. J Craniofac Surg 1993;4:85–89.
22. Opperman LA, Sweeney TM, Redmon J, Persing JA, Ogle RC. Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures. Dev Dyn 1993;198:312–322.
23. Gosain AK, Santoro TD, Song LS, Capel CC, Sudhakar PV, Madoub HS. Osteogenesis in calvarial defects: Contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. Plast Reconstr Surg 2003;112:515–527.
24. Ogle RC, Tholpady SS, McGlynn KA, Ogle RA. Regulation of cranial suture morphogenesis. Cells Tissues Organs 2004;176:54–66.
25. Lind M, Eriksen EF, Bünger C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and-6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. Bone 1996;18:53–57.
26. Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE. BMP-2. BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J Cell Biochem 2002;87:305–12.
27. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA The role of growth factors in the repair of bone: Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am 2002;84:1032–1044.
28. Marcelli C, Yates AJP, Mundy GR. In vivo effects of human recombinant transforming growth factor beta on bone turnover in normal mice. J Bone Miner Res 1990;5:1087–1096.
29. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. Endocrinology 1989;124:2991–2994.
30. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies, and implants fixation. Acta Orthop Scand Suppl 1998;83:2–37.
31. Bruder SP, Fink DJ, Calpan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, repair, and skeletal regeneration therapy. J Cell Biochem 1994;56:283–294.
32. Maeda T, Kawabe T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. Endocrinology 2003;144:681–692.
33. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, Kabo JM, Finerman GA, Berk AJ, Witte ON. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. J Bone Joint Surg Am 1999;81:905–917.

歯髄生物学分野

須田 英明

医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻
歯髄生物学・教授

1）研究の課題名

Pulp Biology Field

1. MEPEのC末断片は象牙芽細胞の分化を抑制する

Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment

Matrix extracellular phosphoglycoprotein（ MEPE ）は細胞外マトリックスタンパクの一つで、主に石灰化組織に発現している。本研究の目的はMEPEの歯髄における局在を調べ、さらにその機能について検討することである。生後3日のWistarラット歯髄において、石灰化途上にある象牙芽細胞にMEPEは強く発現していた。象牙芽細胞株OLCにMEPEを強制発現あるいは発現抑制したところ、分化がそれぞれ抑制および促進された。MEPEは細胞内において合成された後、N末とC末に切断されるが、N末はOLCの分化に影響が無かったのに対し、RGD配列を有するC末はOLCの分化を抑制した。MEPEは象牙芽細胞の分化において、象牙質形成あるいはホメオスタシスを保つ上で重要な働きをしていると推察された。

2. MEPEはFurinにより活性化され、歯髄細胞の接着を促進する

MEPE activated by Furin promotes pulpal cell adhesion

Matrix extracellular phosphoglycoprotein（ MEPE ）は骨芽細胞、骨細胞、象牙芽細胞に発現が認められ、骨および象牙質代謝に重要な役割を担っている。このMEPEが活性化されるためには、翻訳後修飾が重要である。本研究は、furinによりMEPEの146R↓147部が切断され、RGD配列を含む切断されたC末が象牙芽細胞の接着に重要なことを本研究は明らかにした。

3. 未分化間葉系のKusaA1細胞の骨芽細胞分化は転写調節制御因子であるRbpjにより促進する

Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj

未分化間葉系の幹細胞は多様な細胞への分化が可能であるが、そのメカニズムはいまだ不明である。我々はNotchの主用な核内メディエーターである Rbpj（ recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa j region）が骨芽細胞分化に関与していうる事を報告する。Rbpjを強制発現させたKusa-A1細胞は、in vitro、in vivoともに骨芽細胞分化が促進していた。また、RbpjはRunx2およびOse2のプロモーター活性を増加させた。以上の結果より、Rbpjは骨芽細胞分化において重要な働きをしていることが示唆された。

4. 歯髄細胞におけるNotchシグナル関連因子の発現と歯髄細胞分化にともなう発現変動

Expression of Notch signalling-related genes in normal and differentiating rat dental pulp cells

Notchは胎生期のみならず成体においても様々な組織の分化、機能に重要な働きを担っている。Hey1はNotchの重要な転写調節因子であるが、今回、歯髄細胞におけるHey1の発現動態について検討した。Wistarラット歯髄より得られた歯髄細胞を石灰化誘導条件で培養すると、象牙芽細胞特異的なマーカーであるDentin sialophosphoprotein発現が増加する一方、Hey1の発現は抑制された。このことから、Hey1を介するNotchシグナルは歯髄細胞の象牙芽細胞への分化を負の方向へ制御している可能性が示唆された。

5. ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシンK阻害剤の抑制効果

カテプシンKは破骨細胞に発現し、骨吸収において重要な役割を果たしている。カテプシンK阻害剤であるNC-2300（日本ケミファ）は、新たに開発された関節リウマチの治療薬であり、関節リウマチモデルにおいて、関節の骨破壊ばかりでなく炎症反応も抑制することが報告されている。本研究の目的は、ラットに実験的に誘発した根尖性歯周炎のモデルを用い、根尖性歯周炎の進展におけるNC-2300の抑制効果を検討することである。ラット下顎第一臼歯を露髄後、抜髄し、口腔内に開放することにより根尖性歯周炎を誘発した。露髄開放時よりNC-2300を1日2回経口投与した。21日後に屠殺して下顎臼歯を周囲の顎骨ごと摘出し、左側はマイクロCT撮影により根尖病変の大きさを測定した後、組織学的に検討した。右側は、根尖周囲の病変部を根尖とともに一塊として摘出し、RNA抽出後、リアルタイムPCRにて起炎症性サイトカインの発現量を測定した。マイクロCTによる評価の結果、NC-2300投与群における根尖病変の大きさは、コントロール（非投与）群と比較して有意に小さかった。また、組織学的検討により、コントロール群においては多数の破骨細胞が根尖周囲の歯槽骨上に観察され、活発な骨吸収が行われている像が認められたのに対し、NC-2300群では破骨細胞は認められるものの、その数および密度は有意に少なかった。MHC class II分子発現マクロファージの密度も、NC-2300群ではコントロール群に比べ有意に少なかった。病変中の炎症性サイトカイン発現を比較したところ、NC-2300投与群においてはIL-1 αおよびIL-6の発現が有意に抑制されていた。以上の結果より、NC-2300の投与によって、破骨細胞におけるカテプシンK阻害作用による骨吸収抑制に加えて、炎症性サイトカインの発現が減少することにより破骨細胞形成が抑制され、その結果として根尖周囲の骨吸収が抑制された可能性が示唆された。

6. 歯根膜機械受容神経線維の応答性に対する歯髄の炎症性変化の影響

歯根膜に分布する求心神経は三叉神経の末梢枝であり,解剖学的な神経終末形態は自由神経終末とルフィニ神経終末様神経終末である。特に後者は機械的刺激に対して応答する歯根膜機械受容器としての機能的意義を有している。これまでの研究により,歯髄と歯根膜の両者をその分岐した枝が同時に支配している神経線維が存在することも示されている。他方,象牙質の口腔内への露出による外来刺激や,初期う蝕による細菌学的刺激に対して歯髄が反応し,可逆性歯髄炎の状態に陥る。この状態が適切な処置が施されないままに放置されると,歯髄内には軸策反射によって神経原性炎症が惹起され,ついには根尖孔を介して歯根膜内にも波及することになる。細菌感染などの刺激が歯髄に加わった場合に生ずる不可逆性歯髄炎の場合には,この過程がより顕著に現れるものと考えられる。

ところで,広義の歯髄疾患を対象とした根管治療の過程で,強い自発痛あるいは咬合痛のような臨床症状が消退した後にも,打診に対して軽度の痛みや違和感が残存して,この症状が軽快するのに長期間を要する症例に遭遇することがある。この病態の背景には,歯髄除去療法による根尖孔付近での歯髄神経求心線維の切断,感染根管を有する歯の根尖部での炎症性化学物質による歯根膜求心神経線維への刺激,あるいは根管処置時における根尖孔外への器具突出に伴う刺激に起因する根尖部歯周組織の炎症性変化や神経線維の機械的傷害など,種々の要因が考えられる。しかし,歯髄の初期の病的変化に伴う,歯根膜に分布する神経線維の活動性の変化を神経生理学的に明らかにした研究は,これまでに報告されていない。

本研究においては,動物を用いた実験系を構築し,歯髄の炎症性変化に伴う歯根膜機械受容神経線維の応答性の変化を,単一神経線維の応答性を指標に観察して神経生理学的に検索することを目的とした。

7. マスタードオイル歯髄適用により誘発された感作視床内の神経-免疫系の相互作用

Neuron-immune interactions in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to rat molar pulp.

ラット歯髄へのマスタードオイル適用は視床ニューロンの活動性を増強させる,すなわち感作が生じる。ニューロンの活動性の記録,免疫組織化学的分析,並びに分子生物学的分析を,この視床の変化に関係する機構を解明するために実施した。マスタードオイル適用後,視床MD核のニューロンの応答性が増強した。MD核にMK-801を投与すると,一度増強したヌーロン活性は減少した。NMDA型受容器のサブユニット2D、GFAP,並びに抗原提示細胞関連遺伝子のmRNAはマスタードオイルを歯髄適用後10分時において対側視床で亢進した。しかし,拮抗薬の投与後10分時にはこれらは減少した。OX6を発現しているマイクログリア及びGFAPを発現しているアストロサイト数は,マスタードオイル歯髄適用後60分までその数が増加することは無かった。

8. 実験的歯髄病変由来の根分岐部病変の成立に関与するToll-like receptorと抗原提示細胞関連分子の遺伝子発現の増加

Increased gene expression of Toll-like receptors and antigen presenting cell-related molecules in the onset of experimentally induced furcation lesions of endodontic origin in rat molars

歯髄の炎症により惹起された根分岐部の炎症の初期の免疫病理学的機構は未だ十分に解明されていない。抜髄後開放したラット臼歯の分岐部歯根膜内のToll-like recepotors（TLRs）に対する免疫組織化学的および量的遺伝子発現分析を実施した。根分岐部歯根膜内のTLRならびに抗原提示細胞関係分子のmRNA発現レベルは抜髄後開放した臼歯周囲において有意に亢進した。同部位の免疫組織化学ではTLR発現細胞が分岐部直下の歯根膜内に分布していることを明らかにした。

9. 歯髄・歯肉組織由来の間葉幹細胞による歯槽骨・顎骨再生

【GCOE拠点内における異なる分野のInnovationを確立する研究】

Reconstruction of alveolar bone from mesenchymal stem cells derived from dental pulp and gingiva

ヒト歯髄および歯肉において間葉系幹細胞分画が存在することを我々は明らかにしてきた。さらに、ラット歯髄および歯肉においても同様の分画が存在することを明らかにし、その特性について現在解明中である。

Endodontic Field

10. 歯科用コーンビームCTにおけるモーションアーチファクトの影響

Effect of motion artifact on cone-beam CT images

歯科用コーンビームCT（CBCT）撮影中の患者の体動が画像に与える影響を検討するための研究を行った.実験には1軸移動ステージを用い,撮影中に1度だけ試料を水平方向に移動させ,照射時間37秒でCBCT（ファインキューブ,吉田製作所）撮影した.ブタ下顎骨を試料とした実験では,撮影したCBCT画像を5名の歯科医師が評価した.結果は,試料の移動距離が0.126 mm以下の条件では,対照と有意差が認められなかったが,0.25mm以上の条件では有意に画質が低下した.また,エックス線照射開始6,12,18秒後に移動した群では,対照と比較して有意に画質が低下したが,24,30秒後に移動した群では,対照と統計学的に有意差は認められなかった.このことから今回の実験条件では,被写体の0.25 mm以上の移動によりCBCT画像が劣化した.また,同じ0.25 mm移動を行った場合においても,移動する時期により画質への影響が異なることが示された.次に,形が規格化されたアルミニウム円柱ファントムを用い同様の実験を行った.直径2,3,5 mmのアルミニウム製円柱を試料とし,鉛直に立てた状態でCBCT撮影を行い,軸位断像を観察した.エックス線照射開始18秒後に移動した場合には,移動した試料の大きさ,形態は保持され,移動前と移動後の2つの円が,移動距離分だけ離れた位置に重ね合わせた画像として観察された.エックス線照射開始12,18秒後に移動した場合,断面が2つの円の重なりに近い形態として観察されたが,6,24,30秒後では,外形が1つの円に近い形態であった.対照およびエックス線照射開始18秒後以外の条件では,円の濃度は一様ではなく,部分的に濃淡が認められた.以上の結果からCBCT撮影中の被写体の移動距離および時期がCBCT画像に影響することが結論された.

11. 新規ねじりファイルの相変態挙動と曲げ特性

Phase transformation behavior and bending property of newly twisted nickel–titanium endodontic instruments

近年,NiTiファイルの新しい加工法である,ねじり加工を用いたTwisted File（TF）が開発された.本研究の目的は,TFの相変態挙動と曲げ特性の関連性を調べることである.材料として,先端径0.30 mm,0.06 テーパーのTFと,対照としてK3を用いた.相変態挙動については示差走査熱量測定（DSC）を行い,相変態温度をDSC曲線より算出した.曲げ特性について片持ち梁式曲げ試験法を用い,37 ℃温度条件下で,負荷過程における曲げ荷重を評価した.相変態温度の比較にはStudent’s t-testを,曲げ荷重についてはMann–Whitney U-testを用い,有意水準5 %で統計学的に解析した.その結果,TFの相変態温度はK3より有意に高く,曲げ荷重は弾性領域と超弾性領域ともにK3より有意に低かった.熱処理をともなったねじり加工は,相変態温度の上昇と,より優れた柔軟性に寄与しているかもしれない.

12. レジン系根管充填用材料の根管封鎖性について

Root canal sealing ability of resin-based root canal sealer

近年様々な種類のレジン系根管充填用シーラーが開発および販売されている.しかしながら,レジン系根管充填用シーラー使用に際して推奨される根管形成方法や根管充填方法についてはいまだ意見が統一されていない.そこで,本研究では各種根管形成および根管充填方法

におけるレジン系根管充填用材料の根管封鎖性について比較検討を行った.シングルポイント根管充填およびmatched taperd シングルポイント根管充填を行った被験歯に対して色素浸透試験を行った.その結果,シングルポイント根管充填を行った群では他群と比較して有意に多い色素漏洩を示した.また,水平断面像の観察においては,シングルポイント根管充填を行った群では,全ての断面において最も多いシーラー占有面積を認めた.本研究の結果,レジン系根管充填用シーラーではシーラー占有量の少なくなる充填方法が推奨されることが示唆された.

13. 歯科用レーザー使用時における眼球への安全性

Safety of dental Laser use under microscopes to eyes

本研究の目的はレーザー用防護眼鏡またはフィルターおよび歯科用顕微鏡を介するレーザー光の透過エネルギーを検討することにより、レーザー使用時の眼球への安全性について考察することである。実験にはNd:YAGレーザー、Er:YAGレーザー、半導体レーザーの3種類の歯科用レーザーを用いた。実験1では、各レーザーの導光用ファイバーまたはチップ先端とレーザー用サーモパイル吸収ヘッドとの距離を5cmとし、吸収ヘッドに各種防護眼鏡を固定、パワーメーターで200mJ, 10pps, 10sの条件にて透過エネルギーを測定した（n=3)。防護眼鏡は、Nd:YAGレーザー用、Er:YAGレーザー用、半導体レーザー用、および防塵眼鏡の4種類を使用し、レーザー光の直接照射をコントロールとした。実験2では、実験1で使用した各種防護眼鏡の特性を変えずに平板化し、専用防護フィルターを作成した。レーザー光の透過エネルギーについて、各レーザーにおける眼球に対する最大許容露光量（MPE, IEC60825-1）を基準として比較検討した。その結果、実験1では各レーザーに対する専用防護眼鏡を使用した場合、全てのレーザーにおいて透過エネルギーは0になった。しかし、Nd:YAGレーザー照射時は専用防護眼鏡以外で、また半導体レーザー照射時は専用防護眼鏡およびNd:YAGレーザー用防護眼鏡以外で、透過エネルギーはMPEを超える値となった。 実験2では各レーザーに対する専用防護フィルターを使用した場合、全てのレーザーにおいて防護フィルターの位置に関わらず透過エネルギーは0になった。 他の防護眼鏡の使用や裸眼では、MPEを超える透過エネルギーが眼球に到達し、障害が生じる可能性がある。本実験条件下では、顕微鏡下でのレーザー使用の際、専用防護眼鏡の位置が接眼レンズ前でも対物レンズ後でも透過エネルギーが0となり、レーザーは顕微鏡下でも安全に使用できると思われた。したがって、対物レンズに防護フィルターを装着して散乱光を遮断できれば、専用防護眼鏡の代替としうる可能性がある。

14. レーザー照射による象牙質の歪

Dentin strain induced by Laser irradiation

歯科治療において歯根破折が注目されており、象牙質の歪が影響する可能性が考えられている。レーザー照射時における歪に関する報告はほとんどないため、本研究ではEr:YAGレーザーおよびNd:YAGレーザーを注水および非注水に分けて根管内照射を行い、その歪と温度変化について検討した。歪変化はストレインゲージを用いて、また温度変化は熱電対を用いてそれぞれ根尖部に設置して計測した。レーザー照射は1Wの条件で5秒間照射した。今回の結果では注水下Er:YAGレーザー照射群はNd:YAGレーザー群に比較して有意に小さな象牙質の歪および温度変化を示し、両レーザー群ともに注水された群は非注水の群よりも歪変化は小さい結果となった。熱により発生する歪としてはエネルギーを吸収した歯牙組織の熱膨張が考えられる。また注水による冷却は両レーザーに生じる歪を減少させた。

熱の発生は歪変化に対し大きな影響を与えると考えられ、各歯根象牙質の異なる形態や構造や性質や歯根破折に対する耐久性は異なると考えられるものの、より大きな歪は微小歯根破折のより大きな危険性につながると考えられる。レーザーに応じて注水、照射条件等を制御することの必要性が示唆された。

15.逆根管充填材により誘発される象牙質の歪みと破折に関する研究

Dentin strain and fracture propagation caused by retrofilling materials

歯根端切除術の際には、逆根管充填窩洞を形成し充填を行う。NTAは現在最も推奨される逆根管充填材であり、その良好な封鎖性は硬化膨張によるものとされている。しかしその反面、膨張により象牙質に歪みが生じ歯根破折が誘発される懸念がある。本研究の目的歯、MTAを用いた逆根管充填により誘発される象牙質のゆがみを測定し、歯根破折の発生を調査することである。30本のヒト抜去前歯に根管形成およびガッタパーチャによる根管充填を行い、根尖部3mmを切除した。注水下あるいは無注水で超音波チップにより逆根管充填窩洞を形成し、Super EBAあるいはMTAにて充填した。根尖1/3に貼付した歪みゲージを用いて、逆根管充填材により生じ

たひずみを計測した。また、SEMにて破折の有無を観察した。平均最大歪みは、Super EBA と比較し有意にMTAで大きかった。破折は無注水群で散見された。逆根管充填材は、直接的に破折を生じてはいなかったが、逆根管充填窩洞形成により生じた破折線を促進していた。逆根管充填材と象牙壁間の間隙は、MTAで最小だった。本研究結果は、逆根管充填窩洞形成中に適切な冷却がなされないと、逆根管充填剤微小破折の危険性があることを示唆している。

16. 超音波吸引洗浄法の開発

Development of the negative pressure irrigation method

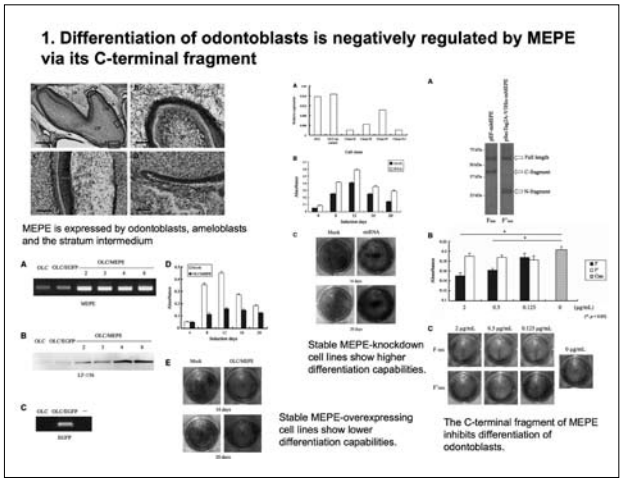
全根管系を機械的に根管形成することは不可能である.臨床的に成功するためには,改良された洗浄法が不可欠である.次亜塩素酸ナトリウム水溶液は,有機質溶解作用および殺菌性が高く最良の根管洗浄剤として良く知られている.次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いての,根尖孔近くの陽圧の洗浄は非常に危険である.最近,次亜塩素酸ナトリウム水溶液の根尖歯周組織への注入による,重篤な障害の症例を多くの学会誌で見ることができる.より良くより安全な洗浄として,陰圧による洗浄が選択されるべきである.我々は新しい陰圧洗浄法として超音波吸引洗浄法（UAT）を開発した.UATでは,吸引針自体が超音波振動し,洗浄効果を上げるとともに吸引針の詰まりを防止することができる.

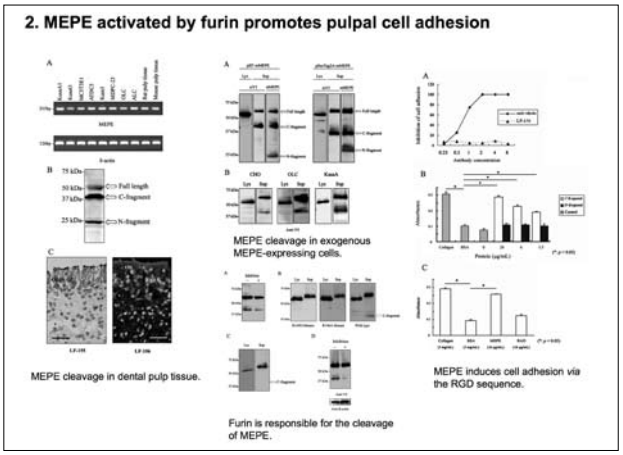
UATの利点は,

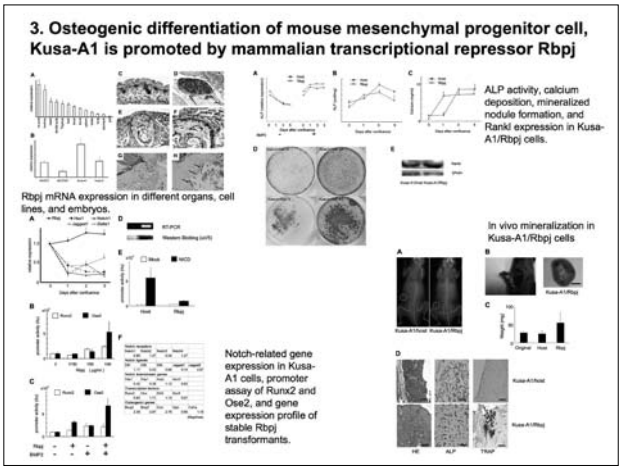
・根尖部根管を洗浄出来る最も安全な方法である.

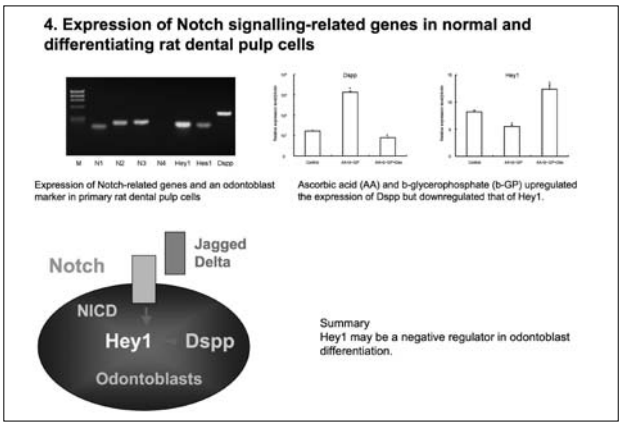
・デブリ除去効果が様々な洗浄法の中で最も高い.

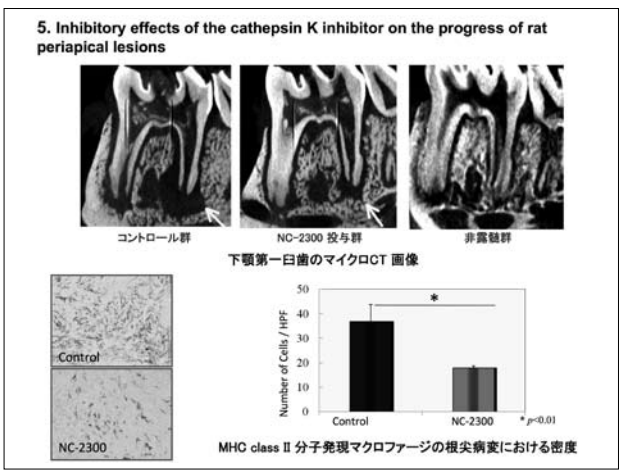
2)



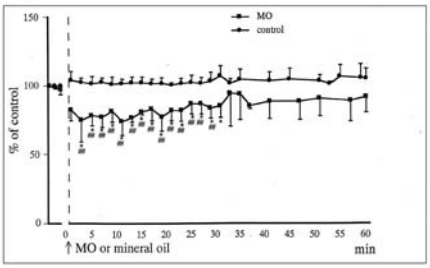






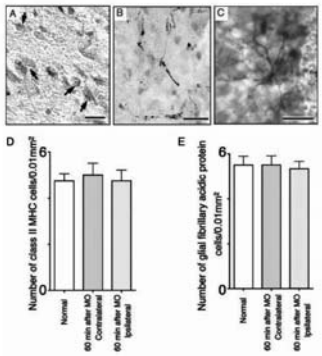


6. Effects of pulpal inflammation on the activities of periodontal mechanoreceptive afferent fibers

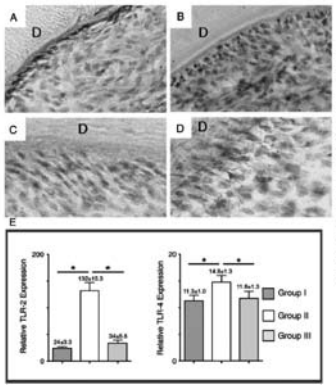


MO歯髄適用群(n=6)とmineral oil歯髄適用群(n=6)における単一歯根膜神経線維の応答閾値の変化。基線応答に対して(*:p<0.05, Wilcoxon test) およびmineral oil歯髄適用群に比較して(##:p <0.01, Mann Whitney U-test)MO歯髄適用群では応答閾値が有意に減少した。

7. Neuron-immune interactions in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to rat molar pulp.



8. Neuron-immune interactions in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to rat molar pulp.



Immunohistochemistry and gene expression analysis of TLR-2 and TLR-4 at the furcal region of the PDL. (A-D) Representative images of (A) TLR-2 in group 1 (untreated control; original magnification, 20), (B) TLR-2 in group 2 (unsealed pulpotomy; original magnification, 20), (C) TLR-4 in group 1 (original magnification, 40), and (D) TLR-4 in group 2 (D: dentin; original magnification, 40). (E) Real-time polymerase chain reaction analysis of TLR-2 and TLR-4 relative messenger RNA expression in the furcal PDL tissue in each group. Data presented from real-time polymerase chain reaction experiments reflect the expression level of TLR-2 or TLR-4 normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (mean and standard error of the mean, n = 4 in each group). The single asterisks stand for $p < 0.05$ (Tukey test).

9. GCOE拠点内における異なる分野のInnovationを確立する研究提案

歯髄・歯肉組織由来の間葉幹細胞による歯槽骨・顎骨再生

Reconstruction of alveolar bone by mesenchymal stem cells derived from dental pulp and gingiva

研究目的:
近年、顎骨の再建の需要が高まっているが、そのための細胞ソースとして、歯髄、歯肉組織由来の間葉幹細胞の使用を検討し、その臨床的な応用手法の確立を目指す。

研究手法:
ヒトおよびラット歯肉、歯髄由来のコロニー形成細胞を継代(P2-4)後、下記解析を行う。

FACSによる細胞表面抗原の解析
SCIDマウスに実験的に作成した骨欠損への移植
SCIDマウスへの象牙質との移植
移植細胞の遺伝子プロファイル解析

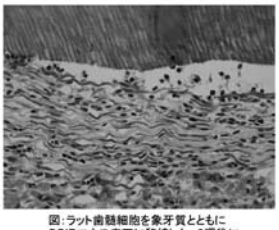
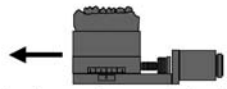


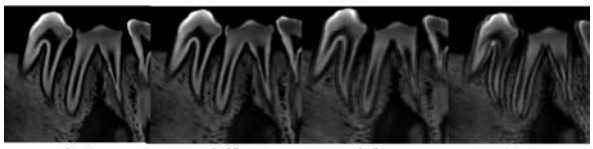
図:ラット歯髄細胞を象牙質とともにSCIDマウス皮下に移植した。3週後に歯髄様の組織が観察された。

10. Effect of moving distance



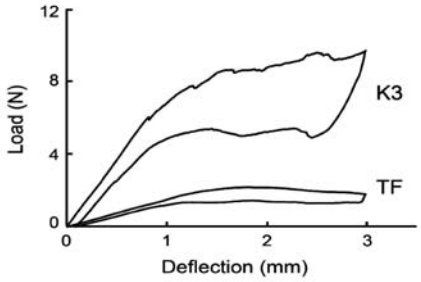
Sample mounted on a motorized x-axis stage

Clinical case

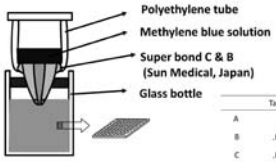


Cont. 0.25 mm 0.5 mm 1 mm

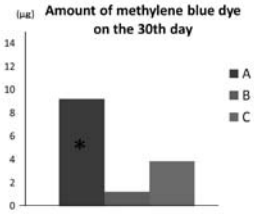
11. Phase transformation behavior and bending property of newly twisted nickel–titanium endodontic instruments

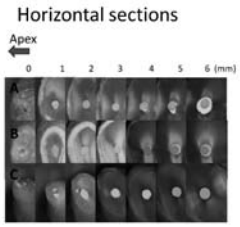


12. Root canal sealing ability of resin-based root canal sealer

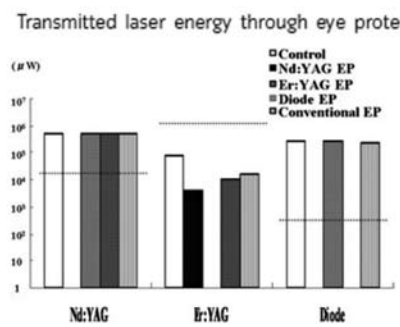


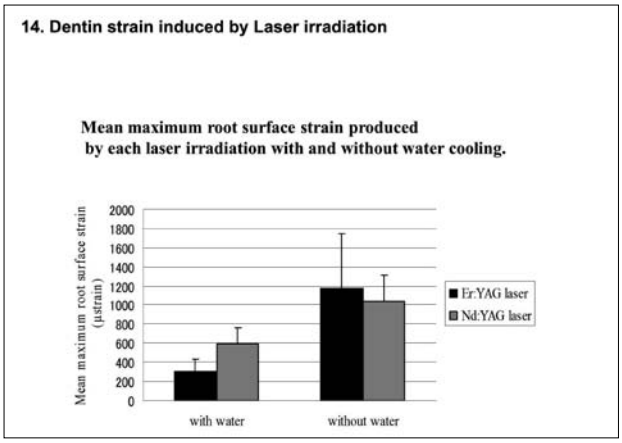
	Taper of prepare	Sealer	Point	Obturation method
A	.10	MetaSEAL™ (Parkell, USA)	.02 GP	SC
B	.06 (.06 Pro*file*)	MetaSEAL™	.02 GP	SC
C	.06 (.06 Pro*file*)	MetaSEAL™	.06 GP	SC

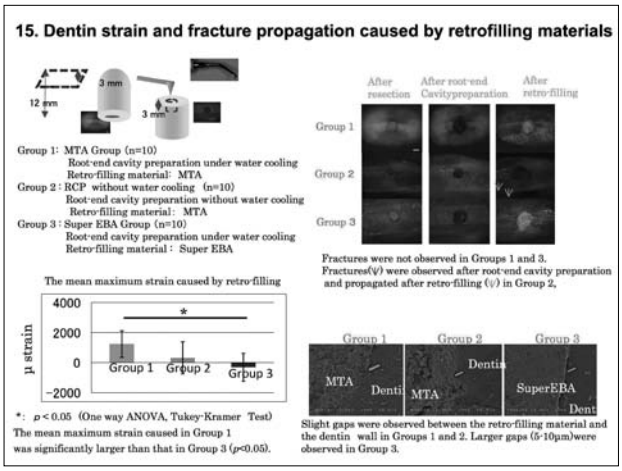


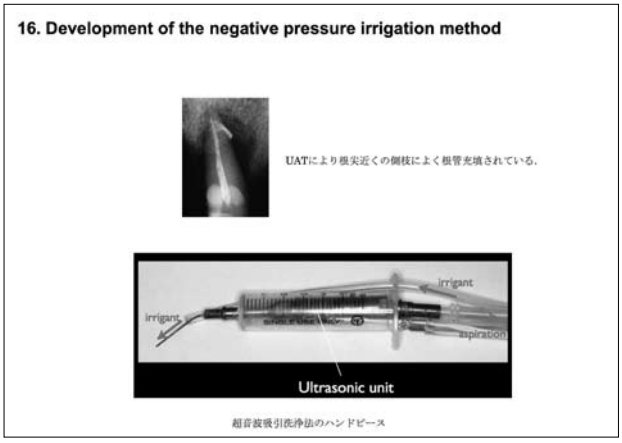


13. Safety of dental Laser use under microscopes to eyes









3) 研究内容についての英文要約

1. Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is an extracellular matrix protein that is mainly expressed in mineralizing tissues, including the dental pulp. The purposes of this study were to clarify the localization of MEPE in the tooth germ and to investigate the roles of MEPE in the differentiation of odontoblasts. The immunohistochemical staining in the tooth germ of the upper first molars of male Wistar rats (postnatal day 3) revealed that MEPE was mainly localized in odontoblasts during dentinogenesis. Stable MEPE-overexpressing and MEPE-knockdown cell lines, which were established in odontoblast-lineage cells (OLCs), showed lower and higher differentiation capabilities, respectively. Eukaryotic proteins of the N-terminal fragment of MEPE produced in HEK cells had no effect on the differentiation of OLCs, whereas the C-terminal fragment containing an RGD sequence inhibited their differentiation. These results indicated that the C-terminal fragment of MEPE containing an RGD sequence, cleaved in odontoblasts, appeared to be the active form of MEPE, which may play important roles in dentinogenesis and pulpal homeostasis by keeping the odontoblasts in immature condition.

2. MEPE activated by furin promotes pulpal cell adhesion

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is predominantly expressed in osteoblasts, osteocytes, and odontoblasts and plays key biological roles in bone and dentin metabolism. Posttranslational modifications are essential for its activation. This study tested the hypothesis that MEPE is activated through proteolytic processing by furin in dental pulp. MEPE was present in three sizes, 1 full-length and 2 cleaved fragments; the cleavage site was 146R ↓ 147. The proprotein convertase family, particularly furin, was a candidate enzyme. Introducing a substitution at the cleavage
site inhibited hydrolysis, but there was no cleavage of MEPE expressed in furin-deficient LoVo cells. Therefore, furin is a strong candidate for the proteolytic cleavage of MEPE. The C-terminal cleavage product promoted cell adhesion via its RGD
motif. These results indicate that proteolytic processing by furin may activate MEPE during its secretion from odontoblasts and may play important roles in dentinogenesis and pulpal homeostasis.

3. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj

Pluripotent mesenchymal stem cells possess the ability to differentiate into many cell types, but the precise mechanisms of differentiation are still unclear. Here, we provide evidence that Rbpj (recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa j region) protein, the primary nuclear mediator of Notch, is involved in osteogenesis. Overexpression of Rbpj promoted osteogenic differentiation of mouse Kusa-A1 cells in vitro and in vivo. Transient transfection of an Rbpj expression vector into Kusa-A1 cells
upregulated promoter activities of Runx2 and Ose2. Enhanced osteogenic potentials including high alkaline phosphatase activity, rapid calcium deposition, and increased

calcified nodule formation, were observed in established stable Rbpj-overexpressing Kusa-A1 (Kusa-A1/Rbpj) cell line. In vivo mineralization by Kusa-A1/Rbpj was promoted compared to that by Kusa-A1 host cells. Histological findings revealed that expression of Rbpj was primarily observed in osteoblasts. These results suggest that Rbpj may play essential roles in osteoblast differentiation.

4. Expression of Notch signalling-related genes in normal and differentiating rat dental pulp cells

Notch signalling is of fundamental importance to various processes during embryonic development and in adults. The possible role of Hey1, an important Notch signalling component, in odontoblast differentiation was evaluated in this study. Primary cultured dental pulp cells, derived from upper incisors of 5-week-old Wistar rats, were placed in a-modification of Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), and ascorbic acid (AA) and b-glycerophosphate (b-GP), with or without dexamethasone, and cultured on dishes coated with collagen type IA for 7 days.

Conventional and real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to determine the expression of Notch-related genes and dentin sialophosphoprotein as a marker of odontoblast differentiation. Dentin sialophosphoprotein and Hey1 expression was significantly increased and decreased in the presence of AA + b-GP compared with controls, respectively. These findings suggest that Hey1 may be a negative regulator in odontoblast differentiation.

5. Inhibitory effects of the cathepsin K inhibitor on the progress of rat periapical lesions

In this study, we investigated the inhibitory effects of the cathepsin K inhibitor (NC-2300) on the progress of rat periapical lesions. The periapical lesions were induced experimentally in the rat first lower molars, and NC-2300 was administrated orally in the experimental group. In the micro CT and the histological analyses, the size of the periapical lesion and the number and the density of osteoclasts and MHC class II molecules-expressing macrophages in the experimental group were significantly small compared to the control group. The expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 α and IL-6) in the experimental group was also significantly suppressed compared to the control group. These results suggest that NC-2300 may inhibit not only the cathepsin K activation in the osteoclasts, but also the osteoclastgenesis which is induced by the inflammatory cytokines, resulting that the bone resorption in the periapical lesion was suppressed.

6. Effects of pulpal inflammation on the activities of periodontal mechanoreceptive afferent fibers

Response properties of periodontal single afferents were investigated in cats with inflammatory irritant-induced pulpitis. A deep dentin cavity was prepared on the right mandibular canine in order to apply an inflammatory agent and small fiber excitant, allyl-isothiocyanate (mustard oil: MO), and single afferents innervating the canine periodontal mechanoreceptor were dissected out from the mandibular nerve bundle by examining impulse responses while applying mechanical stimuli to the tip of the crown. Evoked impulses by mechanical stimuli were increased in number for one hour with MO application to the pulp when compared with those with mineral oil. The mechanoreceptive thresholds of single nerve fibers were decreased after the MO application to the pulp when compared with those with mineral oil. These results suggest that the alteration of responses in the periodontal afferent fiber, or the peripheral sensitization, can be produced by MO-induced pulpal inflammation probably due to the axon reflex mechanism in the furcating branches of nerve fibers innervating both the tooth pulp and periodontal ligament.

7. Neuron-immune interactions in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to rat molar pulp.

The application of mustard oil to the rat dental pulp induced neuronal activation or the sensitization in thalamus. The neuronal responsiveness recording, immunohistochemistry, and molecular biological analysis were performed to address the mechanisms involved in these thalamic changes. After mustard oil application, neuronal responsiveness was increased in the mediodorsal (MD) nucleus. When MK-801 was applied to the MD nucleus, the enhanced responsiveness was decreased. N-methyl D-aspartate receptor subunit 2D, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and antigen-presenting cell-related gene mRNAs in the contralateral thalamus were up-regulated at 10 minutes after mustard oil application, but were down-regulated within 10 minutes after the antagonist application. OX6 expressing microglia and GFAP-expressing astrocytes did not increase until 60 minutes after mustard oil application.

8. Increased gene expression of Toll-like receptors and antigen presenting cell-related molecules in the onset of experimentally induced furcation lesions of endodontic origin in rat molars

Early immunopathologic mechanisms behind pulp infection-induced furcal inflammation have not been well understood. The immunohistochemical and quantitative gene expression analysis for toll-like receptors (TLRs) were conducted in the furcal periodontal ligament (PDL) of rat molars subjected to unsealed pulpectomy. Messenger RNA expression levels of TLRs and the antigen presenting cell (APC) -related molecules in the furcal PDL were significantly up-regulated in teeth with unsealed pulpectomy. Immunohistochemistry for unsealed

pulpotomized teeth revealed that TLRs-expressing cells were predominantly distributed within the PDL beneath the furcal dentin.

9. Reconstruction of alveolar bone from mesenchymal stem cells derived from dental pulp and gingival

We have successfully identified the mesenchymal stem cell population in the human dental pulp and gingival. We separated the mesenchymal stem cell population in the rat dental pulp and gingiva, and tried to transplant into SCID mouse with dentin subcutaneously. Transplanted pulpal stem cells survived on the dentin for 3 to 6 weeks.

Endodontic Field

10. Effect of motion artifact on cone-beam CT images

We have conducted a study to determine the effect of motion artifact on cone-beam CT images. The specimen was moved horizontally by a motorized x-axis stage. The CBCT images were taken using CBCT（Fine Cube, Yoshida, Japan）. The exposure time was 37 seconds. One mandibular jaw of the pig was used in exp. 1. Five dentists individually assessed the CBCT images. Under the conditions of this study, it was revealed that the sample motion of 0.25 mm and over deteriorated visibility of the anatomical structure. Our data indicate that the time of sample moving affects on the image quality. Cylindrical phantom made of aluminum, diameter of 2, 3, 5mm were used and the CBCT axial images were assessed in exp. 2. When the moving timing was 18 seconds after starting X-ray exposure, the shape and size of the samples were well maintained, and two circles in each image showed a moving distance. We conclude that the magnitude and timing of sample movement significantly affects the quality of CBCT images.

11. Phase transformation behavior and bending property of newly twisted nickel–titanium endodontic instruments

Recently, a new manufacturing process was developed to create a nickel–titanium（NiTi）endodontic instrument named the Twisted File（TF）. The aim of this study was to investigate the relationship between phase transformation behavior and bending property of NiTi endodontic instruments manufactured by a twisting process. The phase transformation behavior and bending property of Twisted Files（TF; SybronEndo, Orange, CA, USA）and K3（SybronEndo）with.06 taper and size 30 tip were investigated. K3 was used as control group. Phase transformation behavior was estimated by differential scanning calorimetry（DSC）. Transformation temperatures were calculated from the DSC curve. Bending load of the instruments was measured by cantilever-bending test at 37 ° C. Student’ s t-test was used to compare DSC data of the two groups and Mann–Whitney U-test was used to detect the difference of the bending load values between TF and K3（$P = 0.05$）. The phase transformation temperatures of TF were significantly higher（$P < 0.05$）than those of K3. The bending load values were significantly lower for TF than that of K3（$P < 0.05$）, both in the elastic and super-elastic ranges. The new method of manufacturing NiTi instruments by twisting coupled with heat treatment might contribute to the increased phase transformation temperatures and superior flexibility.

12. Root canal sealing ability of resin-based root canal sealer

In recent years obturating sealers has been developed based on dentin adhesion. However, there has no information that which condensation method provides good sealing ability with resin based root canal sealers. The aim of this study was to evaluate factors influencing the sealing ability of resin based root canal sealers. The teeth were prepared and obturated with single condensation method or matched tapered single condensation method using resin based root canal sealers. Then, dye penetration test was done and horizontal sections were made. The images of the horizontal sections were taken by a digital microscope, and sealer occupancy in the root canal was evaluated. The amount of leaked dye in single condensation method group was significantly more than that in the other experimental groups（$p< 0.05$）. In the images of horizontal sections, single cone method group showed the highest sealer occupancy at all levels. It was suggested that sealer occupancy may influence the root canal sealing ability of resin based root canal sealers.

13. Safety of dental Laser use under microscopes to eyes

The purpose of this study was to investigate the transmissivity of various types of lasers through the microscope with and without eye protectors. Nd:YAG laser, Er:YAG laser, and diode laser were irradiated to a power meter through laser eye protectors or a microscope. In control experiment, three lasers were irradiated directly or through eye protectors to the power meter positioned at a distance of 5 cm from the fiber tip or the contact tip. In main experiment, the fiber tip was positioned from the objective lens surface of the microscope. The power meter was placed behind the eyepieces. Matched eye protectors for each laser were placed in front of the objective lens or between the eyepieces and the power meter. The results obtained were as follows: No transmitted laser energy was detected when matched eye protectors were used. Mismatched eye protectors were not effective to shut out laser energy, especially for Nd:YAG and diode lasers. Little or no transmitted laser energy was detected through the microscope even when no eye protectors were used. It was

concluded that we could use laser devices safely with the dedicated laser eye protectors in clinical situations, although under a microscope.

14. Dentin strain induced by Laser irradiation

The purpose of this study was to investigate the strain and temperature change in dentin induced by laser irradiation of human root canals with or without water cooling. Twenty-eight palatal roots of extracted human maxillary first molars were used. The strain indentin was measured using strain gauges fixed on the apical third of the buccal root surface. The temperature change of the root dentin was monitored using thermocouples embedded into dentin near the apex. The root canal was irradiated with Er:YAG or Nd:YAG laser at an output of 1 W（100 mJ, 10 pps）for 5 s. The tip of the irradiation fiber was located 2.0 mm from the root apex. With water cooling,the mean maximum strain induced by Er:YAG laser was significantly lower than that by Nd:YAG laser（P< 0.05）. However, without water cooling, no significant difference between the two lasers（P> 0.05）was found. The results suggest that the strain induced by Er:YAG laser irradiation in dentin with water cooling may be minimal, but there still might be a risk of root micro fracture if cooling is not sufficient.

15. Dentin strain and fracture propagation caused by retrofilling materials

The purpose of this study was to investigate the kinetics of dentin strain and fracture propagation caused by retrofilling materials. Thirty roots of extracted human anterior teeth were prepared and laterally condensed with gguttapercha,. Then a 3 mm of the root end was resected. Root-end cavities were prepared using an ultrasonic device（high power setting）with or without water cooling. The cavities were dried and filled with Super EBA or MTA. Strain of dentin caused by the retrofilling materials was measured using strain gauges mounted on the apical third of the root surface., Finally presence or absence of fracture was examined by microscopy and SEM.　The mean maximum strain caused by MTA was significantly larger than that by Super EBA（p<0.05）. In Microscopic observation, fractures were found in some samples of the ultrasonic group without water cooling, Although fractures were not caused by retorofilling materials, some fracture lines caused by root-end cavity preparation were propagated by retrofilling materials. In SEM observations, minimal gaps were observed between the retorofilleng material and the dentin wall in MTA group. The results suggest that there might be a risk of micro root fracture propagation by retro -filling materials if cooling is inefficient during root-end preparation.

16. Development of the negative pressure irrigation method

Total root canal systems cannot be mechanically prepared.　For a clinical　success, improved irrigations are inevitable.　Sodium hypochlorite is well known as a best irrigant for its high organic substance dissolving and microorganisms killing actions.　With sodium hypochlorite, positive pressure irrigation near the apical foramen is too dangerous.　Recently, we can find a lot of serious injury cases on journals caused by sodium hypochlorite injection to the surrounding tissue.　For a better and safer irrigation, negative pressure irrigations should be selected.　We could developed a new negative pressure irrigation system, ultrasonic aspiration technique（UAT）. In UAT, aspiration needle itself ultrasonically vibrates. This ultrasonic vibration can enhance irrigation action and prevent needle choke.

The advantages of the UAT are:

- Safest irrigation method that can irrigate apical canals.
- Removal of debris is highest among various irrigation methods.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

グローバルな視点に立って、歯学の中でも歯髄生物学および歯内療法学の発展に寄与できる研究を行うことのできるよう研究の環境整備を進めている。そのため、幅広く研究領域をカバーするとともに、それぞれの領域で先端的な研究を行うことができるよう、専任の指導教官を配備している。指導教員にはその領域において世界の第一線で活躍できる知識および経験を備えていることが求められる。

B（研究教育環境）

大学院生には、常に臨床と研究の接点を見失うことのないよう、週に最低3コマの診療コマが与えられている。また、専任の指導教官は個別に研究指導を行い、研究遂行上問題が生じた場合にはすぐに対応できる環境が整えられている。

C（人材確保）

大学院を終了した後に教室に残り、研究を続けることができるよう、大学院終了時に医員として大学に残ることが出来るように配慮している。医員は病院職員として臨床業務に携わるが、時間を有効に活用し研究業務に当たることが可能である。

D（人材育成）

研究課題を自ら考えて、それを解明するための実験系を遂行できる人材の育成に力をいれている。そ

のために、研究の内容について指導者と突っ込んだ話し合いを行い、自らの考えをきちんとまとめることができるよう指導している。

E（国際化）

海外からの留学生も多くいることから、各研究グループのセミナーおよび医局のセミナー用のスライドは原則英語にしている。また、当教室で行う大学院講義はスライド、講義ともに英語で行っている。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

本事業を推進するにあたり、世界的な研究拠点づくりとのことから海外の研究機関との情報交換および人材交流に力を入れている。アメリカ、カナダ、イギリス、韓国、中国、タイなどの研究機関と現在交流を持っている。

6）英文原著論文

1）Saegusa H, Watanabe S, Anjo T, Ebihara A, Suda H. Safety of Laser use under the Dental Microscope . Australian Endodontic Journal 36（1）:6-11, 2010.

2）Hanada T, Quevedo C, Okitsu M, Yoshioka T, Iwasaki N, Takahashi H, Suda H. Effects of new adhesive resin root canal filling materials on vertical root fractures.. Australian Endodontic Journal 36（1）:19-23, 2010.

3）◎ Sun H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Suda H. Expression of Notch-signaling-related Genes. Australian Endodontic Journal 23（）:54-8, 2010.

4）Rittling S, Zetterberg C, Yagiz K, Skinner S, Suzuki N, Fujimura A, Sasaki H. Protective Role of Osteopontin in Endodontic Infection. Immunology 129（）:105-114, 2010.

5）Sasaki H, Suzuki N, Alshwaimi E, Xu Y, Battaglino R, Morse L, Stashenko P. 18b-Glycyrrhetinic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor-kB inactivation in interleukin-10-deficient mice. Journal of Periodontal Research 45（）:757-763, 2010.

6）Adorno CG, Yoshioka T, Suda H. The effect of working length and root canal preparation technique on crack development in the apical root canal wall. International Endodontic Journal 43（4）:321-7, 2010.

7）◎ Wang S, KawashimaN, Sakamoto K, Katsube K, Umezawa A, Suda H. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. BBRC 400（）:39-45, 2010.

8）◎ Wang HG, Kawashima N, Iwata T, Xu J, Takahashi S, Sugiyama T, Suda H. Differentiation of Odontoblasts Is Negatively Regulated by MEPE via Its C-Terminal Fragment. BBRC 398（）:406-12, 2010.

9）Kawamura J, Kaneko T, Kaneko M, Sunakawa M, Kaneko R, Chokechanachaisakul U, Okiji T, Suda H. Neuron-immune interactions in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to rat molar pulp. J Dent Res 89（11）:1309-14, 2010.

10）Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Sunakawa M, Kaneko M , Suda H. Gene Expression Analysis of Acutely Traumatized Pulps. JOE 36（1）:78-82, 2010.

11）Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Kaneko M, Kawamura J, Sunakawa M, Suda H. Increased Gene Expression of Toll-like Receptors and Antigen-Presenting Cell-related Molecules in the Onset of Experimentally Induced Furcation Lesions of Endodontic Origin in Rat Molars. JOE 36（2）:251-255, 2010.

12）Kaneko T, Kaneko M, Chokechanachaisakul U, Kawamura J, Kaneko R, Sunakawa M, Okiji T, Suda H. Artificial Dental Pulp Exposure Injury Up-regulates Antigen-Presenting Cell-related Molecules in Rat Central Nervous System. JOE 36（3）:459-464, 2010.

13）Watanabe S, Saegusa H , Anjo T, Ebihara A, Kobayashi T, Suda H. Dentin strain induced by laser irradiation. Australian Endodontic Journal , in press.

14）Adorno CG, Yoshioka T, Suda H. Incidence of accessory canals in Japanese anterior maxillary teeth following root canal filling ex vivo. International Endodontic Journal , in press.

15）◎ Wang HG, Kawashima N, Iwata T, Xu J, Takahashi S, Sugiyama T, Suda H. MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion. JDR , in press.

16）Hou XM, Yahata Y, Hayashi Y, Ebihara A, Hanawa T, Suda H. Phase transformation behaviour and bending property of twisted nickel-titanium endodontic instruments. International Endodontic Journal , in press.

17）Kaneko M, Kaneko T, Kaneko R, Chokechanachaisakul U, Kawamura J, Sunakawa M, Okiji T, Suda H. The role of N-methyl-d-aspartate receptor subunits in the rat thalamic mediodorsal nucleus during central sensitization. Brain Res , Epub ahead of print.

7）総説ならびに著書

＜英文＞

1）Ikeda H, Suda H:Circulation of the Pulp.Seltzer and Bender's The Dental Pulp 2nd ed., Quintessence International Publishing;Chapter 6 p1-29, 2010.

2）Ikeda H, Suda H:Chapter7 Intraoral Pain Disorder. Guideline of Orofacial Pain 2nd ed., Quintessence International Publishing;270-284, 2010.

3）Kaneko T, Cordeiro MMR, Okiji T, Kaneko R, Suda H, Nör JE:Laser capture microdissection from formaldehyde-fixated and demineralized paraffin embedded tissues.Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, 2010.

＜和文＞
1）須田英明.エンドドンティクス　第3版.永末書店,2010.
2）須田英明.歯内治療学　第3版第5刷.医歯薬出版,2010.
3）池田英治.第17章　偶発事故の予防と処置.改訂版エンドドンティックス21　第3版　須田英明,戸田忠夫（編集主幹）.永末書店,269-284, 2010.
4）萩谷洋子.水平歯根破折①－破折後も生活反応を維持した症例のコーンビームCT画像.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;36-39, 2010.
5）和達礼子.水平歯根破折③－二度の受傷を経験した症例.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;44-47, 2010.
6）高橋里美.有髄歯の垂直歯根破折－コーンビームCTにて破折を確認できた症例.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;48-51, 2010.
7）永盛裕二.無髄歯の垂直歯根破折②－ヘミセクションとエクストルージョンを併用して保存を図った症例.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;56-59, 2010.
8）海老原新、中野生和子.無髄歯の垂直歯根破折③－外科的診断.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;60-63 , 2010.
9）川島伸之.接着再植.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;114-115, 2010.
10）林洋介.マイクロスコープ使用による垂直歯根破折の診断.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;118-119, 2010.
11）渡辺聡.有髄歯の歯根破折.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;124-125, 2010.
12）八幡祥生.根管治療歯の垂直歯根破折.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;126-127, 2010.
13）池田英治.外傷と歯髄神経の動態.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;130-131, 2010.
14）竹田淳志、須田英明.矯正治療と歯根外部吸収.よくわかる外傷歯－症例から学ぶ治療のエッセンス－、デンタルダイヤモンド社;136-137, 2010.
15）海老原新、須田英明.歯根破折.歯科衛生士のX線読影力‼　臨床で120%活用するために、デンタルダイヤモンド社;88-89, 2010.
16）池田英治.歯がしみるのはすべて象牙質知覚過敏症か?象牙質知覚過敏症　目からうろこのパーフェクト治療ガイド　1.歯界展望　116（4）;616,2010.
17）海老原新、須田英明.歯内領域のCT画像診断.日本歯科評論　70（3）;53-60,2010.
18）和達礼子、須田英明.最新の仮封材の種類とその使用法　①歯内療法における仮封材.日本歯科評論　70（7）;69-76,2010.
19）竹田淳志、須田英明.あなたの医院の先生の治療を理解しよう　第3回根管治療編.歯科衛生士　34（3）;54,2010.
20）金子友厚、須田英明.だれもが知っておきたいReference the Classic 根管治療中に生じる象牙質の歪みと垂直性歯根破折との関係.the Quintessence　29（4）;178-182,2010.
21）金子友厚、須田英明.だれもが知っておきたいReference the Classic 歯内治療におけるヴィジュアルエンハンスメント.the Quintessence　29（8）;1866-1871,2010.
22）金子友厚、須田英明.だれもが知っておきたいReference the Classic 歯内療法における応急処置.the Quintessence　29（12）;116-120,2010.
23）金子友厚、須田英明.海外ジャーナルWatching.Dental Diamond　35（4）;88,2010.

8）特許取得、特許申請

＜国内＞

1）歯根破折検出装置及びプログラム,須田英明、吉岡隆知、川村洋子、的場一成、山下誠一郎.特許第4570441,2010年8月20日.

特許申請

＜国外＞

1）歯周病又は根尖性歯周炎の予防又は治療薬,川島伸之、鈴木規元.PCT/JP2010/66285,2010年9月21日.

9）平成22年度までの自己評価

世界の中心としての研究拠点を構築していくにあたり、各指導教員および大学院生あるいはポスドクが一体となって研究活動に邁進する環境を整備する必要があるが、その整備が十分に行われていない。指導教員は自らの研究

を行うと共に指導している大学院生の研究を補助し、さらに臨床、教育、雑務に従事せざるをえず、あまりの多忙に研究に対する熱意が薄れがちである。その一つの解決策として、他分野との共同研究を行うことが考えられる。共同研究を行うことにより、多方面からのアプローチが行えると共に、研究の効率化を進めることも可能となると期待される。

10）和文原著論文

1）小林千尋、福元康恵、吉岡隆知、須田英明.超音波吸引洗浄法の開発.日本歯内療法学会雑誌　31（2）:3-7.2010.
2）石村瞳、坂上斉、吉岡俊彦、花田隆周、須田英明.レジン系根管充填用シーラーの根管封鎖性について.日本歯内療法学会雑誌　31（3）:205-209.2010.
3）池田英治、須田英明.象牙質知覚過敏発症のメカニズム.日本歯科理工学会雑誌　29（4）:285-288.2010.
4）吉岡隆知、須田英明.歯科臨床における画像診断の最前線:歯内療法における歯科用コーンビームCTを用いた診断.東京都歯科医師会雑誌　58（3）:121-128.2010.
5）松本宏之、.歯根膜機械受容神経線維の応答性に対する歯髄の炎症性変化の影響Ⅱ.口腔病学会雑誌　77（2）:115-120.2010.
6）吉岡隆知、八幡祥生、中野生和子、花田隆周、石村瞳、菊池和泉、鈴木規元、川島伸之、砂川光宏、須田英明.先進医療「X線CT画像診断に基づく手術用顕微鏡を用いた歯根端切除手術」の治療成績.日本歯科保存学雑誌　53（1）:66-72.2010.
7）石村瞳、坂上斉、花田隆周、吉岡隆知、須田英明.レジン系根管充填用シーラー（MetaSEAL）の根管封鎖性に影響する因子について.日本歯科保存学雑誌　53（2）:159-165.2010.
8）金子実弘、金子友厚、砂川光宏、CHOKECHAN-ACHAISAKUL Uraiwan、河村隼、須田英明.ラット視床内側背側核における興奮性神経伝達物質Glutamate N-methyl-D-aspartate型受容体の実験的歯髄炎による機能亢進に関する研究.日本歯科保存学雑誌　53（2）:140-146.2010.
9）東春生、渡辺聡、和達礼子、海老原新、小倉陽子、勝海一郎、須田英明.水硬性仮封材の硬化に及ぼす消毒薬の影響について.日本歯科保存学雑誌　53（3）:304-308.2010.
10）坂上　斉、吉岡俊彦、須藤　享、花田隆周、石村瞳、吉岡隆知、須田英明.接着性材料を用いた根管充填の内部に発生した空隙の評価.日本歯科保存学雑誌　53（4）:376-383.2010.

11）学会発表（英文）

1）Ikeda H, Li Y, Suda H. Mechanical distortion influences on transjunctional Ca2+ spreading in human odontoblasts. Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics, Poster, Busan, 2010/3/27.
2）Matsumoto H, Sunakawa M, Suda H. Effects of pulpal inflammation on the activities of periodontal mechanoreceptive afferent fibers. Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics, Poster, Busan, 2010/3/27.
3）Sunakawa M, Suda H. A long term evaluation of endodontically treated teeth. Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics, Poster, Busan, 2010/3/27.
4）◎ Kawashima N, Xu J, Suzuki N, Xhou M, Takimoto K, Koizumi Y, Yamamoto M, Samima A, Takahashi S, Suda H. Induction of IL17 synthesis in the experimentally-induced murine periapical lesions . Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics, Poster, Busan, 2010/3/27.
5）Kobayashi C, Suda H. Ultrasonic aspiration technique for root canal irrigation. AAE, table clinic, SanDiego, 2010/4/16.
6）◎ Koizumi Y, Kawashima N, Takimoto K, Takahashi S, Xu H, Suzuki N, Zhou M, Yamamoto M, SalimaA, Sugiyama T, Suda H. Wnt Signaling in Odontoblast Differentiation Induced by BMP . IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
7）◎ Takahashi S, Kawashima N, Tatsube K, Sugiyama T, Suda H. Shh Signaling is Related to BMP and Wnt Signaling in Ameloblast Differentiation. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
8）◎ Kawashima N, Xu J, Suzuki N, Zhou M, Takimoto K, Koizumi Y, Yamamoto M, Samima A, Takahashi S, Suda H. Expression of Mef2c in Murine Odontoblsts. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
9）Nakano K, Yahata Y, Ebihara A, Suda H. Management of mucosal fenestration; Treatment planning using CBCT. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
10）Ikeda H, Suda H. Chronic pain（Nocicepitive and neuropathic pain）associated with endodontic treatment. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
11）Yahata Y, Hayashi Y, Ebihara A, Suda H. Fatigue fracture of Ni-Ti rotary instruments is accelerated when their deflection exceeds a certain threshould level. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
12）Ishimura H, Sakaue H, Hanada T, Ebihara A, Suda H. Root canal sealing ability of resin-based root canal sealer. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.

13）Azuma H, Watanabe S, Wadachi R, Ebihara A, Kobayashi C, Suda H. Dentin strain and fracture propagation caused by retrofilling materials. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
14）Gombo B, Ebihara A, Watanabe S, Anjo T, Kokuzawa C, Saegusa H, Kawashima N, Suda H. Analysis of osteoblastic mesenchymal cell adhesion on laser-induced dentin modification. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
15）Watanabe S, Kokuzawa C, Gomb B, Saegusa H, Ebihara A, Kobayashi C, Suda H. Dentin strain and fracture caused by root-end cavity preparation using Er:YAG laser. IFEA, Poster, Athen, 2010/10/6-9.
16）Ikeda H, Suda H. Localization of intercellular coupling between human odontoblasts.. IADR, Oral, Barcelona, 2010/7/14-7.
17）Sunakawa M, Kaneko T,Chokechanachaisakul U,Kawamura J,Kaneko M,Suda H. Cebtral gene upregulations and modulations following tooth pulp MO stimulation. IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
18）◎ Xu J, Kawashima N, Fujiwara N, Harada H, Suda H. Expression of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors in HERS Cells . IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
19）Suzuki N, Kawashima N, Xu J, Suda H. Effective suppression of periapical lesion expansion by Cathepsin K inhibitor. IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
20）◎ Takimoto K, Kawashima N, Nakashima M, Nakamura H, Koizumi Y, Suda H. Effects of MMP-3 on Inflammatory Mediator Synthesis from Macrophages. IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
21）Adorno C, Yoshioka T,Suda H. Apical root cracks caused by Nickel-Titanium rotary instrumentation. IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
22）◎ Kawashima N, Xu J, Iwata T, Takahashi S, Koizumi Y, Takimoto K, Zhou M, Ohi C, Suzuki N, Sugiyama T, Suda H. Promotive effects of Sp7 on Dspp expression . IADR, Poster, Barcelona, 2010/7/14-7.
23）Ikeda H, Suda H. Functional syncitium behavior of human odontoblasts to mechanical distortion. IADR group meeting, Symposium on Pulp Biology and regeneration, Poster, Geneva, 2010/7/18-20.
24）Kobayashi C, Suda H. Developed of Ultrasonic Aspiration Technique（UAT）for Root Canal Irrigation. 10th International Congress of the Turkish Endodontic Society, Poster, Istanbul, 2010/9/23-25.

12）学会発表（和文）

1）川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴木規元、須田英明.象牙芽細胞分化におけるSp7によるdentin sialophosphoprotein発現誘導.日本再生医療学会,広島,2010/3/18.
2）河村隼、金子友厚、チョックチャナチャイサクンウライワン、砂川光宏、金子実弘、、須田英明.ラット実験的歯髄炎により惹起される中枢性感作 - 視床のNMDARの機能に関する検索 - .日本歯科保存学会第132回春季学術大会,熊本,2010/6/4.
3）池田英治、須田英明.重度の歯内疾患を有した若年患者の長期治癒経過観察症例の報告.日本歯科保存学会第132回春季学術大会,熊本,2010/6/5.
4）須藤享、吉岡隆知、小林千尋、須田英明.歯種および根管内外の環境が電気的根管長測定に与える影響.日本歯科保存学会第132回春季学術大会,熊本,2010/6/5.
5）石村瞳、坂上斉、花田隆周、吉岡隆知、須田英明.新しい水硬性仮封材の辺縁封鎖性について.日本歯科保存学会第132回春季学術大会,熊本,2010/6/5.
6）竹田淳志、須田英明、大林尚人.歯科用コーンビームCTにおけるモーションアーチファクトに関する研究.日本歯科保存学会第132回春季学術大会,熊本,2010/6/5.
7）武部純、金村清孝、森田一三、石橋寛二、須田英明、福田仁一、中垣晴男、末瀬一彦.歯科医師客観式多肢選択試験成績と実技実習成績の関連性.第29回日本歯科医学教育学会学術大会,岩手,2010/7/23.
8）金村清孝、武部純、森田一三、石橋寛二、須田英明、福田仁一、中垣晴男、末瀬一彦.歯科技工士客観式多肢選択試験成績と実技実習成績の関連性.第29回日本歯科医学教育学会学術大会,岩手,2010/7/23.
9）森田一三、武部純、金村清孝、石橋寛二、須田英明、福田仁一、中垣晴男、末瀬一彦.歯科衛生士客観式多肢選択試験成績と実技実習成績の関連性.第29回日本歯科医学教育学会学術大会,岩手,2010/7/23.
10）小林千尋.私の歯内療法　根管洗浄を中心に.第31回日本歯内療法学会学術大会,東京,2010/7/24.
11）植竹千香子、鈴木規元、石村瞳.電気的根管長測定における根尖孔の大きさおよび根管内溶液の影響.D4研究体験実習学生発表会,東京,2010/9/24.
12）植竹千香子、鈴木規元、石村瞳.電気的根管長測定における根尖孔の大きさおよび根管内溶液の影響.D4研究体験実習学生発表会,東京,2010/9/25.
13）市村賢二、須田光昭、市村賢太郎、福岡陽子、乾はな子、平島祐生、石村瞳、高橋英和.歯頚部からの漏洩に対する接着性シーラーの効果.日本歯科保存学会第133回秋季学術大会,岐阜,2010/10/28.
14）池田英治、須田英明.ヒト象牙芽細胞間カップリングの局在.日本歯科保存学会第133回秋季学術大会,岐阜,2010/10/29.

15）河村隼、金子友厚、金子実弘、興地隆史、チョックチャナチャイサクン　ウライワン、砂川光宏、須田英明.ラット実験的歯髄炎における視床のN-methyl-D-aspartate receptorsとグリア細胞との関係.日本歯科保存学会第133回秋季学術大会,岐阜,2010/10/29.
16）石澤千鶴子、ゴンボ　ボロルトヤ、渡辺聡、三枝英敏、安生智郎、海老原新、須田英明.模擬根管を用いたEr:YAGレーザー照射による根管形成.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会,名古屋,2010/11/13.
17）金子友厚、山中裕介、吉羽邦彦、吉羽永子、須田英明、興地隆史.Dentin sialophosphoprotein expression in engineered dental pulp-like tissue. 第58回JADR総会・学術大会,小倉,2010/11/20.
18）池田英治、須田英明.Localization of Intercellular Coupling between Human Odontoblasts.JADR, 福岡,2010/11/21.
19）砂川光宏、松本宏之、和泉雄一.歯科用衛生材料の個別包装かに伴う医療経済的結果について.第75回口腔病学会学術大会,東京,2010/12/4.
20）竹田淳志、大林尚人、須田英明.モーションアーチファクトが歯科用コーンビームCT画像に及ぼす影響.第75回口腔病学会学術大会,東京,2010/12/4.
21）宮本智行、深山治久、新田浩、俣木志朗、三輪全三、鵜沢成一、岡田大蔵、和達礼子、和達重郎、松原恒、沖畠里恵、土屋文人、小西富代、石井牧子、小畑佳代子、冨里博、清水聡、多田浩、倉林亨、嶋田昌彦.東京医科歯科大学歯学部附属病院へ　協力型臨床研修施設におけるインシデント報告制度.第75回口腔病学会,東京,2010/12/4.

13）受賞

1）池田英治.Mechanical distortion influences on transjunctional Ca2+ spreading in human odontoblasts. 1st Prize（ Meta Grand Prize ）presentation, Korean Academy of Endodontics,2010年3月28日.
2）植竹千香子（指導　鈴木規元、石村瞳）.電気的根管長測定における根尖孔の大きさおよび根管内溶液の影響.D4研究体験実習学生発表会　歯学科長賞,2010年9月25日.

14）外部資金の獲得状況

1）科学研究費補助金、基盤研究（A）
研究題目:垂直性歯根破折のメカニズム解析と臨床的対応
代表:須田英明　分担:海老原新、吉岡隆知
期間:平成19年-平成22年
研究費総額:3460万円
2）科学研究費補助金、基盤研究（B）
研究題目:Gap-junctionを介した象牙芽細胞複合体の電気的・化学的細胞間連絡の解析
代表:池田英治　分担:須田英明
期間:平成20年-平成24年
研究費総額:1220万円
3）科学研究費補助金、基盤研究（B）
研究題目:Notchシグナルの歯髄細胞分化におけるメカニズムの解明とその臨床的展開
代表:川島伸之
期間:平成19年-平成22年
研究費総額:1460万円
4）科学研究費補助金、基盤研究（B）
研究題目:歯髄細胞の分化におけるシグナルネットワークの新しいパラダイムの構築と臨床への展望
代表:川島伸之
期間:平成22年-平成25年
研究費総額:1475万円
5）科学研究費補助金、基盤研究（C）
研究題目:根尖性歯周炎の発症・拡大におけるIL-10の機能的役割
代表:鈴木規元
期間:平成20年-平成22年
研究費総額:350万円
6）科学研究費補助金、基盤研究（C）
研究題目:正常免疫機能を保持した歯髄組織を再生するための分子生物学的研究
代表:金子友厚
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:370万円
7）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:エナメル芽細胞におけるShhおよびBmpシグナルのクロストークと歯の再生への展望
代表:高橋里美
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:374万円
8）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:曲率および曲率半径がニッケルチタンファイルの破折に与える影響について
代表:林　洋介

期間:平成21年-平成22年
研究費総額:330万円

9）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:エンドドンティックマイクロサージェリーにおけるレーザー応用の有用性の検討
代表:三枝英敏
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:300万円

10）科学研究費補助金、若手研究（スタートアップ）
研究題目:接着性根管充填用シーラーによる垂直性歯根破折の予防
代表:花田隆周
期間:平成21年-平成22年
研究費総額:200万円

11）科学研究費補助金、挑戦的萌芽
研究題目:歯髄細胞および骨芽細胞の三次元培養におけるシグナルネットワークの解析と臨床的展開
代表:川島伸之
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:260万円

12）GCOE拠点内研究費、
研究題目:
代表:須田英明・宗田大　分担:川島伸之
期間:平成22年
研究費総額:136万円

13）科学研究費補助金、萌芽研究
研究題目:多光子励起顕微鏡法と膜電位感知タンパク解析法を用いた歯髄リンパ網の研究
代表:池田英治
期間:平成22年-平成23年
研究費総額:150万円

14）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:合金組成および熱処理がニッケルチタンファイルに与える影響
代表:八幡祥生
期間:平成22年-平成23年
研究費総額:300万円

15）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:破折を起こしにくい次代の歯内療法へのレーザー応用の有用性の検討
代表:渡辺聡
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:300万円

16）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:歯科用CTを用いた歯内療法の画像診断学の確立
代表:中野生和子
期間:平成22年-平成23年
研究費総額:240万円

17）科学研究費補助金、若手研究（B）
研究題目:接着性根管充填材応用による垂直性歯根破折の挙動およびその予防
代表:花田隆周
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:300万円

18）奨学寄附金、歯髄生物（研究助成）No.1441
研究題目:寄附者:サンメディカル株式会社　代表取締役社長　彌富忠志
代表:須田英明
期間:平成22年-平成22年
研究費総額:30万円

19）奨学寄附金、歯髄生物（研究助成）No.1441
研究題目:寄附者:特定非営利活動法人日本歯科放射線学会理事長有地榮一郎
代表:須田英明
期間:平成22年-平成22年
研究費総額:15万円

20）寄付金（ネオ製薬工業株式会社）
研究題目:
代表:須田英明
期間:平成22年
研究費総額:100万円

21）寄付金（和光純薬）
研究題目:
代表:川島伸之
期間:平成22年
研究費総額:10万円

22）科学研究費補助金、基盤研究（B）
研究題目:医歯学シミュレーション教育システムの開発と歯学教育における教育効果の評価
代表:木下淳博　分担:吉岡隆知
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:0万円

23）長寿医療研究委託費、21指-8
研究題目:近赤外光・レーザー等を用いた新たな歯科疾患診断・治療用機器の開発に関する研究
代表:角保徳　分担:須田英明
期間:平成21年-平成23年

研究費総額:500万円

24）長寿医療研究委託費、21指-7
研究題目:歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生医療によるう蝕・歯髄疾患等のための治療技術の開発
代表:中島美砂子　分担:川島伸之
期間:平成21年-平成24年
研究費総額:150万円

25）長寿医療研究委託費
研究題目:歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生医療によるう蝕・歯髄疾患等のための治療技術の開発
代表:中島美砂子　分担:川島伸之
期間:平成20年
研究費総額:600万円

15）特別講演、招待講演

1）須田英明:マイクロエンドドンティクスと歯根破折. 平成21年度第2回県歯共催学術研修会（小田原市歯主催）, 2010/2/4,音羽多目的ホール.

2）小林千尋:根管充填と根管洗浄について考える. 日本歯内療法学会関東甲信越静支部セミナー, 2010/2/21,ヨシダ.

3）須田英明:歯科関連職種における技術能力向上に寄与する試験のあり方の研究シンポジウム. 厚生労働科学研究　地域医療基盤開発推進研究事業, 2010/2/22,岩手県民情報交流センター.

4）須田英明:歯根破折. 千葉県保険医協会　歯科千葉支部主催　学術研究会, 2010/2/28,千葉県保険医協会会議室.

5）Ikeda H: チェンマイ大学招待講演. 2010/3/6-7,チェンマイ大学.

6）鈴木規元、川島伸之:ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるNC2300の抑制効果. NC2300基礎研究会, 2010/3/13,日本ケミファ本社.

7）須田英明:歯学分野の展望. 日本学術会議　歯学委員会, 2010/4/5,.

8）須田英明:提案書作成のポイント. 平成22年度日本医学会ワークショップ, 2010/4/27,日本歯科医師会館.

9）小林千尋:根管洗浄と根管充填を中心に. 日本歯内療法学会研修会, 2010/5/13,宇都宮歯科医師会館.

10）須田英明:歯を守る最新歯内療法～基本技術から難症例の対応まで～. 平成22年度日歯生涯研修セミナー, 2010/5/23,茨城県水戸市.

11）小林千尋:歯内療法と根管洗浄. , 2010/6/11,ミクニ工業本社（岡谷市）.

12）須田英明:歯を守る最新歯内療法～基本技術から難症例の対応まで～. 平成22年度日歯生涯研修セミナー, 2010/6/27,三重県津市.

13）小林千尋:根管洗浄と根管充填. 日本歯内療法学会関東甲信越静支部デモコース研修会, 2010/7/3,日本歯科大学新潟歯学部　.

14）須田英明:歯を守る最新歯内療法～基本技術から難症例の対応まで～. 平成22年度生涯研修セミナー 歯科医療の新たな潮流―再生医療と最新歯科治療―, 2010/7/4,香川県歯科医師会館.

15）小林千尋:新しい器材を用いた難症例の治療. 沖デンタルフェア講習会, 2010/7/4,新潟市.

16）海老原新:医科歯科の海老原新先生をお迎えしての臨床講演会 「歯内療法における歯科用顕微鏡の有用性」. 2010年度コサカ学術講演会, 2010/7/15,コサカ.

17）小林千尋:デモンストレーションレクチャー「最新の歯内療法を見せる」 私の歯内療法　根管洗浄を中心に. 日本歯内療法学会関東甲信越静支部会共催デモンストレーションレクチャー, 2010/7/24,東商ホール.

18）須田英明、海老原新、和達礼子、鈴木規元、石村瞳:エンドで困ったときの対策. 平成22年度東京都歯科医師会卒後研修, 2010/8/19,東京医科歯科大学.

19）侯暁. 第32期研究者研究報告会・研究修了式, 2010/8/25,日本財団ビル.

20）海老原新:歯内慮法における歯科用CTの有用性. 日本歯科医学会プロジェクト研究「歯科用CTを用いた歯科画像診断の新たな展開に関するプロジェクト研究」「歯科診療における歯科用コーンビームCTの基礎的・臨床的研究」に関するシンポジウム, 2010/8/28,ゆうぽうと会議室.

21）須田英明:より効果的な歯内療法とその臨床的有用性. 社団法人　日本口腔インプラント学会関東・甲信越支部　学術シンポジウム, 2010/8/29,東京フォーラム .

22）Srisuwan T, Ikeda H, Suda H:チェンマイ大学JSPS若手研究者交流支援事業. 2010/8/30-9/13,東京医科歯科大学.

23）小林千尋:歯内療法の診査. 日本歯内療法学会中部支部会, 2010/9/19,金沢市.

24）須田英明:歯を守る最新歯内療法～基本技術から難症例の対応まで～. 平成22年度日歯生涯研修セミナー（東京都）, 2010/9/23,東京都千代田区.

25）Suda H:大連医科大学招待講演. 2010/11/1-3, 大連医

科大学.

26）Ikeda H:大連医科大学招待講演. 2010/11/1-3, 大連医科大学.

27）須田英明:臨床に役立つ最新歯内療法． 愛知県歯科医師会学術講演会， 2010/11/7,愛知県歯科医師会館.

28）川島伸之:歯髄幹細胞と再生医療． 日本歯科大学エキスパートセミナー， 2010/11/19,日本歯科大学新潟歯学部　アイビーホール.

29）須田英明:歯根破折とエンド臨床． 茨城県保険医協会講演会， 2010/11/21,茨城県開発公社.

30）Suda H: 中華牙医学会年次大会. 2010/11/26-28, 台北国際トレードセンター.

31）Kobayashi C: Ultrasonic Aspiration Technique and Root Canal Filling. 中華牙医学会年次大会. 2010/11/26-28, 台北国際トレードセンター.

32）須田英明、海老原新、吉岡隆知、和達礼子、鈴木規元: リフレッシュ歯内療法 - 成功するエンドのために - . 第47期ポストグラジュエートコース， 2010/2/21,東京医科歯科大学.

33）須田英明、海老原新、吉岡隆知、和達礼子、鈴木規元: リフレッシュ歯内療法 - 成功するエンドのために - . 第48期ポストグラジュエートコース， 2010/7/11,東京医科歯科大学.

16）主催学会

1）須田英明:破折の診断と治療． 日本歯内療法学会関東甲信越静支部会第14回サマーセミナー& 第12回ベーシックセミナー， 2010/8/26,東京医科歯科大学.

17）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授

小林千尋,砂川光宏（感染対策歯科治療部 兼任）

講師

竹田淳志,池田英治

助教

海老原新,川島伸之,松本宏之（感染対策歯科治療部兼任）,吉岡隆知（平成22年3月まで）,和達礼子,鈴木規元,石村瞳（平成22年4月より）

ポスドク（医員）

金子友厚（平成22年3月まで）,石村瞳（平成22年3月まで）,花田隆周（平成22年3月まで）,八幡祥生,渡辺聡,中野生和子,東春生（平成22年4月より）、山内隆守（平成22年4月より）

大学院生

Adrno Quevedo Carlos Gabriel,○許婧,河村隼,小泉悠,石澤千鶴子,坂上斉,○Bolortuya Gombo,吉岡俊彦,○Uraiwan Chokechanachaisakul,瀧本晃陽,○周夢宇,○李頴,小松恵,宮良香菜,山本弥生子

RESEARCH REPORTS
Biological

H.G. Wang[1], N. Kawashima[2,3]*, T. Iwata[4], J. Xu[2], S. Takahashi[2], T. Sugiyama[5], and H. Suda[2,3]

[1]Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, China; [2]Pulp Biology and Endodontics, Graduate School; [3]GCOE Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical & Dental University, 1–5-45, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8549, Japan; [4]Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Japan; and [5]Department of Biochemistry, School of Medicine, Akita University, Japan; *corresponding author, kawashima.n.endo@tmd.ac.jp

J Dent Res X(X):xx-xx, XXXX

MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion

ABSTRACT

Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is predominantly expressed in osteoblasts, osteocytes, and odontoblasts and plays key biological roles in bone and dentin metabolism. Post-translational modifications are essential for its activation. This study tested the hypothesis that MEPE is activated through proteolytic processing by furin in dental pulp. MEPE was present in three sizes, 1 full-length and 2 cleaved fragments; the cleavage site was 146R↓147. The proprotein convertase family, particularly furin, was a candidate enzyme. Introducing a substitution at the cleavage site inhibited hydrolysis, but there was no cleavage of MEPE expressed in furin-deficient LoVo cells. Therefore, furin is a strong candidate for the proteolytic cleavage of MEPE. The C-terminal cleavage product promoted cell adhesion *via* its RGD motif. These results indicate that proteolytic processing by furin may activate MEPE during its secretion from odontoblasts and may play important roles in dentinogenesis and pulpal homeostasis. *Abbreviations*: MEPE, matrix extracellular phosphoglycoprotein; PTM, post-translational modification; OLC, odontoblast-lineage cells.

KEY WORDS: MEPE, post-translational modifications, proteolytic cleavage, furin, dental pulp cells.

DOI: 10.1177/0022034510391057

Received February 23, 2010; Last revision June 4, 2010; Accepted June 7, 2010

A Appendix appendix to this article is published electronically only at http://jdr.sagepub.com/Appendix.

© International & American Associations for Dental Research

INTRODUCTION

MEPE was first isolated by expression screening of a tumor cDNA library to identify genes up-regulated in the tumors of patients with oncogenic hypophosphatemic osteomalacia (Rowe *et al*., 2000). MEPE seems to be crucially involved in mineralization, but its exact role as a regulator of mineralization and the mechanisms underlying this function remain controversial.

Many studies have revealed the effects of MEPE on mineralization. MEPE expression was markedly increased in fully differentiated osteoblasts (Argiro *et al*., 2001) and promoted regeneration and skeletogenesis of long bones (Lu *et al*., 2004). Furthermore, a synthetic peptide of residues 242–264 of human MEPE called Dentonin or AC-100, which includes the RGD and SGDG motifs, stimulates new bone formation (Hayashibara *et al*., 2004; Nagel *et al*., 2004). This peptide also enhances dental pulp stem cell proliferation *in vitro* (Liu *et al*., 2004) and initiates pulp healing in response to injury (Six *et al*., 2007). In contrast, some have reported that MEPE inhibits mineralization. For example, MEPE was highly expressed in tumor-induced osteomalacia (Rowe *et al*., 2000; Quarles, 2003; Bresler *et al*., 2004) and in Hyp mice, a murine model for X-linked hypophosphatemia (S Liu *et al*., 2005). MEPE expression was observed only in immature odontoblasts, and it was down-regulated during odontoblastic differentiation (MacDougall *et al*., 2002; H Liu *et al*., 2005). A mouse model with targeted deletion of *MEPE* showed increased bone formation and bone mass (Gowen *et al*., 2003).

MEPE shares molecular similarities with several dentin-bone extracellular matrix RGD-containing phosphoglycoproteins, including dentin sialophosphoprotein, osteopontin, dentin matrix protein 1 (DMP1), and bone sialoprotein (Fisher and Fedarko, 2003). These non-collagenous proteins are believed to play key biological roles in the formation and mineralization of bone and/or dentin. Their functions are largely dependent on the nature and extent of post-translational modifications (PTM), including phosphorylation, glycosylation, and proteolytic processing. Proteolytic processing is particularly important in inducing the active forms of various proteins. DMP1 was proteolytically processed by PHEX enzyme or bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases (Qin *et al*., 2003, 2004; Steiglitz *et al*., 2004).

The aims of this study were to evaluate the expression pattern of MEPE in dental pulp, the mechanisms involved in the PTM of MEPE in dental pulp cells and tissues, and the function of proteolytic fragments of MEPE in dentinogenesis.

MATERIALS & METHODS

Construction of Expression Vectors and Mutants, Real-time PCR

The open reading frame of the mouse MEPE cDNA, with or without signal peptides, was subcloned into the eukaryotic expression vector pEF-Dest51 (pEF-mMEPE) or pSecTag2A with a V5His tag (pSecTag2A-V5His-MEPE), respectively. The cDNAs for the mouse MEPE mature peptide, C-terminal fragment (residues 18–146) and N-terminal fragment (residues 147–433), were subcloned into the prokaryotic expression vector pDEST17. MEPE R145G and R146A mutants in the pEF-mMEPE construct and mutant G176A (RGD→RAD) in the pDEST17-mMEPE construct were created by site-directed mutagenesis. MEPE mRNA expression was determined by real-time PCR with specific primers in several cell lines and in primary cells from rat dental pulp, periodontal ligament, and gingiva (Appendix Tables 1 and 2).

Transfection, Transient Expression, and Western Blotting Analysis

Odontoblast-lineage cells (OLC) (Arany *et al.*, 2006) and several other types of cells were transfected with the MEPE expression vectors, and the conditioned medium was harvested for SDS-PAGE. Western blotting was performed with the primary antibodies, including anti-V5 (1:5000), anti-mMEPE (LF-156 & LF-155, 1:1000; kind gifts from Dr. L.W. Fisher), and anti-β-actin (1:1000).

Protein Production, Amino Acid Sequencing, Production of Antibody, and Cell Adhesion Assay

The eukaryotic MEPE protein was produced on a large scale by HEK293F cells. Sequencing of the C-terminal fragment was performed by the Edman degradation method. The full-length, C- and N-terminal fragments, and mutant G176A MEPE proteins were expressed in *E. coli*. The full-length protein was used to produce the polyclonal antibody. All the proteins were tested by cell adhesion assay, while collagen I was used as a positive control and BSA as a negative control.

Immunohistochemical Staining

Dental pulp tissues of upper incisors from male Wistar rats (6-wks old) were fixed with 4% paraformaldehyde for 12 hrs at 4ºC. Immunohistochemical staining with anti-mMEPE antibody (LF-155, 1:250) was performed on frozen sections. Immunoreactivity was detected by the ABC method, and the color reaction was developed with DAB. The nucleus was counterstained by methyl green. For immunofluorescence with anti-mMEPE antibody (LF-156, 1:250), Alexa Fluor™ 594 conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was applied as a secondary antibody, and 4′,6′-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 300 nM, Invitrogen) was used for nuclear staining. Based on the literature and our data, LF-156 recognizes full-length, N- and C-terminal fragments of MEPE protein, while LF-155 reacts only against the C-terminal fragment. Adult rat tibia was used as positive control and liver as negative control. All animal experiments were performed in accordance with the Animal Guidelines of Tokyo Medical and Dental University.

Statistical Analysis

All data are represented as means ± standard error. Statistical significance was determined by an unpaired Student's *t* test, and a P value of < 0.05 was considered statistically significant. Additional information on MATERIALS & METHODS can be found in the Appendix.

RESULTS

Cleavage of MEPE in Dental Pulp Tissue

RT-PCR revealed MEPE expression in mouse and rat dental pulp tissues. MEPE was ubiquitously expressed in hard-tissue-forming cells, including osteoblastic cells (Kusa-A1, Kusa-O, and MC3T3E1), chondroblastic cells (ATDC5, Kum5), odontoblast-lineage cells (OLC) and MDPC-23, and ameloblast-lineage cells (ALC) (Fig. 1A). In addition, high and low levels of MEPE expression were observed in rat dental pulp cells and in periodontal ligament cells, respectively. However, MEPE expression was below the detectable level in gingival cells (Appendix Fig. 1). Three forms of MEPE protein, 50, 38, and 25 kDa, were identified in the rat pulp tissue (Fig. 1B). The mature MEPE peptide is a 417-amino-acid secreted peptide with a calculated molecular mass of 44,247 Da. As a result of glycosylation, MEPE in rat dental pulp tissue migrated as an approximately 50-kDa protein in SDS-PAGE under reducing conditions. The 38- and 25-kDa proteins expressed in dental pulp tissue were truncated forms of MEPE, suggesting that MEPE is processed in dental pulp tissue. The similar staining patterns of LF-156 (anti all kinds of fragments of MEPE) and LF-155 (anti C-terminal fragment) suggested that the localization of full-length MEPE and its fragments should be similar (Fig. 1C).

Cleavage of MEPE in Exogenous MEPE-expressing Cells

After transfection of pEF-mMEPE, exogenous expression of the MEPE protein was observed in the cell lysate and the supernatant. Western blotting revealed 3 bands at 58, 45, and 22 kDa in the supernatant and a single band at 58 kDa in the cell lysate. The 58-kDa band, containing a 5-kDa V5-His tag, was full-length MEPE, while the 45-kDa band, containing a 5-kDa V5-His tag, was the C-terminal cleavage product of MEPE. The 28-kDa band, also containing a 5-kDa V5-His tag, was identified as the N-terminal cleavage product of MEPE. This cleavage was widely observed in protein-expression cell lines, and in odontoblastic and osteoblastic cell lines (Figs. 2A, 2B). The size of the full-length MEPE in the supernatant was slightly larger than that in the cell lysate, which may be caused by cell-specific PTM, such as phosphorylation or glycosylation, during secretion. The size of the full-length natural MEPE in the pulp tissues was about 10 kDa less than that of MEPE artificially synthesized with pEF-mMEPE. Most of this size discrepancy was due

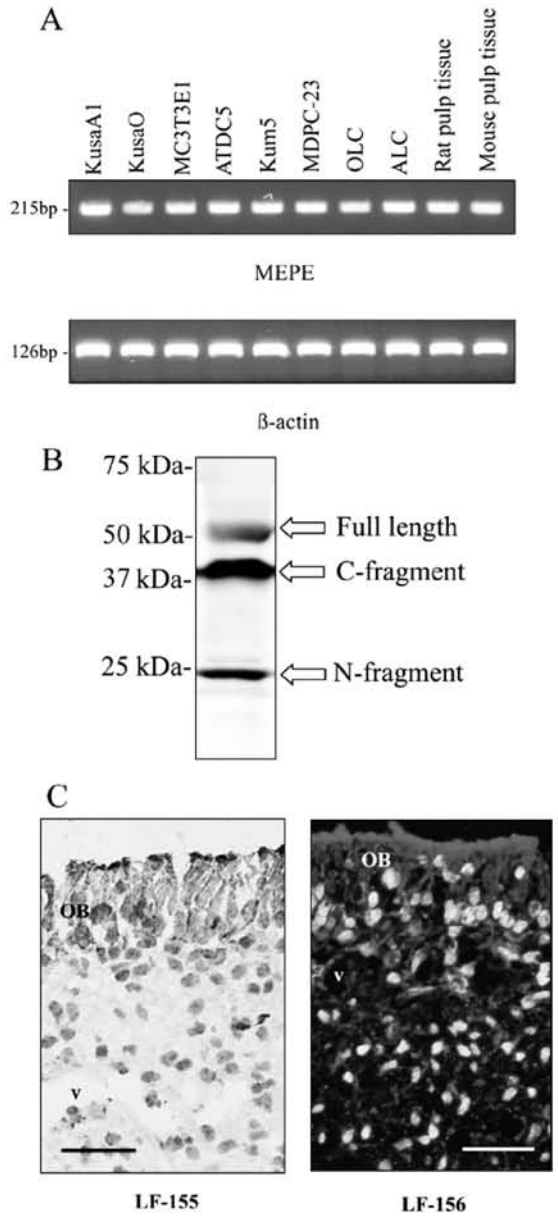


Figure 1. MEPE cleavage in dental pulp tissue. **(A)** MEPE is ubiquitously expressed in osteoblastic (Kusa-A1, Kusa-O, and MC3T3E1), chondroblastic (ATDC5, Kum5), odontoblastic (OLC, MDPC-23), and ameloblastic (ALC) cell lines and in mouse and rat dental pulp tissues. **(B)** Three forms of MEPE protein, 50, 38, and 25 kDa, were identified in rat pulp tissue by Western blotting analysis with anti-MEPE antibody. The 50-kDa protein was the full-length mature peptide, while the lower-molecular-weight proteins were truncated forms of MEPE. **(C)** Detection of MEPE in mature pulp tissue by two types of anti-MEPE antibody, LF-155 and LF-156. The staining pattern with LF-156, which recognizes all fragments of the MEPE protein, was similar to that of LF-155, which recognizes only the C-terminal fragment. The nucleus was counterstained with methyl green or 4′,6′-diamidino-2-phenylindole.

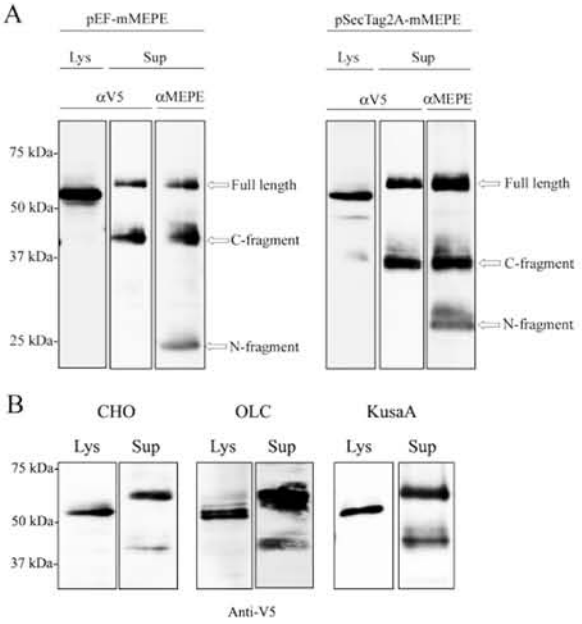


Figure 2. MEPE cleavage in exogenous MEPE-expressing cells. **(A)** Cleavage of MEPE was detected after transient expression in HEK293 cells with either pEF-mMEPE (contains the C-terminal V5-His tag) or pSecTag2A-V5His-MEPE (contains the N-terminal V5-His tag). For pEF-mMEPE, 3 bands at 58, 45, and 22 kDa appeared in the supernatant, and a single band at 58 kDa was observed in the cell lysate. The 58-kDa band, containing a 5-kDa V5-His tag, was full-length MEPE. The 45-kDa band, containing a 5-kDa V5-His tag, was the C-terminal cleavage product of MEPE. For pSecTag2A-V5His-MEPE, the cleaved products were similar, and the 28-kDa band containing the 5-kDa V5-His tag was identified as the N-terminal cleavage product of MEPE. The size of the full-length MEPE in the supernatant was slightly different from that in the lysate, which may be due to post-translational modifications such as phosphorylation or glycosylation, which occurred before secretion of MEPE. **(B)** The cleavage was widely observed in various cell lines. The full-length and C-terminal fragments of MEPE were observed in pEF-mMEPE-transiently transfected CHO cells, and in odontoblastic (OLC) and osteoblastic (Kusa-A1) cell lines. The bar represents 20 μm. OB = odontoblast, v = blood vessel, Lys = lysate, Sup = supernatant, αV5 = anti-V5, αMEPE = anti-MEPE.

to the addition of the 5-kDa V5-His tag to the expression vector, but some PTM may also be responsible for the difference in size of the artificially synthesized MEPE.

Proprotein Convertase is Involved in the Cleavage of MEPE

Amino acid sequencing of the C-terminal fragment (Appendix Fig. 2) revealed the sequence to be ^{147}STHYL, indicating that MEPE was cleaved at the ^{146}R↓^{147}S site. Several proteases, including Arg-C protease, clostripain, trypsin, cathepsin B, and proprotein convertases, may be responsible for the cleavage of MEPE. Arg-C protease, clostripain, and trypsin are serine proteases, while cathepsin B is a cysteine protease. To test these proteases, we added a protease inhibitor cocktail, which inhibits

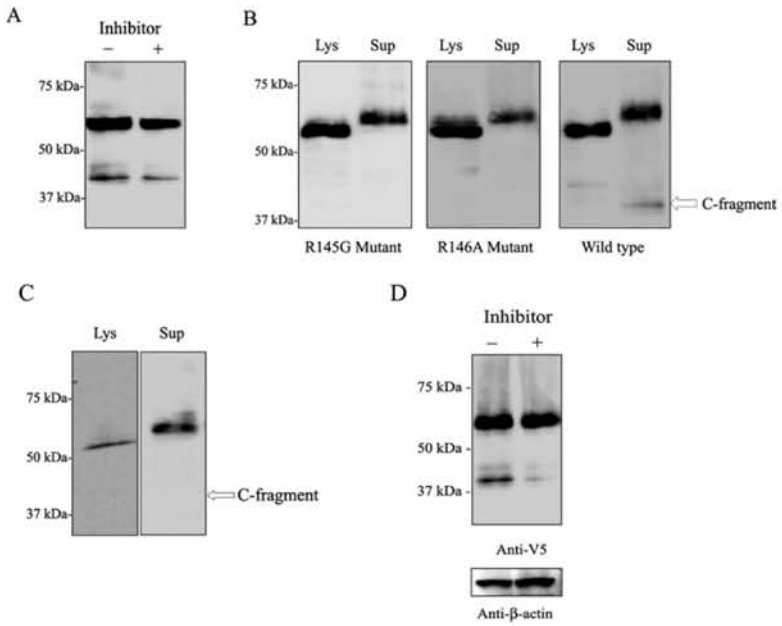


Figure 3. Furin is responsible for the cleavage of MEPE. **(A)** A protease inhibitor cocktail, which inhibits serine, cysteine, and metalloproteases, was added to the culture medium of Cos-7 cells. Protein production was inhibited, but cleavage still occurred, which excluded the 4 candidate proteases, Arg-C proteinase, clostripain, trypsin, and cathepsin B. **(B)** The R145G and R146A mutants were resistant to cleavage. Compared with the wild–type form, the 40-kDa C-terminal fragment was not detected after transfection. **(C)** In LoVo cells (furin-deficit human colon cancer cell line), there was no cleavage of MEPE after transfection and transient expression. **(D)** Cleavage of MEPE was effectively blocked by the furin-specific inhibitor in Cos-7 cells. Lys = lysate, Sup = supernatant.

serine, cysteine, and metalloproteases, to the culture medium for Cos-7 cells. Cleavage was not inhibited, which excluded these 4 proteases (Fig. 3A).

Only the full-length protein was detected in the conditioned medium after transient expression of either the R145G mutant or the R146A mutant, indicating that they were resistant to cleavage (Fig. 3B). ^{145}R and ^{146}R were clearly important for protease activity, which is consistent with the recognition site of proprotein convertases. The rule for recognition by proprotein convertases is (Arg/Lys)-(X)n-Arg (n = 0, 2, 4, or 6). For MEPE, the cleavage occurred at PRARR ↓STHYL for rat MEPE, and RQTRR ↓STHYL for mouse MEPE (n = 0). These results are consistent with the conclusion that proprotein convertases are involved in MEPE cleavage.

The mammalian proprotein convertase family is comprised of 7 members, and, based on previous reports (Akamatsu *et al.*, 1999, 2000), furin and PACE4 are candidates. In LoVo cells, a human colon carcinoma cell line that lacks enzymatically active furin due to the presence of mutations in both alleles of the furin gene, MEPE was not cleaved after transfection and transient expression (Fig. 3C). Furthermore, cleavage of MEPE was effectively blocked by a furin-specific inhibitor in Cos-7 cells (Fig. 3D). RT-PCR showed that furin was expressed in all of the cell types used in this experiment, except LoVo cells. In contrast, PACE4 expression was detected in all of these cell lines, including LoVo cells (Appendix Fig. 3). Therefore, the expression of furin is consistent with the expression and cleavage of MEPE. These results indicate that furin is responsible for MEPE cleavage.

MEPE-induced Cell Adhesion *via* the RGD Sequence

The full-length eukaryotic protein (F_{HEK}) dose-dependently promoted the attachment of OLCs. Two μg/mL of protein showed activity similar to that of collagen I (Appendix Fig. 4A). In the antibody neutralization test, the antibody to the full-length prokaryotic protein ($F_{E.coli}$) dose-dependently neutralized cell adhesion on plates coated with 100 μL of F_{HEK} at 2 μg/mL. Two μg/mL of this antibody neutralized 100% of cell adhesion. However, the LF-156 antibody raised against a partial sequence of MEPE (CSREKVKGGVEHAGRAG & CSKHTKHTRQTRRSTHGG) showed no effect on the neutralization of protein activity (Fig. 4A). The antibody against full-length MEPE did not abrogate cell binding to collagen I (Appendix Fig. 4B). The C-terminal fragment of prokaryotic protein containing the RGD motif ($C_{E.coli}$) promoted cell adhesion, while the N-terminal fragment of prokaryotic protein ($N_{E.coli}$) did not (Fig. 4B). The G176A mutant (RGD→RAD) of prokaryotic protein ($RAD_{E.coli}$) did not promote cell adhesion, even at 16 μg/mL (Fig. 4C). These results indicate that MEPE promotes cell adhesion *via* the RGD sequence.

DISCUSSION

We revealed that MEPE was synthesized and secreted by odontoblasts, suggesting that MEPE plays roles in dentinogenesis and in the physiology of pulp tissue. In oral tissue, MEPE was highly expressed in dental pulp cells, but its expression was low in periodontal ligament cells and scant in gingival tissues. These results suggest that MEPE tends to be expressed in hard tissues and hard-tissue-related cells, and this indicates MEPE may be involved in the process of mineralization, as either a positive or a negative regulator.

Three forms of MEPE are found in pulp cells and tissues, with significantly different molecular masses: the full-length protein, and N-terminal and C-terminal cleavage products. The small and large MEPE components present in pulp tissues corresponded to the N-terminal and C-terminal fragments, respectively, and they were generated by cleavage between 146R and 147S. We found that the enzyme responsible for the cleavage of

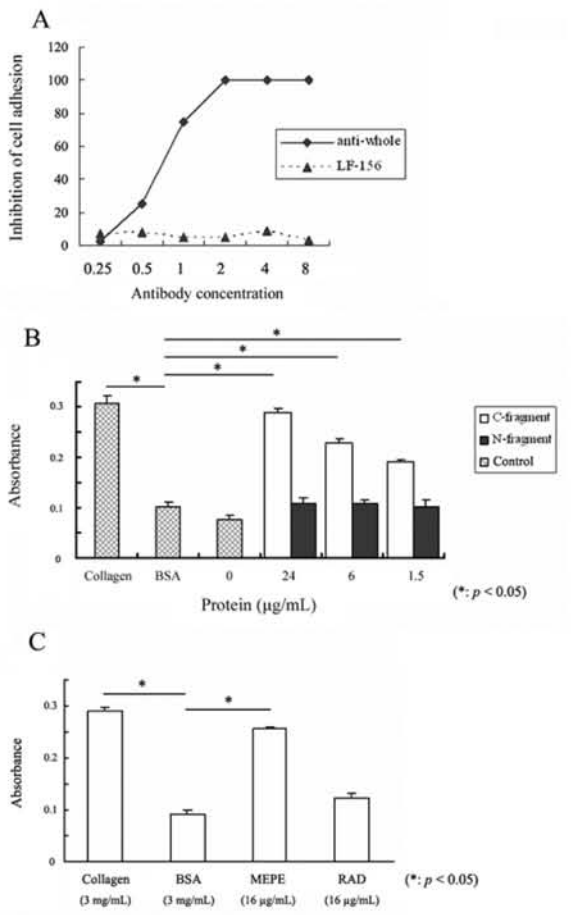


Figure 4. MEPE induces cell adhesion *via* the RGD sequence. **(A)** In the antibody neutralization test, the antibody against the full-length prokaryotic protein ($F_{E.coli}$) dose-dependently neutralized cell adhesion on plates coated with 100 μL of F_{HEK} at 2 μg/mL, and 2 μg/mL of the antibody could neutralize 100% of cell adhesion. However, the LF-156 antibody, which was raised against the partial sequence of MEPE (CSREKVKGGVEHAGRAG & CSKHTKHTRQTRRSTHGG), showed no effect on neutralization of protein activity. **(B)** The C-terminal fragment protein containing the RGD motif produced by *E. coli* ($C_{E.coli}$) promoted cell adhesion, while the N-terminal fragment protein produced by *E. coli* ($N_{E.coli}$) did not. **(C)** The G176A mutant (RGD→RAD) protein produced by *E. coli* ($RAD_{E.coli}$) did not promote cell adhesion at 16 μg/mL. *P < 0.05 compared with the control group (BSA).

MEPE at this site is furin, which is a ubiquitously expressed proprotein convertase. To date, 7 members of the proprotein convertase family have been identified in mammalian species, namely, furin, PC2, PC1/PC3, PC4, PACE4, PC5/PC6, and LPC/PC7/PC8/SPC7 (Nakayama, 1997). They have been shown to be responsible for the conversion of precursors of peptide hormones, neuropeptides, and many other proteins into their biologically active forms (Nakayama, 1997). For example, furin can initiate BMP activity by direct endoproteolytic cleavage. Cleavage at the upstream site regulates the activity and signaling range of mature BMP-4 (Nakayama, 1997; Cui *et al*., 1998; Degnin *et al*., 2004). In rats, furin is widely expressed at all stages of dentinogenesis, from embryonic day 20.5 to post-natal day 14 (Akamatsu *et al*., 2000). Analysis of our data suggests that furin processes MEPE and that the active C-terminal fragments can be produced *in vitro*. Therefore, furin is a strong candidate enzyme for processing of active fragments of MEPE; however, this study does not exclude the possibility of other MEPE-processing enzymes.

The effects of the matrix are primarily mediated by integrins, a family of cell-surface receptors that attach cells to the matrix and mediate mechanical and chemical signals from the matrix. These signals regulate the activities of cytoplasmic kinases, growth factor receptors, and ion channels, and control the organization of the intracellular actin cytoskeleton (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Binding between the RGD and integrins may trigger downstream signaling pathways through mediators such as FAK and ERK to regulate cell adhesion, migration, proliferation, and differentiation (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Plow *et al*., 2000; Altroff *et al*., 2001). The cell adhesion test showed that the MEPE protein could induce cell adhesion *via* the RGD motif, which is located in the C-terminal cleavage product. MEPE may form part of the scaffold bridge between osteoblasts or odontoblasts and the extracellular matrix to regulate crystal growth. Therefore, in dental tissue, the C-terminal cleavage product is the active form of MEPE, which can promote cell adhesion through the RGD sequence.

In conclusion, the results of this study indicate that MEPE is cleaved by furin into 2 fragments during its secretion by odontoblasts. The C-terminal cleavage product, *via* the RGD motif, is an active fragment that promotes cell adhesion. Proteolytic processing is required for the activation of MEPE in dental pulp, and may play important roles in dentinogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly appreciate the contributions of Dr. Larry W. Fisher (NIDCR, Bethesda, MD, USA), Professor Wenli Yan (Fourth Military Medical University, China), and Professor James P. Simmer (University of Michigan, Ann Arbor, USA). The work was supported by a Japan-China Sasakawa Medical Fellowship, by Grants-in-Aids from the JSPS (Nos. 22390357 and 22659343 to N.K.; and No. 21791838 to S.T.), and by grants from the NSFC (No. 30901674 to H.W.).

REFERENCES

Akamatsu T, Matsuda Y, Tsumura K, Tada J, Parvin MN, Kanamori N, *et al*. (1999). Subtilisin-like proprotein convertase PACE4 (SPC4) is a candidate processing enzyme of bone morphogenetic proteins during tooth formation. *Dev Dyn* 216:481-488.

Akamatsu T, Matsuda Y, Tsumura K, Tada J, Parvin MN, Wei W, *et al*. (2000). Highly regulated expression of subtilisin-like proprotein convertase PACE4 (SPC4) during dentinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 272:410-415.

Altroff H, van der Walle CF, Asselin J, Fairless R, Campbell ID, Mardon HJ (2001). The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J Biol Chem* 276:38885-38892.

Arany S, Nakata A, Kameda T, Koyota S, Ueno Y, Sugiyama T (2006). Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 342:718-724.

Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B (2001). Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics* 74:342-351.

Bresler D, Bruder J, Mohnike K, Fraser WD, Rowe PS (2004). Serum MEPE-ASARM-peptides are elevated in X-linked rickets (HYP): implications for phosphaturia and rickets. *J Endocrinol* 183:R1-R9.

Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17:4735-4743.

Degnin C, Jean F, Thomas G, Christian JL (2004). Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* 15:5012-5020.

Fisher LW, Fedarko NS (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44(Suppl 1):33-40.

Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, *et al.* (2003). Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 278:1998-2007.

Hayashibara T, Hiraga T, Yi B, Nomizu M, Kumagai Y, Nishimura R, *et al.* (2004). A synthetic peptide fragment of human MEPE stimulates new bone formation *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res* 19:455-462.

Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK (2004). Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *J Dent Res* 83:496-499.

Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, DenBesten P (2005). MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol* 50:923-928.

Liu S, Brown TA, Zhou J, Xiao ZS, Awad H, Guilak F, *et al.* (2005). Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia. *J Am Soc Nephrol* 16:1645-1653.

Lu C, Huang S, Miclau T, Helms JA, Colnot C (2004). Mepe is expressed during skeletal development and regeneration. *Histochem Cell Biol* 121:493-499.

MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Dong J (2002). MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect Tissue Res* 43:320-330.

Nagel DE, Khosla S, Sanyal A, Rosen DM, Kumagai Y, Riggs BL (2004). A fragment of the hypophosphatemic factor, MEPE, requires inducible cyclooxygenase-2 to exert potent anabolic effects on normal human marrow osteoblast precursors. *J Cell Biochem* 93:1107-1114.

Nakayama K (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327(Pt 3):625-635.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788.

Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, *et al.* (2003). Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem* 278:34700-34708.

Qin C, Baba O, Butler WT (2004). Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:126-136.

Quarles LD (2003). FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1-E9.

Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, *et al.* (2000). MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67:54-68.

Six N, Septier D, Chaussain-Miller C, Blacher R, DenBesten P, Goldberg M (2007). Dentonin, a MEPE fragment, initiates pulp-healing response to injury. *J Dent Res* 86:780-785.

Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS (2004). Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem* 279:980-986.

歯周病学分野

和泉 雄一

医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻・教授
歯周病学／歯学博士

1）研究の課題名

全身疾患（腹部大動脈瘤）とリスクファクターとしての歯周病:その連関と関連メカニズム

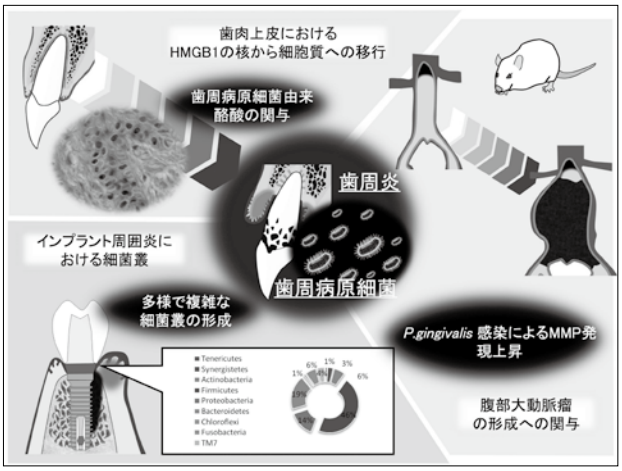
Study on association between periodontitis and systemic diseases（abdominal aortic aneurysms）: The link and relevant mechanisms

歯周病と循環器系疾患が関連する機序については、いまだ不明な点が多い。腹部大動脈瘤病変ではマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）の上昇が認められ、腹部大動脈瘤患者の動脈瘤病変から、高率で歯周病原細菌が検出されている。そこで、歯周病原細菌感染が腹部大動脈瘤の進行に与える影響を検討することとした。マウスの腹部大動脈に塩化カルシウムを塗布することにより大動脈瘤を誘導した。マウスに Porphyromonas gingivalis または Aggregatibacter actinomycetemcomitans を投与し、大動脈瘤誘導4週後に解析した。P. gingivalis を感染させた群では、未感染群と比較して動脈拡張が有意に亢進していた。一方、A. actinomycetemcomitans を感染させた群では有意な差は認められなかった。免疫組織学的解析から、P. gingivalis 感染させた群で動脈瘤組織でのT細胞、マクロファージ、MMP-2の増加が観察された。培養した脾細胞にP. gingivalis で刺激したところ、細胞増殖とMMP-2産生が促進した。結論として、P. gingivalis 感染がMMPの発現上昇を誘導して腹部大動脈瘤形成を促進することが示された。

インプラント周囲炎はインプラント治療の普及に伴い、今後増加が予想される。このインプラント周囲炎に関与する細菌叢を検索した。全体で335クローンから112菌種が同定された。そのうち51菌種は培養不能で、22菌種は新規の属類であった。歯周炎でよく見られる菌種以外にも、いくつかの候補菌種が見つかった。

High-mobility group box-1（HMGB1）は核タンパク質のひとつで、組織傷害もしくは炎症において細胞外液に放出され、組織修復と防御反応を誘起する。本研究では歯肉の免疫組織染色により、HMGB1が健常な歯肉上皮では核内に留まったが、ポケット上皮においては核から細胞質に移行していることを確認した。また、歯肉上皮モデルで、歯周病原細菌の代謝産物の酪酸が、細胞死を伴った細胞外へのHMGB1放出を誘導することを見出した。

2)



3)　研究内容の英文要約

Abdominal aortic aneurysm（AAA）is a common and lethal disorder, and MMPs are highly expressed in AAA lesions. To analyze the influence of periodontopathic bacteria on AAA dilatation, challenge with Porphyromonas gingivalis can accelerate, or even initiate, the progression of experimental AAA through the increased expression of MMPs.

The biofilm in peri-implantitis（PI）showed a more complex microbiota when compared to periodontitis and periodontally healthy teeth, and it was mainly

composed of Gram-negative anaerobic bacteria. Common periodontopathic bacteria showed low prevalence, and several bacteria were identified as candidate pathogens in PI.
Immunohistochemical staining of inflamed gingival revealed that HMGB 1 is exclusively dislocated from the nucleus to the cytoplasm in the pocket epithelium, whereas it is mainly present in the nucleus in the gingival epithelium. Butyric acid, an extracellular metabolite from periodontopathic bacteria populating the periodontal pocket, induced the passive release of HMGB 1 as a result of eliciting necrosis in the human gingival epithelial cell line.
Low-level Er:YAG laser irradiation increases osteoblast proliferation mainly by activation of MARK/ERK, suggesting that the Er:YAG laser may be able to promote bone healing following periodontal and peri-implant therapy.

4）本事業に関連しての改善・整備等

A（研究拠点体制）

米国UCSFのMark Ryder教授およびタイ国Khon Kaen大学のNawarat W Charoen歯学部長との研究協力体制を継続している。

B（研究教育環境）

大学院講義を英語で実施し、英語に親しむ環境の構築に努めた。ソニーとの研究協力関係を樹立した。

C（人材確保）

8人のAISSを獲得した。大学院生を新規に11名受け入れた。

D（人材育成）

新人教育に力を入れ、研究面ではMark　Ryder教授と研究討議を行い大学院生の指導をお願いした。

E（国際化）

1）第23回GCOE海外研究者招聘講演会（Dr. Michael K. McGuire. Using Bioactive Molecules and Living Cellular Construct to Facilitate Hard and Soft Tissue Regeneration. 2010.3.15）を主催した。

2）中国上海交通大学およびタイ国Chulalongkorn大学から留学生を受け入れた。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

若い研究者に出来る限り国際化の意識を植え付けるように努めた。海外での研究発表を積極的に推進している。

6）英文原著論文

1. ◎Aoyama N, Suzuki J, Wang D, Ogawa M, Kobayashi N, Hanatani T, Takeuchi Y, Izumi Y, Isobe M. Porphyromonas gingivalis promotes murine abdominal aortic aneurysms via matrix　metalloproteinase-2 induction. J Periodontal Res in press.
2. ◎Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue K, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. Pocket epithelium in the　pathological setting for HMGB1 release. J Dent Res in press.
3. ◎Tanaka K, Iwasaki K, Fegali K, Komaki M, Ishikawa I, Izumi Y. Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. Archs Oral Biol in press.
4. ◎Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. Lasers Med Sci 25（4）:559-69, 2010.
5. ◎Iimura　T, Himeno　A, Nakane　A, Yamaguchi　A. Hox genes, a molecular constraint for development and evolution of vertebrate body plan. J Oral Biosci 52（2）:155-163, 2010.
6. ◎Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Miyazaki S, Miyauchi T, Nakamura N, Kanamura N, Ando Y, Hanada N, Inoue S. High prevalence of periodontitis in non-elderly obese Japanese adults. Obesity Res Clin Pract 4:e301-e306, 2010.
7. ◎Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. J Oral Microbiol 2:51-54, 2010.
8. ◎Noda M, Nagasawa T, Katagri S, Takahashi Y, Takaichi M, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Ohara S, Kawaguchi Y, Tagami T, Furuichi Y, Izumi Y. Relationship between Periodontitis and Diabetes — Importance of a Clinical Study to Prove the Vicious Cycle. Internal Med 49（10）:881-885, 2010.
9. ◎Onishi H, Arakawa S, Nakajima T, Izumi Y. Levels of specific immunoglobulin G to the forsythia detaching factor of Tannerella forsythia in gingival crevicular fluid are related to the periodontal status. J Periodont Res 45:672-680, 2010.

7）総説ならびに著書

総説

1. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. J

Laser Dent 18（2）:57-58, 2010.
2. 青木章,水谷幸嗣,渡辺久,和泉雄一,石川烈,冨士谷盛興,千田彰,吉田憲司,栗原英見,吉江弘正,伊藤公一.ポジション・ペーパー（学会見解論文）:レーザーによる歯石除去（監修:特定非営利活動法人日本歯周病学会,日本レーザー歯学会）,日歯周誌52（2）:180-190,2010;日レ歯誌21（2）:100-109,2010.
3. 和泉　雄一.内科医のために歯周病の知識　-糖尿病と歯周病の関わりを中心に-
日本臨床内科医会会誌24巻第5号　　平成22年3月10日発行
4. 和泉　雄一.短期集中連載　エビデンスで探る歯周病と身体のかかわり　第3回
心血管の危険因子か.Medical Tribune 2010年5月20日発行
5. 和泉　雄一.歯周病原細菌感染が腹部大動脈瘤形成促進の可能性
Medical Tribune 2010年8月26日発行
6. 和泉　雄一.新歯科の実力　歯周病　読売新聞医療情報部（編）　中央公論新社
2010年6月28日発行
7. 和泉　雄一.歯周病　最新治療　バイオリジェネレーション法　子豚の歯胚から抽出したたんぱく質（エムドゲイン）による再生療法　宝島　宝島社　2010年7月25日発行
8. 和泉　雄一. 大人の悠々 からだチェック!歯周病　歯がぐらつく 週刊　エコノミスト　毎日新聞社　2010年10月12日発行
9. 長澤　敏行,和泉　雄一,　古市　保志.特集Ⅰ歯と骨の炎症制御の新規標的　マクロファージによる歯周炎制御　炎症と免疫　7月号　先端医学社　2010年6月20日発行
10. 和泉　雄一、荒川　真一.インプラント治療をめぐる問題点（インプラント周囲バイオフィルム構成細菌とチタンアレルギー）日本歯科医師会雑誌　12月号　2010年12月5日発行
11. 渡辺　久:レーザーによるBiostimulation効果の機序について.日レ歯誌21:169-172,2010.
12. 宮崎英隆、天沼　誠、渡辺　久、加藤純二、鉄村明美、金　舞、佐藤豊彦、根岸明秀、古森孝英、横尾　聡:臨床診断にもとづいた顎口腔血管性病変のレーザー治療―血管性病変の臨床分類と治療体系の中におけるレーザー治療の位置づけー.日レ歯誌21:203-210,2010.
13. 渡辺　久:レーザー治療による歯周および歯石の管理　日歯医師会誌 63（5）:511-521, 2010.
14. 渡辺　久:レーザーによる歯石除去の臨床的要点　日歯レ誌　1（1）:12-17, 2010.
15. 渡辺　久:「手術時歯根面レーザー応用加算」の保険導入に寄せて.Dental Diamond 35（505）:170-175, 2010.
16. Benhamou V, 簗瀬武史,青木　章,江黒　徹.Photodisinfection（光殺菌）の可能性.日歯先技研会誌16（4）:197-199, 2010.

著書

1. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Lasers in Periodontics. In: Consulelo VM, Claudia C（Eds）, Lasers in dentistry. Edizioni Martina, Bologna, Italy, pp.163-176, 2010.
2. 和泉雄一、吉野敏明.エビデンスに基づく診断・治療とリスクコントロール.和泉雄一,吉野敏明編著,インプラント周囲炎を治療する.医学情報社,東京、2010年6月20日発行.
3.和泉雄一、児玉利朗、松井孝道編著.新インプラント周囲炎へのアプローチ.
永末書店　2010年12月8日発行
4. 和泉　雄一.企画編集:月刊　糖尿病　12月号　医学出版　2010年12月1日発行
5. 和泉　雄一.序文.特集　歯科と医科のクロストーク.PM　基礎・治療　PROGRESS IN MEDICINE　11月号　ライフ・サイエンス　2010年11月10日発行
6. 小田　茂.歯周手術後の疼痛、編者　朝波惣一郎、王　宝禮、薬‘10/’11　歯科　疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本、p186-187,クインテッセンス出版、東京、2010.10.10.
7. 和泉雄一,小田　茂,小林宏明,竹内康雄,秋月達也,水谷幸嗣.マスターしよう!歯周治療　ー歯周病診断と治療計画立案Basicー、歯周治療トレーニングDVD、株式会社ジーシー、東京、2010.8.10.
8. 青木　章,水谷　幸嗣,和泉雄一.Er:YAGレーザーによるデブライドメント.和泉雄一,吉野敏明編著,インプラント周囲炎を治療する.医学情報社,東京,pp.150-57, 2010.
9. 青木　章,水谷　幸嗣,谷口陽一,内山真子,和泉雄一.現在の歯科用レーザーの潮流とその展望,総論:各波長および各歯科領域について.そこが知りたい‼歯科用レーザー＆ピエゾ「臨床にあった機種」選び方＆活用法ガイド2010.クインテッセンス,東京,pp.90-99, 2010.

10. 青木　章,谷口陽一,Georgios E. Romanos,Aristeo A. Takasaki,水谷幸嗣,和泉雄一.インプラント周囲炎の治療へのレーザーの応用.和泉雄一,児玉利朗,松井孝道編著:インプラント周囲炎へのアプローチ,永末書店,東京, pp.70-76, 2010.
11. 竹内康雄.口臭症.天笠光雄,喜多村健,山田和男,和気裕之,中久木康一 編
この疾患　医科で診る?歯科で診る?　デンタルダイヤモンド社,東京.pp.42-45, 2010.
12. 小柳達郎,竹内康雄,和泉雄一. インプラントと細菌学.和泉雄一,吉野敏明 編 インプラント周囲炎を治療する. 医学情報社,東京.p.32-37, 2010.
13. 小柳達郎,竹内康雄,和泉雄一. インプラント周囲の細菌叢.和泉雄一,児玉利郎,松井孝道　編 新インプラント周囲炎へのアプローチ 永末書店,京都.p.17-19, 2010.
14. 荒川　真一、和泉　雄一、眞野　喜洋:新材料・新素材シリーズ　マイクロバブル・ナノバブルの最新技術 II　監修:拓殖秀樹　株式会社　シーエムシー出版　3　オゾンナノバブル水の歯周治療への応用　p.252-257. 2010.5.31.　第1刷発行
15. 和泉　雄一、春日井　昇平、荒川　真一:インプラント周囲炎を治療する:エビデンスに基づく診断・治療とリスクコントロール、インプラント周囲炎とは、p. 6-p. 11、 編著　和泉雄一、吉野敏明、医学情報社　平成22年6月20日　第一版
16. 和泉 雄一、荒川 真一:歯周炎による関節リューマチ（RA）発症リスクの増加　デンタルダイヤモンド11月号　医学最新情報　第35巻第15号 62-65. 2010年11月1日
17. 荒川　真一:Progress in Medicine、特集 「歯科医科連携が重要な疾患:金属・レジンアレルギー、掌蹠膿疱症、関節リウマチ」Vol.30（11）, 53（2819）-57（2823）, 2010, 株式会社　ライフ・サイエンス 2010.11.10発行
18. 金澤真雄,長澤敏行,片桐さやか,新田浩,井上修二.糖尿病治療による歯周病への効果 月刊糖尿病（12月号）医学出版 2010, 96-101.
19. 片桐さやか,新田浩.歯周治療よる糖尿病への効果月刊糖尿病（12月号）医学出版 2010, 102-107.
20. 片桐さやか、長澤敏行.Periodontal Medicine. Progress in Medicine（12月号）特集
医科と歯科のクロストーク　ライフ・サイエンス社,2010, 23-26.
21. 井上修二、金澤真雄、片桐さやか、新田浩、長澤敏行.生活習慣病Progress in Medicine （12月号）特集　医科と歯科のクロストーク　ライフ・サイエンス社,2010, 27-31.

翻訳

1. 青山典生,荒川真一,和泉雄一.口腔粘膜欠損に対して組織工学的に作製した二層性細胞シートを用いた治療:ケースシリーズ（翻訳）The international Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.2, p.32-39.
2. 大西英知,荒川真一,和泉雄一.無機ウシ骨（Bio-Oss）は骨芽細胞様のmiRNAを制御する（翻訳）The international Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.2, p.74-79.
3. 青山典生,荒川真一,和泉雄一.Laser-Lockカラーインプラント周囲骨頂レベルのX線解析（翻訳）The international Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No. 3, P. 21 -27. 、
4. 福田幹久,荒川真一,和泉雄一.リコンビナント骨形成タンパク質-2/無細胞性コラーゲンスポンジを非脱灰骨補填剤と併用した上顎洞底増大術:3症例の報告（翻訳）The international Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.3, p.29 -37.
5. 青山典生,荒川真一,和泉雄一.インターロイキン-6-572C/G多型と慢性歯周炎の相
（翻　訳）The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.4, p.75- 78.
6. 青山典生,荒川真一,和泉雄一.抜歯窩に用いた組み換えヒト血小板由来成長因子BBの組織学的評価:ケースシリーズ（翻訳）The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.5, p.37- 44.
7. 青山典生,荒川真一,和泉雄一.上顎前歯部でのインプラント埋入のためのコントロールドアシステッド歯槽堤拡大術:テクニカルノート（翻訳）The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, 2010.Vol 18,No.6, p.54- 60.
8. 和泉雄一,吉田直美,小森朋栄　監訳,松崎愛子　訳.目で見る　ペリオドンタルインスツルメンテーションII　アセスメントとインスツルメンテーションJill S.Nied-Gehring 著 医歯薬出版株式会社　2010年1月25日
9. 和泉雄一,吉田直美,小森朋栄　監訳,小原由紀,河野章江　訳.目で見る　ペリオドンタルインスツルメンテーションIII　デブライドメントJill S.Nied-Gehring 著　医歯薬出版株式会社　2009年12月20日

10. 和泉雄一,吉田直美,小森朋栄　監訳, 村上恵子,野村正子　訳.目で見るペリオドンたるインスツルメンテーションⅣ　アドバンス　スキルJill S.Nied-Gehring著　医歯薬出版株式会社　2010年4月1日発行

8）平成22年度までの自己評価

今年度の研究課題についてはほぼ予定通りの進行を示している。また、研究拠点体制作りでは、タイのKhon Kaen大学のNawarat W Charoen歯学部長とのコラボレーションが順調に進んでいる。

9）和文原著論文

1. 北川原　聡.歯周炎患者における抗菌ペプチドLL-37の臨床的意義.日歯周誌　52（4）401-408, 2010.
2. 高森一乗, 青木　章, 永井茂之, 加藤純二, 西山俊夫, 田上順次, 篠木　毅. 日本レーザー歯学会第1回歯科用レーザー安全講習会報告-アンケート調査分析-.日レ歯誌21（1）:9-17, 2010.
3. 渡辺　久、萩原さつき、福田幹久、和泉雄一、田村紀子、鈴木将光、川崎大輔、深堀勝博:歯周炎に対する音波振動歯ブラシ使用下でのマスティックエッセンシャルオイル配合歯磨剤の有効性に関する二重盲検無作為化比較試験　薬理と治療（Jpn Pharmacol Ther）38（10）:915-925, 2010.
4. 渡辺　久,萩原さつき,和泉雄一:音波振動歯ブラシとマスティック配合歯磨剤の慢性歯周炎に対する臨床的・細菌学的効果;日歯保存誌　53（2）,123-132, 2010.
5. 川崎大輔、三浦直良、櫻井英知、深堀勝博、渡辺久:歯周病原細菌に対するマスティックエッセンシャルオイルの選択的な抗菌作用　薬理と治療（Jpn Pharmacol Ther）38（3）:257-260, 2010.

10）学会発表（英文）

1. Taniguchi Y, Aoki A, Mizutani K, Takeuchi Y, Takasaki AA, Y. Izumi Y. Determination of optimal irradiation parameters for debridement of micro-structured surface of titanium implant with a high-pulse-rate Er:YAG laser. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, 2010. 3. 9-11.
2. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang C-Y, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, 2010. 3. 9-11.
3. Rosa DSA, Aranha ACCC, Eduardo CP, Aoki A. Esthetic treatment of gingival melanin pigmentation with Er:YAG laser. Twenty-four months of patient follow-up. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, Mar 9-11, 2010.
4. Watanabe H, Taniguchi Y, Izumi Y. The precise incision by Er:YAG laser for making flap in periodontal surgery. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, 2010. 3. 9-11.
5. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang C-Y, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. Academy of Laser Dentistry 17th Annual Conference, Miami, USA, 2010. 4. 14-17.
6. ◎Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of the microbiota sssociated with peri-implantitis. International Association of Dental Research General Session, Barcelona, Spain 2010.7.16.
7. Takayama K, Masuda H, Sakuma T, Takeuchi Y, Izumi Y. Detecting periodontopathic bacteria in oral fluid. International Association of Dental Research General Session Barcelona, Spain 2010.7.16.
8. Watanabe H, Takeuchi Y, Izumi Y. Epigallocatechin gallate Promotes bacteriostatic and antioxidant activities. 88th International Association of Dental Research General Session Barcelona, Spain 2010.7.16.
9. ◎Nanbara H, Wara-aswapati N, Nagasawa T, Yoshida Y, Yashiro R, Bando Y, Kobayashi H, Boch J.A, Izumi Y. Induction of Wnt5a in THP-1 cells by periodontopathic bacteria. 88th International Association of Dental Research General Session, Barcelona, Spain 2010.7.16.
10. ◎Ebe N, Hara-Yokoyama M, Iwasaki K, Iseki S, Okuhara S, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Watanabe A, Akizuki T, Watanabe H, Yanagishita M, Izumi Y. Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. 88th International Association of Dental Research General Session, Barcelona, Spain 2010.7.16.
11. ◎Kobayashi C, Yaegaki K, Calenic B, Ishkitiev N, Kobayashi H, Izumi Y. H2S causes apoptosis in stem cells from human dental pulp. Tissue Injury and Pulp Regeneration IADR Pulp Biology and Regeneration Group Symposium, Geneva, 2010. 7.18-20.
12. ◎Nanbara H, Wara-aswapati N, Yoshida Y, Nagasawa T, Yashiro R, Bando Y, Kobayashi H, Boch JA, Izumi Y.P. gingivalis LPS induce Wnt5a via NF-κB and STAT1 signaling pathway. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 2010,8.30
13. ◎Yamada A, Izumi Y, Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Okano T. Expression of WNT related gene in human periodontal ligament cells during osteogenic differentiation. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,

14. ◎Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Yamato M, Ishikawa I, Okano T, Izumi Y. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,
15. Bharti P, Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Kobayashi H, Izumi Y. Periodontal treatment increases serum adiponectin level in type2 diabetes patients. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,
16. ◎Haruta C, Kobayashi H, Kasama T, Izumi Y. Anandamide have a bone metabolism function through TRPV1 receptor and NF- κ B signaling pathway. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,
17. Watanabe H, Hagiwara S, Fukuda T, Izumi Y. Sonic toothbrush and mastic dentifrice are useful for chronic periodontitis. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,
18. Tsukui A, Watanabe H. Application of Er:YAG laser in semi-lunar repositioned flap procedure. 6th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology. Honolulu, Hawaii, 2010.10.30-11.2,
19. ◎Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. World Congress on Oral Implantology 2010.11.20, New Delhi, India
20. ◎Taniguchi Y, Aoki A, MIzutani K, Takeuchi Y, Takasaki AA, Izumi Y. Optimal irradiation parameters for debridement of micro-structured titanium implants with Er:YAG laser. World Congress on Oral Implantology 2010.11.20, New Delhi, India
21. ◎Nanbara H, Wara-aswapati N, Nagasawa T, Yoshida Y, Yashiro R, Bando Y, Kobayashi H, Boch JA, Izumi Y. Functions of PI3K and MAPK on Wnt5a expression in THP-1. 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research Kitakyushu, Japan, 2010, 11.20-21.
22. ◎Rajakaruna GA, Uchida K, Umeda M, Furukawa A, Suzuki Y, Lokman N, Izumi Y, Eishi YDetection of periodontal pathogens in gingival tissue using novel MAb. 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research Kitakyushu, Japan, 2010, 11.20-21.
23. ◎Tsuno A, Umeda M, Ishikawa I, Maruoka Y, Okagami Y, Izumi Y. Evaluation of the antimicrobial photodynamic therapy using high power LED against periodontal pathogens in vitro. The 50th Anniversary, General Session, and International Congress of the Korean Academy of Periodontology. Seoul, Korea, 27-28 November 2010.
24. ◎Hayakumo S, Arakawa S, Onishi H, Komaki M, Nakagawa I, Izumi Y. Effectiveness of ozone nano bubble water for periodontal therapy. The 50th Anniversary, General Session, and International Congress of the Korean Academy of Periodontology. Seoul, Korea, 27-28 November 2010.

11）学会発表（和文）

1. 青山典生,鈴木淳一,小川真仁,小林奈穂,花谷智哉,竹内康雄,和泉雄一,磯部光章.
   The suppression of periodontal infection-involved abdominal aortic aneurysms development with clarithromycin（クラリスロマイシンによる歯周病原細菌感染を伴った腹部大動脈瘤の進行抑制）.第74回日本循環器学会学術集会（2010.3.5-7京都）
2. 小林奈穂, 鈴木淳一, 小川真仁, 青山典生, 花谷智哉, 和泉雄一, 磯部光章.Periodontal pathogen enhances neointimal formation in mice（歯周病原細菌はマウスにおける新生内膜形成を促進する）.第74回日本循環器学会学術集会（2010.3.5-7京都）
3. 青山典生,鈴木淳一,小川真仁,小林奈穂,花谷智哉,竹内康雄,磯部光章,和泉雄一.歯周病の存在はMMPを介し血管病変の形成を促進する.第33回日本血栓止血学会学術（2010.4.22-24鹿児島）
4. 姫野彰子、中根綾子、和泉雄一、山口朗、飯村忠浩. 蛍光イメージングによる骨細胞の形態・機能分化の計測. 第30回日本骨形態計測学会（2010.5.13-15. 米子）
5. 渡辺　久,萩原さつき,福田幹久,和泉雄一.慢性歯周炎に対する音波振動ブラシとマスティック配合歯磨剤の臨床的・細菌学的効果.第53回日本歯周病学会春季学術大会（2010.5.14-15. 盛岡）
6. 梅田誠,石川烈,岡上吉秀,津野顕子,藤原香,Amodini-RajakarunaGamaralalage,三浦幹剛,土屋文人,和泉雄一.歯周病原細菌に対する高出力赤色LEDを用いた抗菌光線力学療法の至的条件の検討.第53回日本歯周病学会春季学術大会（2010.5.14-15. 盛岡）
7. 小林宏明,長澤敏行,竹内康雄,渡辺香,北川原聡,藤川桂奈,若松美江,大西英和,小柳達郎,鈴木允文,谷口陽一,南原弘美,早雲彩絵,姫野彰子,高橋充,高松秀行,和田真由子,柳憲一郎,山井雅文,和泉雄一.ヒアルロン酸配合チューインガムによる歯肉炎改善効果に関する研究.第53回日本歯周病学会春季学術大会（2010.5.14-15. 盛岡）
8. 春田千裕, 小林宏明, 笠間健嗣, 山口洋子, 和泉雄一.アナンダマイドによるヒト歯根膜細胞からの

IL-11 産生機序.第53回日本歯周病学会春季学術大会（2010.5.14-15. 盛岡）

9. 早雲彩江,荒川真一,大西英知,和泉雄一.オゾンナノバブル水の歯周治療に対する効果の検討.第53回日本歯周病学会春季学術大会（2010.5.14-15. 盛岡）
10. 塩山秀裕, 水谷幸嗣, 田中敬子, 青山典生, 藤原香, 須田智也, 木下淳博, 和泉雄一.エムドゲイン®ゲルを用いた先進医療「歯周外科治療におけるバイオ・リジェネレーション法」の治療成績.第132回日本歯科保存学会春季学術大会（2010.6.4-5. 熊本）
11. 佐藤郁文, 水谷幸嗣, 青木　章, 谷口陽一, 福田幹久, 石田裕子, 角　保徳, 和泉雄一: 光干渉断層画像診断法（OCT）の歯周組織診断への応用.第132回日本歯科保存学会春季学術大会（2010.6.4-5. 熊本）
12. 青山典生,鈴木淳一,小川真仁,小林奈穂,花谷智哉,渡辺　亮,和泉雄一,磯部光章.歯周病原細菌感染による腹部大動脈瘤の進展.第14回日本適応医学会学術集会（2010.7.2-3.東京）
13. 荒木孝二,杉本久美子,遠藤圭子,小原由紀, 近藤圭子, 白田千代子, 塩沢育己,小田茂:東京医科歯科大学におけるチーム歯科医療理解への試み　第1報　歯学科・口腔保健学科合同検討授業について.第29回日本歯科医学教育学会 総会・学術大会（2010.7.23-24、盛岡）
14. 杉本久美子,荒木孝二,遠藤圭子,小原由紀,近藤圭子, 白田千代子,塩沢育己,小田茂:東京医科歯科大学におけるチーム歯科医療理解への試み　第2報　授業による歯学科・口腔保健学科学生の認識変化.第29回日本歯科医学教育学会 総会・学術大会（2010.7.23-24、盛岡）
15. 佐藤郁文, 水谷幸嗣, 青木　章, 谷口陽一, 江尻健一郎,澤辺正規, 桃沢裕子, 小田　茂, 角　保徳, 和泉雄一.光干渉断層画像診断法（OCT）の歯周組織診断への応用 -歯槽骨の同定-. 第53回日本歯周病学会秋季学術大会（2010.9.18-19. 高松）
16. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Abiko Y, Izumi Y. Bactericidal effect of a high power blue LED on periodontopathic bacteria. 第53回日本歯周病学会秋季学術大会（2010.9.18-19. 高松）
17. 難波佳子、秋月達也、小田　茂、十川裕子、和泉雄一:主訴が歯周病でない患者に対して、わかりやすい炎症部位を指摘し動機付けを行った1症例.第53回日本歯周病学会秋季学術大会（2010.9.18-19. 高松）
18. 小林奈穂, 鈴木淳一, 小川真仁, 青山典生, 花谷智哉, 芦垣紀彦, 吉田明日香, 磯部光章, 和泉雄一.歯周病原細菌はマウスにおける新生内膜形成を促進する.第53回日本歯周病学会秋季学術大会（2010.9.18-19. 高松）
19. 花谷智哉,鈴木淳一,青山典生 ,小川真仁 ,小林奈穂 , 芦垣紀彦 ,吉田明日 ,磯部光章 ,和泉雄一.歯周病原細菌感染は心筋虚血後のリモデリングを悪化させる.第53回日本歯周病学会秋季学術大会（2010.9.18-19. 高松）
20. 花谷智哉,鈴木淳一,小川真仁,青山典生,小林奈穂,芦垣紀彦,吉田明日香,和泉雄一,磯部光章.歯周病原菌感染はマウス心筋梗塞を増悪させる.第14回日本心不全学会学術集会　（2010.10.7.東京）
21. 小林知映,八重垣　健,小林宏明,和泉雄一.硫化水素はヒト歯髄細胞にアポトーシスを誘導する.第133回日本歯科保存学会秋季学術大会　（2010.10.28-29.岐阜）
22. 青山典生、鈴木淳一、吉田明日香、竹内康雄、磯部光章、和泉雄一.歯周病原細菌感染を伴う腹部大動脈瘤に対する薬物の作用.第133回日本歯科保存学会秋季学術大会　（2010.10.28-29.岐阜）
23. 谷口 陽一, 青木 章, 水谷 幸嗣, 竹内 康雄, 和泉 雄一: 高ヘルツEr:YAGレーザーによるインプラント体粗造面の最適デブライドメント出力の検討. 第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会（2010.11.13-14.名古屋）
24. 髙森一乗, 青木　章, 天谷哲也, 加藤純二, 永井茂之, 吉田　格,大浦教一, 和賀正明, 田上順次, 篠木　毅.第2回歯科用レーザー安全講習会開催報告. 第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会（2010.11.13-14.名古屋）
25. 金　舞,宮崎英隆,天沼　誠,渡辺　久,加藤純二,佐藤豊彦,根岸明秀,横尾　聡.Nd:YAGレーザーを用いて外照射と組織内照射を同時に行った頬粘膜血管奇形の1例.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会（2010.11.13-14.名古屋）
26. 新井　高,渡辺　久,加藤純二,加藤麦夫,篠木　毅,嶋倉道郎,高瀬保晶,竹田淳志,冨士谷盛興,村井睦彦,小森規雄,山口博康.日本レーザー歯学会認定医制度の概要と認定医資格取得について.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会（2010.11.13-14.名古屋）
27. 高橋香,藤田理恵子,片桐さやか,藤田桂一.犬猫の破折歯における回顧的研究-犬205症例 猫18症例について-.第31回動物臨床医学会年次大会（2010.11.21.大阪）
28. 吉田明日香,鈴木淳一,小川真仁, 青山典生, 小林奈穂, 花谷智哉, 芦垣紀彦, 渡邉 亮, 和泉雄一, 磯部光章.圧負荷心肥大における歯周病菌感染の影響.2010年11月26（金）-27日（土）　第32回心筋生検研究会

（2010.11.26-27.東京）

29. 佐藤郁文, 青木 章, 水谷幸嗣, 谷口陽一, 江尻健一郎, 澤辺正規, 桃沢裕子, 坪川正樹, 須田智也, 片桐さやか, 秋月達也, 小田 茂, 角 保徳, 和泉雄一: 波長走査型光干渉断層画像装置（SS-OCT）の歯周組織診断への応用.第75回口腔病学会学術大会（2010.12.3-4.本学）
30. 荒木孝二、杉本久美子、遠藤圭子、小原由紀、近藤圭子、白田千代子、塩沢育己、小田茂:チーム歯科医療促進に向けて　－第1報　歯学科・口腔保健学科合同クリニカル・ケース検討授業の実施と評価.第75回口腔病学会学術大会（2010.12.3-4.本学）
31. 杉本久美子、荒木孝二、遠藤圭子、小原由紀、近藤圭子、白田千代子、塩沢育己、小田茂:チーム歯科医療促進に向けて　－第2報　合同授業実施による歯学科および口腔保健学科学生の認識変化. 第75回口腔病学会学術大会（2010.12.3-4.本学）
32. 礪波健一,俣木志朗,大林尚人,橋本吉明,荒川真一,鵜澤成一,釵持郁,比嘉りつ子,森薗立男,桜井純蘭,足達淑子,森山啓司,嶋田昌彦.東京医科歯科大学歯学部附属病院平成21年度患者満足度アンケート調査の分析結果.第75回口腔病学会学術大会（2010.12.3-4.本学）
33. 早雲彩絵, 荒川真一, 中川一路, 和泉雄一.オゾンナノバブル水の歯周炎に対する効果の検討.第75回口腔病学会学術大会（2010.12.3-4.本学）
34. 谷口 陽一, 青木 章, 水谷 幸嗣, 竹内康雄, 和泉雄一: 高ヘルツEr:YAGレーザーによるインプラント体粗造面の最適デブライドメント出力の検討. 九州インプラント研究会25周年記念学術講演会.（2010.12.11-12. 熊本）
35. 小柳達郎、竹内康雄、丸山緑子、和泉雄一.16S rRNA gene clone library法を用いたインプラント周囲炎細菌叢の解析.九州インプラント研究会25周年記念学術講演会.（2010.12.11-12. 熊本）

12）受賞

1. Aleksic V. The best award in poster presentation. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. The 12th congress of the World Federation for lasers Dentistry（WFLD）, Dubai, Mar 11, 2010.
2. Aleksic V: Student Scholarship Award for 2010（2nd prize）. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. Academy of Laser Dentistry 17th Annual Conference, Miami, USA, April 17, 2010
3. Yamada A:Research Forum Poster Competition First Prize in the category of Basic Science. Expression of WNT related genes in human periodontal ligament cells during osteogenic differentiation. 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology（AAP）Honolulu, Hawaii, 2010.11.1-3.
4. 姫野彰子、中根綾子、和泉雄一、山口朗、飯村忠浩. 平成22年度　ゴールドリボン賞受賞. 蛍光イメージングによる骨細胞の形態・機能分化の計測.（第30回日本骨形態計測学会（2010.5.米子コンベンションセンター　BIG SHIP（鳥取県米子市））
5. 谷口陽一.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会優秀発表賞.高ヘルツEr:YAGレーザーによるインプラント体粗造面の最適デブライドメント出力の検討. 第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会,名古屋, 2010.11.13-14.

13）外部資金獲得状況

科学研究費補助金

1. 和泉雄一（代表）、小林宏明,岩崎剣吾,秋月達也,長澤敏行（分担）:器官形成シグナルのコントロールを基盤にした歯周病に対する新規治療戦略.　科学研究費補助金,基盤研究（B）平成21～23年度.研究費総額:403万円
2. 梅田　誠（代表）:血管系疾患に関与する歯周病原細菌の特定と検証.科学研究費補助金,　基盤研究（C）平成21～23年度.研究費総額:117万円
3. 梅田　誠（分担）井上芳徳（代表）:動脈疾患における歯周病の関与と血小板凝集の影響について.科学研究費補助金,基盤研究（C）平成22～24年度.
4. 荒川真一（代表）:歯周病原細菌由来FDFの細胞への影響及び歯周炎病態への関与の解析.　科学研究費補助金,基盤研究（C）平成21～23年度.研究費総額:195万円
5. 青木　章（代表）,小林宏明,竹内康雄,秋月達也,水谷幸嗣（分担）:光エネルギーを
応用した歯周炎およびインプラント周囲炎の革新的治療法・予防法の開発.科学研究費補助金　基盤研究（C）平成22～23年度,研究費総額:169万円
6. 小林宏明（代表）:歯周炎疾患進行におけるTGF betaを起点としたTh17制御メカニズムの解析.科学

研究費補助金,若手研究B　平成22～23年度　研究費総額:247万円

7. 竹内康雄（代表）:歯周炎・インプラント周囲炎細菌叢の総合的解析と弱アルカリ水による治療効果.　科学研究費補助金,若手研究B　平成21～23年度　研究費総額:91万円
8. 竹内康雄（分担）,長澤敏行（代表）:歯槽骨破壊の防止と動脈硬化抑制のためのWntシグナル制御による新規治療の開発.　科学研究費補助金,基盤研究C,平成20年度～22年度.
9. 片桐さやか: 早期低体重児出産における歯周病由来anti-cardiolipin抗体の役割. 科学研究費補助金,若手研究（B）平成21～22年度. 研究費総額:156万円
10. 佐藤郁文: 歯根膜由来幹細胞シートを主軸とした歯周組織再生療法に関する研究. 科学研究費補助金,若手研究（B）平成21～22年度. 研究費総額:120万円
11. 須田智也:Wntシグナルを介したβ - カテニンによる歯周組織細胞接着機構の解析.科学研究費補助金,若手研究（B）平成22～23年度. 研究費総額:120万円
12. 津野顕子（分担）,新保卓郎（代表）:高齢者や易感染患者への抗菌光線力学的療法を用いた新たな口腔ケアの手法の開発と評価.厚生労働省平成22年度国際医療研究開発費　研究費総額:350万円

奨学寄附金

和泉雄一:ファイザー株式会社　50万円
和泉雄一、渡辺　久:株式会社松風　100万円

受託研究

1. 和泉雄一:新規ビスフォスフォネート歯周病治療薬の局所投与試験
   昭和薬品化工株式会社（H21～24年度）　213万円
2. 和泉雄一:光干渉断層画像診断法（OCT）の歯周組織検査への応用　200万円
3. 和泉雄一,渡辺　久:歯肉溝滲出液（GCF）成分を用いた歯周病罹患部位の診断と治療効果のモニタリングの有用性
   日本歯科医師会（H21～22年度）　70万円
4. 渡辺　久:べにふうき緑茶粉末含有ガム剤の口腔症状への効果に関する研究
   やまと興業株式会社（H21～22年度）　48万円

14）特別講演、招待講演、シンポジウム

1. 和泉雄一:メタボリックシンドロームの黒幕―それは歯周病、8020運動推進特別事業地域保健セミナー、（2010.1.10. 横浜）
2. 和泉雄一:歯周病と早産・低体重児出産との関わり、平成21年度横浜市保健所保健衛生研修会、（2010.1.30. 横浜）
3. 和泉雄一:歯周治療の最前線　―全身との関わりから再生治療までー、東京松風歯科クラブ2010年度2月例会（587回）、（2010.2.17.　東京）
4. 和泉雄一:妊娠と歯周病、平成21年度妊婦歯科保健指導者研修会、（2010.3.4. 富山）
5. 和泉雄一:歯周病は生活習慣病の黒幕か?、第9回生活習慣病フォーラム、（2010.3.25. 郡山）
6. 和泉雄一:糖尿病診療で他科に聞きたいこと、糖尿病と歯周病、東京臨床糖尿病医会「第127回例会」、（2010.4.17. 東京）
7. 和泉雄一:インプラント治療は人間力、神奈川保険医協会歯科部会　2010年度「歯科全体会記念講演」、（2010.5.22. 横浜）
8. 和泉雄一:歯周治療の進め方と歯周外科治療、2010年度日本インプラント臨床研究会、（2010.5.31. 東京）
9. 和泉雄一:歯周組織再生治療を俯瞰する、デンタルセミナー例会（第539回）、（2010.6.26. 東京）
10. 和泉雄一:歯周組織再生治療の現状と展望、第24回大学院医歯学総合研究科大学院セミナー、（2010.7.26. 本学）
11. 和泉雄一:歯周治療とEr:YAGレーザー、第13回Er:YAGレーザー臨床研究会、（2010.8.8. 東京）
12. 和泉雄一:特殊な歯周疾患　―薬物療法患者における歯周治療―、平成22年度徳島インプラント研究会、（2010.8.11. 徳島）
13. 和泉雄一:天然歯とインプラント、第55回日本臨床歯周病学会関東支部教育研修会、（2010.8.22. 東京）
14. 和泉雄一:糖尿病と歯周病―医科歯科連携の必要性、厚木歯科医師会第1回地域医療講習会、（ 2010.9.9. 厚木）
15. 和泉雄一:歯周病と全身とのかかわりー口腔内に現れる薬の副作用を加えて、第2回青葉区歯科医師会・薬剤師会合同研修会、（2010.9.11. 横浜）
17. 和泉雄一:妊婦さんのための歯周病対策、平成22年度千葉県保険医協会医科歯科千葉支部合同研究会、（2010.9.16. 千葉）
18. 和泉雄一:歯周治療におけるEnamel proteinsの臨床

応用:先進医療の結果から考える、シンポジウムⅠ「Enamel Proteins の歯科保存領域における応用を考える」、日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会（第133回）、(2010.10.28. 岐阜)

19. 和泉雄一:歯周組織再生治療を俯瞰する、4支部交流親睦会、(2010.11.6. 立川)
20. 和泉雄一:現代スタンダード歯周治療ー外科で切る　薬で斬るー、IKASHIKA C.D.E. 第48期 Part I、(2010.11.7.　東京)
21. 和泉雄一:レーザーによる歯石除去と根面のデブライドメント—その基礎と臨床、緊急特別フォーラム「歯科保健医療とレーザー治療」、第22回日本レーザー歯学会総会学術大会、(2010.11.13. 名古屋)
22. 和泉雄一:歯周組織再生治療のあるべき姿、「日常臨床における歯周組織再生治療」、エムドゲイン®ゲル特別講演会、(2010.11.23. 東京)
23. 和泉雄一:口腔の健康と全身の健康、平成22年度東京都深川歯科医師会多職種研修会, (2010.11.25. 東京)
24. 和泉雄一:歯周病ーそれは生活習慣病の黒幕だ!、第20回群馬県歯科保健大会群馬県歯科保健指導者講習会、(2010.12.2. 前橋)
25. 和泉雄一:歯周病と糖尿病ーその密接な関係、第12回糖尿病診療ー最新の動向医師・医療スタッフ向け研修会、(2010.12.5. 名古屋)
26. 和泉雄一:天然歯との共存—総括、セッション⑤、九州インプラント研究会25周年記念学術講演会、(2010.12.12. 熊本)
27. 和泉雄一:歯周組織再生治療、第508回二火会セミナー、(2010.12.14. 東京)
28. 和泉雄一:知っておきたい妊婦の歯周病対策、平成22年度健康づくりサポート医師・歯科医師研修会、(2010.12.16. 奈良)
29. 和泉雄一:歯周病と糖尿病　—医科歯科連携の必要性—、平成22年度糖尿病ネットワーク医療従事者向け研修会、(2010.12.18. 東村山)
30. Watanabe H: Laser uses in periodontal surgery. 2010 International laser dentistry symposium. Invited lecture (2010.11.2 Sydney, Australia)
31. Watanabe H: Laser assist periodontal therapy with 810 nm Diode. Invited lecture and Hands-on (2010.11.2 Sydney, Australia)
32. 渡辺　久:レーザー治療による歯周および歯石の管理, 第10回日本歯科用レーザー学会総会・　学術大会特別講演 (2010.9.5. 東京)
33. 渡辺　久:歯周病の本質とその治療法　GCデンタルカレッジセミナー　(2010.10.14. 東京)
34. 小田　茂: 平成21年度審査事務歯科エキスパート研修会、歯科医学の基礎知識「齲蝕及び歯周治療」、社会保険診療報酬支払基金研修センター、(2010.1.20. 千葉県白井市)
35. 小田　茂:平成22年度審査事務歯科エキスパート研修会、歯科医学の基礎知識「齲蝕及び歯周治療」、社会保険診療報酬支払基金研修センター、(2010.9.1. 千葉県白井市)
36. 小田　茂:小田茂のスーパーオペレーションテクニック　ー角化歯肉をつくるー、東京医科歯科大学歯科同窓会学術部、(2010.2.14.　東京)
37. 小田　茂:小田茂のスーパーオペレーションテクニック　ー角化歯肉をつくるー、東京医科歯科大学歯科同窓会学術部、(2010.3.28. 東京)
38. 小田　茂:コーディネーター　22年度（社）日本口腔インプラント学会関東・甲信越支部学術シンポジウム「天然歯の保存を考える　-インプラントは天然歯を超えられるか-」「インプラントは天然歯を超えられるか」(2010.8.29. 東京)
39. 青木　章:Er:YAGレーザーの導入による歯周治療の向上—歯周軟組織・硬組織の効果的マネージメント.シンポジウム「最新の歯周治療の革新—そのコンセプト・技術・器材」,日本歯周病学会2010春期学術大会（第53回）, (2010.5.14-15. 盛岡)
40. 青木　章:Er:YAGレーザーを用いた非外科的外科的歯周ポケット治療のエビデンス.シンポジウム「歯周ポケット治療におけるEr:YAGレーザーの使い方,有効性」, 第13回Er:YAGレーザー臨床研究会, (2010.8.8. 東京)
41. 青木　章:千田　彰,津久井明,宮田　隆,吉江弘正,吉野敏明,渡辺　久.パネルディスカッション.シンポジウム「歯周ポケット治療におけるEr:YAGレーザーの使い方,有効性」,第13回Er:YAGレーザー臨床研究会, (2010.8.8. 東京)
42. 青木　章:歯周領域におけるレーザー歯学の将来.シンポジウム「これからのレーザー歯学のめざすもの」.第22回日本レーザー歯学会総会・学術大会, (2010.11.13-14. 名古屋)
43. Aoki A: Current Status of Er:YAG laser in Periodontics-I. Joint fellowship course of Tehran-Aachen Universities - Lasers in Dentistry, Invited lecture Tehran University, (2010.1.19. Tehran, Iran)
44. Aoki A: Current Status of Er:YAG laser in

Periodontics-II. Joint fellowship course of Tehran-Aachen Universities - Lasers in Dentistry, Tehran University, (2010. 1.19. Tehran, Iran)

45. Aoki A: Er:YAG laser-assited periodontal therapy. The 1 2th congress of the World Federation for lasers Dentistry (WFLD), (2010.3.9-11. Dubai)
46. 青木　章:ペリオ治療最前線－基本とその要点から最新治療法まで.伊東・賀茂・熱海三郡市合同歯科医師会学術講演会, (2010.7.3. 熱海)
47. 青木　章:Er:YAGレーザーを併用した歯周ポケット治療. EDLA（エルビウムデンタルレーザーアカデミー）第26回セミナー, (2010.7.25. 東京)
48. 青木　章:インプラント周囲炎治療へのEr:YAGレーザーの応用.日本臨床歯周病学会第55回関東支部教育研修会, (2010.8.22. 東京)
49. 青木　章:レーザー治療の基礎と臨床応用.東京形成歯科研究会主催認定講習会, (2010.9.26. 王子,東京)
50. 青木　章:歯周病治療の最前線～基礎と勘所からレーザーの応用まで.平成22年度札幌歯科医師会第二回学術講演会, (2010.10.30. 札幌)
51. 竹内康雄:シンポジウム「中性機能電解水の歯周・う蝕治療への活用の可能性」
第132回日本歯科保存学会春期学術大会　(2010.6.5. 熊本)

15）主催学会

1. 和泉雄一,渡辺　久:第24回大学院医歯学総合研究科大学院セミナー、(2010.7.26. 本学)
2. 和泉雄一,砂川光宏,松本宏之:エイズ診療従事者臨床研修(歯科)(平成22年度)、(2010.10.6-7, 11.10-11, 本学)

16）新聞、雑誌、TV報道

1. 和泉雄一,青山典生: エビデンスで探る歯周病と身体とのかかわり　第3回　心血管死亡の危険因子か　Medical Tribune　2010年5月20日
2. 和泉雄一:「万病のもと・歯周病!」はなまるマーケットTBSテレビ 2010年6月4日放映
3. 和泉雄一:「2010　歯科治療最前線」 DON　日本テレビ　2010年10月22日放映
4. 渡辺　久:歯周病と全身疾患「こんにちは!　鶴蒔靖夫です。」RFラジオ日本　1422KHz　2010年2月25日　11:30-11:50 放送
5. 渡辺　久:広がる歯科のレーザー応用　秋田さきがけ新聞　2010年12月27日
6. 渡辺　久:医療新世紀　歯周治療に保険適用　広がる歯科のレーザー応用　山口新聞　2010年12月27日
7. 渡辺　久:広がる歯科のレーザー応用　歯周治療に初の保険適用　痛み少なく殺菌効果も　四国新聞　2010年12月31日
8. 渡辺　久:歯の喪失と認知症との関係。日経ビジネス　2010.1.25 56頁
9. 渡辺　久:ボケが始まるとき。週刊現代　6月5日号　2010年.166-169頁
10. 渡辺　久:ワールドミーティング・レポート　第12回世界レーザー歯学連合学術大会に 参加して　DENTAL DIAMOND 35（506）:146-147, 2010.
11. 渡辺　久:歯の手入れで、病気にならない生活　クロワッサン　プレミアム　8月号 55-62, 2010.

17）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授　渡辺　久

講　師　小田　茂、萩原さつき

助　教　梅田　誠、青木　章、荒川真一、小林宏明、竹内康雄

大学院　青山典生、小林知映、春田千裕、小柳達郎、○鈴木允文、谷口陽一、南原弘美、早雲彩絵、○姫野彰子、Aslam AL Mehdi、○GA Rajakaruna、○Bharti Pariksha、高橋茉莉香、○妻沼有香、澤辺正規、○山田　梓、小林奈穂、藤原　香、花谷智哉、伊藤康夫、江尻健一郎、○Chui Chanthoel、吉田明日香、池田裕一、木村康之、遠藤亜希子、清水揚子、芦垣紀彦、丸山緑子、○荻田真弓、津野顕子、芝　多佳彦、葉　暢暢

(○:AISS)

18）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点

若手研究者の育成には大いなる成果が認められ、また、国際交流の点でも徐々に成果を上げつつある。ただ、日頃の研究資金の増額を望みたい。

58 2010年5月20日 Medical Tribune

短期集中連載
エビデンスで探る
歯周病と身体のかかわり
第3回

心血管死亡の危険因子か

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野教授 和泉雄一(写真)
同分野 青山典生

心血管疾患は，日本人の3大死因(悪性新生物，心疾患，脳血管疾患)のうち心疾患と脳血管疾患にかかわる致死的な疾患とされている。心血管疾患による死亡者の大半を占める中高年者で重度歯周病罹患者が多く，近年ではこうした心血管疾患死の危険因子として歯周病が注目されている。

歯周病による骨の喪失で心血管イベント発現率が上昇

歯周病とは歯周組織における炎症性疾患であり，複数の歯周病原細菌の感染により発症する。これら歯周病原細菌は口腔内にとどまらず，血中にも存在することが示されており[1]，その経路として，歯周炎局所で多く見られる歯周ポケット上皮表面の微小潰瘍が指摘されている。

では，歯周病の存在は心血管イベント発現と関連しているのだろうか。両者の間には喫煙や生活習慣など複数の交絡因子が存在するため，さまざまな結果が報告され議論が重ねられてきた。しかし，約1,200人を対象とした疫学研究によって歯周病による骨喪失が心筋梗塞や狭心症の発症リスクを上昇させることが報告され[2,3]，これが契機となり研究が進展することとなった。

歯周治療により血管内皮細胞機能が改善

歯周病がどのように心血管疾患のリスクを上昇させるかについては，いくつかの説が注目されている。

1つは，歯周病原細菌が循環器系組織に直接影響し，心血管疾患の発症や進行を促進するという仮説である。重度歯周病患者では，歯周病原細菌を含む口腔細菌による一過性の菌血症が日常生活で生じている。また，心臓人工弁置換術後で心内膜炎リスクの高い患者に対する歯科治療は，口腔からの細菌感染を防ぐために術前の抗菌薬投与を行う必要がある。これは，歯周病原細菌が心内膜へ定着することを予防するという考え方で，細菌の直接的な影響を懸念している。同様に，アテローム組織あるいは大動脈瘤組織からも複数の歯周病原細菌が検出されており[4]，細菌の直接的な影響が発症や進行を促進する可能性がある(表)。

一方で，全身的な炎症反応が歯周病と心血管疾患を結び付ける鍵であるという仮説も注目されている。歯周病患者では血中のC反応性蛋白(CRP)などが増加しており，歯周炎により全身的な炎症反応の亢進が認められる[5]。全身的な炎症反応の亢進，すなわち炎症性細胞の増加や活性化，炎症性メディエータによる情報伝達の亢進により，心血管疾患を促進する可能性が考えられる。

さらに，この仮説を裏づけるように歯周治療により血管内皮細胞の機能が改善したとの報告もなされている[6]。全顎的にバイオフィルムを徹底的に除去した集中治療群と，標準的な歯周治療を行う対照群を比較した結果，術後2か月時および6か月時の血管内皮の弾性が集中治療群で有意に改善していることが示された(図1)。集中的な歯周治療後は一過性の菌血症が生じやすく，術後1日目に内皮機能が悪化している点は興味深い。さらに，歯周治療の違いにより，血管内皮細胞機能に与える影響が異なることも認められた[7]。

*gingivalis*感染によりアテローム形成が促進

また，心血管疾患の背景として主体を担うアテローム形成を起こしやすくしたモデルマウスにおいて，歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*(*P.g.*菌)を静脈内注射にて長期感染させた群では，アテローム性プラーク形成が促進されたという報告がある[8,9](図2)。

同様に*P.g.*菌を口腔感染させたモデルマウスでも，アテローム形成が促進されている[10]。さらにこの報告では，*P.g.*菌の病原因子である線毛がアテローム形成促進への足がかりとなる可能性を示した。当教室と同大学大学院循環器内科(磯部光章教授)，東京大学大学院先端臨床医学開発講座(鈴木淳一特任准教授)との共同研究によるマウスを用いた実験でも，*P.g.*菌など歯周病原細菌の感染により，腹部大動脈瘤の形成が促進されることが確認されている。

現在，歯周病原細菌をおもに認識するToll様受容体(Toll-like receptor：TLR)が関与している可能性について，数多く検討されている。しかし，いずれも残念ながら仮説の段階であり，歯周病と心血管疾患を結び付ける明確なメカニズムは解明されておらず，精力的に研究されているところである。

アテローム形成を伴わないバージャー病の発症にも関与

バージャー病はアテローム形成を伴わない炎症性の閉塞性血管疾患で，比較的若年の重度喫煙者に好発する。2005年にバージャー病患者の摘出血管から複数の歯周病原細菌が検出され，注目を集めた[11]。対照群とした他の動脈疾患での摘出血管の正常部位からは歯周病原細菌は検出されなかったのに対し，バージャー病患者のサンプルでは高率で検出された。その後，バージャー病患者では*P.g.*菌をはじめとした歯周病原細菌に対する血清抗体価上昇が示され，歯周病原細菌感染とバージャー病との関係がより重要なテーマとなっている[12]。

これまでに，心疾患，冠動脈疾患，脳血管疾患，大動脈疾患，末梢血管疾患など多くの心血管疾患と歯周病との関連性が示されており，歯周病が単に口腔内のみにとどまる疾患ではないことが認識されてきた。われわれは，これらの疾患それぞれについて，歯周病原細菌がどのようにかかわっているのかを個別に検討していくべきだろう。

歯周病を予防，治療することにより，心血管疾患の発症率低下，さらに死亡率抑制につながる可能性も明らかにされている。医科，歯科の連携をさらに緊密にし，わが国の医療の質向上に寄与するためにも，詳細なメカニズムの解析が急務である。

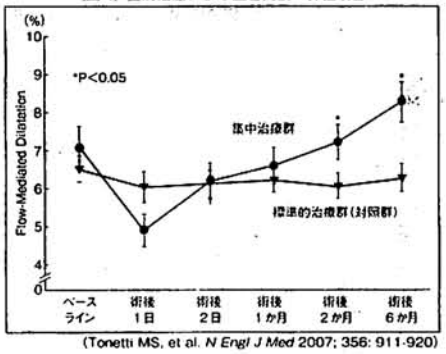
<引用文献>
1) Lockhart PB, et al. *Circulation* 2008; 117: 3118-3125.
2) Beck J, et al. *J Periodontol* 1996; 67: 1123-1137.
3) Dietrich T, et al. *Circulation* 2008; 117: 1668-1674.
4) Kurihara N, et al. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 553-558.
5) Amar S, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1245-1249.
6) Tonetti MS, et al. *N Engl J Med* 2007; 356: 911-920.
7) Ushida Y, et al. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 969-975.
8) Li L, et al. *Circulation* 2002; 105: 861-867.
9) Libby P, et al. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
10) Gibson III FC, et al. *Circulation* 2004; 109: 2801-2806.
11) Iwai T, et al. *J Vasc Surg* 2005; 42: 107-115.
12) Chen YW, et al. *Int J Cardiol* 2007; 31: 79-81.

〈表〉複数の歯周病原細菌を検出

All bacteria studied	28/29(88)	24/28(86)	14/16(88)
Porphyromonas gingivalis	26(81)	22/28(85)	12/16(80)
Treponema denticola	19(59)	12/19(63)	3/10(30)
Prevotella intermedia	13(41)	4/13(31)	0/ 7(0)
Campylobacter rectus	11(34)	5/11(45)	1/ 7(14)
Tannerella forsythensis	10(31)	6/11(55)	0/ 5(0)
Prevotella nigrescens	6(19)	1/ 6(17)	0/ 3(0)
Actinobacillus actinomycetemcomitans	3(9)	0(0)	0/ 3(0)

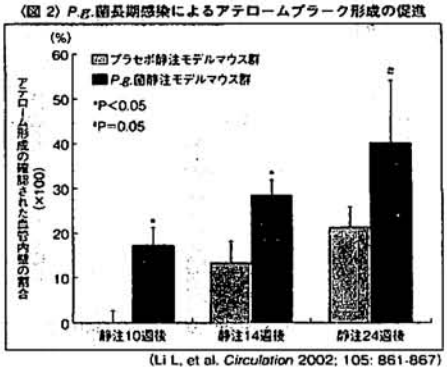
※数値はサンプル数(%)を示す。ポリメラーゼ連鎖反応法にて検出
(Kurihara N, et al. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 553-558)

〈図1〉歯周治療による血管内皮の弾性改善



(Tonetti MS, et al. *N Engl J Med* 2007; 356: 911-920)

〈図2〉*P.g.*菌長期感染によるアテロームプラーク形成の促進



(Li L, et al. *Circulation* 2002; 105: 861-867)

Journal of Dental Research
http://jdr.sagepub.com/

Pocket Epithelium in the Pathological Setting for HMGB1 Release

N. Ebe, M. Hara-Yokoyama, K. Iwasaki, S. Iseki, S. Okuhara, K. A. Podyma-Inoue, K. Terasawa, A. Watanabe, T. Akizuki, H. Watanabe, M. Yanagishita and Y. Izumi

J DENT RES published online 13 December 2010
DOI: 10.1177/0022034510385688

The online version of this article can be found at:
http://jdr.sagepub.com/content/early/2010/12/10/0022034510385688

Published by:
SAGE
http://www.sagepublications.com

On behalf of:
International and American Associations for Dental Research

Additional services and information for *Journal of Dental Research* can be found at:

Email Alerts: http://jdr.sagepub.com/cgi/alerts

Subscriptions: http://jdr.sagepub.com/subscriptions

Reprints: http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav

Permissions: http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

RESEARCH REPORTS
Biological

N. Ebe[1,3], M. Hara-Yokoyama[2,3]*, K. Iwasaki[1,4], S. Iseki[5], S. Okuhara[5], K.A. Podyma-Inoue[2,3], K. Terasawa[2], A. Watanabe[6], T. Akizuki[1], H. Watanabe[1], M. Yanagishita[2,3], and Y. Izumi[1,3]

[1]Section of Periodontology and [2]Section of Biochemistry, Department of Hard Tissue Engineering, Biochemistry, Division of Bio-Matrix, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan; [3]Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan; [4]Department of Oral Maxillofacial Surgery, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; [5]Department of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan; and [6]The Institute of Biomaterial and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan; *corresponding author, m.yokoyama.bch@tmd.ac.jp

J Dent Res X(X):xx-xx, XXXX

Pocket Epithelium in the Pathological Setting for HMGB1 Release

ABSTRACT

High-mobility group box-1 (HMGB1) protein acts as a transcription factor in the nucleus and also as a pro-inflammatory cytokine when released into extracellular fluids. The presence of higher levels of HMGB1 is reported in the gingival crevicular fluid from periodontal patients. Since the proliferation of bacteria within the periodontal pocket is closely involved in the exacerbation of periodontal disease, it is hypothesized that the periodontal pocket causes the release of HMGB1. Immunohistochemical staining of inflamed gingiva revealed that HMGB1 is exclusively dislocated from the nucleus to the cytoplasm in the pocket epithelium, whereas it is mainly present in the nucleus in the gingival epithelium. Butyric acid, an extracellular metabolite from periodontopathic bacteria populating the periodontal pocket, induced the passive release of HMGB1 as a result of eliciting necrosis in the human gingival epithelial cell line. Thus, the periodontal epithelium may provide a unique pathological setting for HMGB1 release by bacterial insult. *Abbreviations*: HMGB1, high-mobility group box-1; TNF-α, tumor necrosis factor-α; CHX, cycloheximide; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; HDAC, histone deacetylase.

KEY WORDS: HMGB1, pocket epithelium, butyric acid.

DOI: 10.1177/0022034510385688

Received February 4, 2010; Last revision May 17, 2010; Accepted June 3, 2010

A supplemental appendix to this article is published electronically only at http://jdr.sagepub.com/appendix.

© International & American Associations for Dental Research

INTRODUCTION

High-mobility group box-1 (HMGB1) is one of the most abundant nuclear non-histone proteins (Bianchi and Beltrame, 1998). In the nucleus, HMGB1 acts as a DNA chaperone that facilitates the rate-limiting DNA distortion during nucleosome sliding and regulates transcription (Bonaldi *et al*., 2002). In contrast, HMGB1 acts as a cytokine when released into the extracellular milieu upon tissue injury or inflammation (Bianchi and Manfredi, 2007). Extracellular HMGB1 induces the migration and/or proliferation of stem cells in muscle (Palumbo *et al*., 2004) and heart (Limana *et al*., 2005), and enhances the immune response by facilitating dendritic cell maturation (Messmer *et al*., 2004; Yang *et al*., 2007), as well as the accumulation of neutrophils (Orlova *et al*., 2007) and the activation of monocytes/macrophages (Scaffidi *et al*., 2002). Thus, HMGB1 triggers tissue repair and immunological defense programs.

However, HMGB1 could also induce maladaptive or exaggerated autoimmune responses, and become pathogenic when released chronically, regardless of the presence of infection (Bianchi and Manfredi, 2007). HMGB1 was originally identified as a late mediator of endotoxin lethality in mice (Wang *et al*., 1999). A pathogenic role of HMGB1 has been suggested in the development of arthritis (Andersson and Erlandsson-Harris, 2004). Consistently, the administration of antibodies to HMGB1 attenuates the endotoxin lethality (Wang *et al*., 1999) and ameliorates collagen-induced arthritis (Andersson and Erlandsson-Harris, 2004).

Inflammatory periodontal disease is caused mainly by Gram-negative bacteria populating the gingival sulcus and periodontal pocket. The pathogenesis of periodontitis is characterized by complex interactions between pathogens and host responses, through cytokines and inflammatory mediators in periodontal tissues (Page, 1991). Recently, Morimoto *et al*. reported the presence of higher levels of HMGB1 in the gingival crevicular fluid from periodontal patients (Morimoto *et al*., 2008), and suggested the role of HMGB1 in inflammatory periodontal diseases. In the present study, we investigated a possibility that the periodontal pocket elicits a pathogenic potential of HMGB1. Therefore, we observed the distribution of HMGB1 around the periodontal pocket by immunohistochemistry. Furthermore, we focused on butyric acid, a virulent factor generated in the periodontal pocket (Kurita-Ochiai *et al*., 1995), and evaluated its effect on the release of HMGB1 *in vitro*.

MATERIALS & METHODS

Reagents

Butyric acid was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Eagle's minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum, and

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

cycloheximide (CHX) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). z-VAD-fmk was purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). Recombinant human tumor necrosis factor-α (TNF-α) was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Preparation of Gingival Tissues

Gingival tissues were collected from two healthy volunteers (a 51- and a 30-year-old women, pocket depth, 2 mm) and four patients with chronic periodontitis (a 30-year-old man, pocket depth, 6 mm; a 51-year-old man, pocket depth, 13 mm; a 67-year-old woman, pocket depth, 12 mm; and a 65-year-old-woman, pocket depth, 5 mm) during periodontal flap surgery. Informed consent was obtained according to guidelines approved by the Ethics Committee of Tokyo Medical and Dental University. The excised tissues were immediately fixed in 4% formalin and embedded in paraffin.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections (5 μm in thickness) of gingival tissues were deparaffinized in xylene and rehydrated through a series of decreasing concentrations of ethanol. For hematoxylin and eosin (H.E.) staining, sections were stained with 1% EosinY solution and Mayer's Hematoxylin (Muto-Kagaku, Tokyo, Japan). To detect HMGB1, we treated the sections with 1% H_2O_2 in methanol for 15 min to inhibit intrinsic peroxidase activity and with 5% skimmed milk for 30 min to prevent non-specific antibody binding. The pre-treated sections were incubated overnight at room temperature with affinity-purified rabbit anti-HMGB1 antibody or rabbit IgG at a concentration of 5 μg/mL (SHINO-TEST Corporation, Kanagawa, Japan) or a control polyclonal rabbit IgG (DAKO, Glostrup, Denmark). We visualized the site of immunoreaction by incubating the sections successively with biotinylated anti-rabbit antibody (CHEMICON, Temecula, CA, USA) at 1:200 dilution for 30 min, avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 min, and 0.05% solution of 3-diaminobenzidine (SIGMA) in the presence of 0.01% H_2O_2 for 10 min. Sections were counterstained with 1% methyl green. The sections were subjected to observation under a Leica DM 5000B microscope. The immunoreactivity was not observed with control IgG.

Cell Culture and Evaluation of Cell Viability

A human gingival epithelial cell line (Ca9-22) was obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB, Osaka, Japan), and was maintained in Eagle's MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (F6178, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), penicillin (50 U/mL), and streptomycin (50 μg/mL) at 37°C in 5% CO_2. After cells were cultured for 16 hrs (1 x 10^5 cells/mL, 0.1 mL/well in 96-well tissue culture plate), the culture medium was replaced with fresh medium containing butyric acid (0.3-20 mmol/L), TNF-α (10 ng/L), CHX 10 μg/L), or z-VAD (5 μmol/L). The concentrations were chosen based on the results as shown in Appendix Fig. 1. Then the cells were cultured further for 48 hrs. For the time-course experiments, the replacement of medium was delayed for 24 or 40 hrs. Cell viability was evaluated by means of a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan). The absorbance at a 450-nm wavelength, due to the reaction of water-soluble tetrazolium salt (WST-8), was measured.

Evaluation of Cell Death and Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) by Flow Cytometry

After the culture (2-4 x 10^5 cells/mL, 0.4 mL/well in 24-well tissue culture plate), the floating cells were combined with the adherent cells that were detached from the substratum by 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO), and the cells were collected by centrifugation. To evaluate cell death or the generation of ROS, we stained the cells with 1 μg/mL propidium iodide (PI) or 4 μmol/L dihydroethidium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectively. *N*-acetylcysteine (Tokyo Chemical Industry, Japan) and 1,2-dihydroxy-3,5-benzenedisulfonic acid (Tiron; Dojindo) were added together with butyric acid. The percentage of cells with high fluorescence intensity due to oxidization of dihydroethidium was identified as the ROS-producing cells. The cells were analyzed by flow cytometry with a FACSCaliber (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA).

Statistical Analysis

Differences between mean values were assessed by a Student's *t* test. A p value < 0.05 or < 0.01 was considered statistically significant.

RESULTS

HMGB1 is Dislocated from the Nucleus in the Pocket Epithelium

Gingival tissues from chronic periodontal patients (Fig. 1, Appendix Fig. 2) and healthy volunteers (Appendix Fig. 3) were stained by an anti-HMGB1 antibody. In hematoxylin and eosin (H.E.) staining, all the samples showed infiltration of inflammatory cells in pocket epithelium, and the magnitude of the infiltration was consistent with the clinical periodontal condition. Regarding the localization of HMGB1, it was predominantly stained more in epithelial cells than in connective tissues, which is consistent with results from the previous study (Morimoto *et al*., 2008). Moreover, in the gingival epithelium, HMGB1 was mainly localized in the nucleus and was partly dislocated from the nucleus. In contrast, in the pocket epithelium, the localization of HMGB1 was exclusively cytoplasmic in all of these tissue samples.

Butyric Acid Induces HMGB1 Release in Ca9-22 Cells

Butyric acid is a metabolite of periodontopathic bacteria and a virulence factor common to *Porphyromonas gingivalis, Prevotella loescheii*, and *Fusobacterium nucleatum* (Kurita-Ochiai *et al*., 1995). The concentration of butyric acid was previously shown to reach 14-20 mmol/L in subgingival plaque at periodontal sites (Margolis *et al*., 1988). We examined the effect of butyric acid on the release of HMGB1, using a human gingival epithelial cell

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

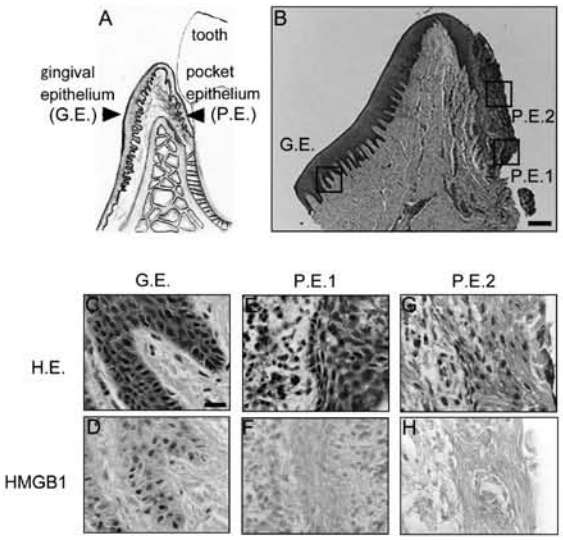


Figure 1. Immunohistochemical localization of HMGB1 in gingival tissue from a patient with chronic periodontitis. (**A**) Schematic presentation of periodontal tissues. (**B-H**) The section was stained with hematoxylin and eosin (H.E.) (B,C,E,G) or anti-HMGB1 antibody (HMGB1) (D,F,H). Areas corresponding to gingival epithelium (C,D) and pocket epithelium (E-H) were magnified. Scale bar: B, 200 μm; C-H, 20 μm.

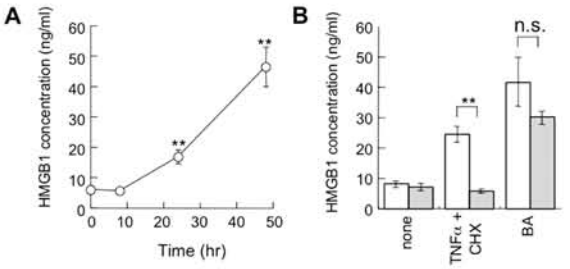


Figure 2. Butyric acid induces HMGB1 release in Ca9-22 cells. Ca9-22 cells (2 x 10^5 cells/mL, 0.4 mL/well in a 24-well tissue culture plate) were incubated with butyric acid at concentrations of 10 mmol/L for 0-48 hrs (**A**), or without (white) and with (gray) 5 μmol/L z-VAD for 48 hrs in the absence or presence of 10 ng/mL TNF-α with 10 μg/mL CHX or 10 mmol/L butyric acid (**B**). Conditioned media were passed through a GHP Acrodisc Syringe Filter with a 0.2 μm GHP Membrane (PALL, Ann Arbor, MI, USA). The amount of HMGB1 in the filtrates was measured with the use of an HMGB1 ELISA Kit (SHINO-TEST Corporation, Kanagawa, Japan). (A) Values are means ± SD (n = 4). The result is a representative of 4 independent experiments. (B) Values are means ± SD (n = 3). Essentially the same result was obtained in an independent experiment. Significant differences between z-VAD-treated and untreated conditions are indicated: ** $p < 0.01$.

line, Ca9-22. The release of HMGB1 was detected after 24 hrs in the presence of 10 mmol/L butyric acid (Fig. 2A).

Butyric Acid Induces Necrotic Cell Death in Ca9-22 Cells

The viability of Ca9-22 cells decreased in the presence of butyric acid (Figs. 3A, 3B). Cell death was observed after 24 hrs and was still evident after 48 hrs in the presence of 10 mmol/L butyric acid. A dose-response effect of butyric acid on cell death was coincident with that on HMGB1 release (Appendix Fig. 4).

The induction of cell death caused by a combination of TNF-α and CHX, which leads to apoptosis, was appreciably suppressed in the presence of a pan-caspase inhibitor, z-VAD (Fig. 3C). In contrast, butyric-acid-induced cell death was not significantly suppressed by z-VAD, although it was partly suppressed in the presence of 10 mmol/L butyric acid. Similarly, the release of HMGB1, induced by a combination of TNF-α and CHX, was almost undetectable in the presence of z-VAD, whereas the substantial release of HMGB1 by butyric acid was observed in the presence of z-VAD (Fig. 2B).

After the treatment with butyric acid, Ca9-22 cells were slightly swollen (Appendix Fig. 5). The morphological changes were further monitored by transmission electron microscopy. Most of the floating cells were enucleated (Appendix Fig. 6), whereas the released nuclei remained attached to the substratum and revealed the homogeneous staining in the nucleoplasm (Fig. 3F). In contrast, chromatin condensation and cell shrinkage were clearly observed when Ca9-22 cells were treated with TNF-α and CHX.

Butyric Acid Promotes the Generation of ROS in Ca9-22 Cells

The population of Ca9-22 cells producing ROS was increased by incubation with butyric acid (Fig. 4). The production of ROS was detected after 12 hrs. The addition of ROS scavengers failed to suppress the butyric-acid-dependent ROS production and cell death (Appendix Fig. 7).

DISCUSSION

Changes in the intracellular localization of HMGB1 have been observed in biopsy specimens from patients with rheumatoid arthritis (Kokkola *et al*., 2002) and systemic lupus erythematosus (Popovic *et al*., 2005). In gingival tissues from patients with chronic periodontitis, the occasional translocation of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm has been reported (Morimoto *et al*., 2008). In the present study, we demonstrated that HMGB1 is exclusively present in the cytoplasm of pocket epithelium cells close to the infiltrated inflammatory cells. It should be noted that the infiltration was observed in the pocket epithelium even without apparent periodontal diseases, which is possibly caused by indigenous bacterium in the pocket. In contrast, HMGB1 is preferentially present in the nucleus in the gingival epithelium. This clear contrast suggests the involvement of HMGB1 in the pocket-mediated processes.

One of the virulent factors generated in the periodontal pocket is butyric acid. It has been demonstrated that butyric acid

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

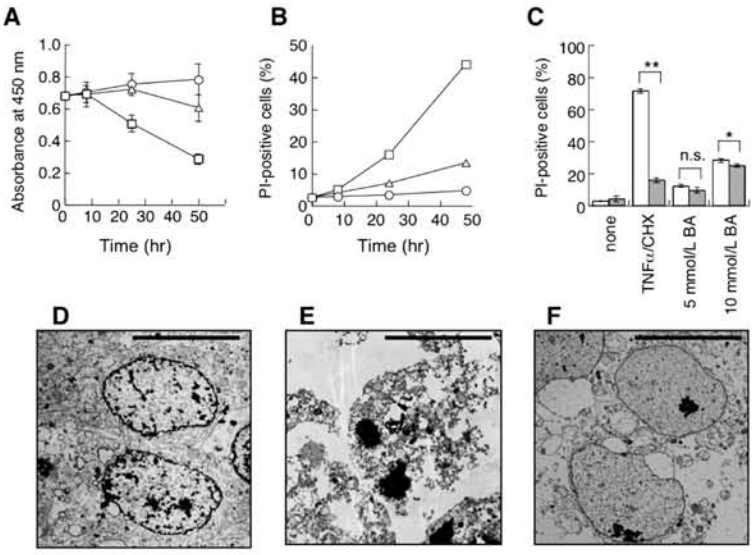


Figure 3. Butyric acid induces necrotic cell death in Ca9-22 cells. Ca9-22 cells were incubated with butyric acid at concentrations of 1.25 mmol/L (○), 5 mmol/L (Δ), and 10 mmol/L (□) for indicated times, and cell viability (**A**) and cell death (**B**) were evaluated. The result is a representative of 3 independent experiments. (**C**) Ca9-22 cells were incubated without (white) and with (gray) 5 μmol/L z-VAD for 48 hrs in the absence or presence of 10 ng/mL TNF-α with 10 μg/mL CHX or 10 mmol/L butyric acid, and cell death was evaluated. Values are means ± SD (n = 3). Significant differences between z-VAD-treated and untreated conditions are indicated: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. A similar result was obtained in an independent experiment. (**D-F**) Transmission electron micrographs. Ca9-22 cells (4 x 10^5 cells in 10-cm tissue culture dish) were cultured in the absence (**D**) or presence of 10 ng/mL TNF-α and 10 μg/mL CHX (**E**) or 10 mmol/L butyric acid (**F**) for 48 hrs. Cells were scraped from the substratum, collected by centrifugation, and then fixed in 2.5% glutaraldehyde in 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C. After the fixative was changed to 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4), the samples were post-fixed with 2% osmium tetroxide for 2 hrs and then dehydrated. The samples were finally embedded in Epon mixture. Ultra-thin sections (80 nm thick) were prepared with a HERZ ultramicrotome. The specimens were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined with a HITACHI H-7100 transmission electron microscope, at an accelerating voltage of 75 kV. Typical morphology of the nuclei is shown. The result is a representative of 3 independent experiments. The bar denotes 10 μm.

induces apoptosis in murine and human T- and B-cells (Kurita-Ochiai *et al*., 1997, 1998, 2001) and in fibroblasts isolated from inflamed periodontal lesions of human adults with periodontitis (Kurita-Ochiai *et al*., 2008). In the present study, we demonstrated that butyric acid induces the release of HMGB1 in a human gingival epithelial cell line (Ca9-22). Previous studies reported the release of HMGB1 from gingival epithelial cells by TNF-α (Morimoto *et al*., 2008) and from gingival fibroblasts by lipopolysaccharide (Feghali *et al*., 2009). In addition to these factors, butyric acid can be a causative factor for HMGB1 release in gingival tissues.

HMGB1 is either secreted from activated monocytes and macrophages through secretory lysosomes, or passively leaked from cells when the integrity of the plasma membrane is disrupted during necrosis (Bianchi and Manfredi, 2007). In contrast, in the case of apoptosis, HMGB1 is retained in the nucleus by association with condensed chromatin, and therefore the release of HMGB1 does not occur even when plasma membranes are compromised after secondary necrosis (Scaffidi *et al*., 2002). However, some contradictory results have been presented (Bell *et al*., 2006; Jiang *et al*., 2007), suggesting that the release of HMGB1 from apoptotic cells is context-dependent. In Ca9-22 cells, the release of HMGB1 and the induction of cell death were observed in parallel. The butyric-acid-dependent cell death was not fully suppressed by a pan-caspase inhibitor and did not cause chromatin condensation, a sign of apoptosis. In addition, cell swelling was observed. These results suggested that butyric acid induced the release of HMGB1 as a result of necrosis. Butyric-acid-induced necrosis has been reported in murine colonic epithelial cell MCE301 (Matsumoto *et al*., 2006).

Although the mechanism of butyric-acid-induced necrosis in Ca9-22 cells remains to be elucidated, electron microscopic observation revealed the presence of a bulging intracellular organelle, suggesting oxidative stress. Butyric acid is known as a histone deacetylase (HDAC) inhibitor (Davie, 2003) and is able to induce transcriptional changes (Pajak *et al*., 2007). The homogeneous staining of nucleoplasm is probably caused by the hyperacetylation of nuclear proteins. Thus, further studies are needed to elucidate butyric-acid-induced gene expression related to ROS production.

Several mechanisms are known to promote the relocation of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm, such as the acetylation (Bonaldi *et al*., 2003; Carneiro *et al*., 2009) and phosphorylation (Youn and Shin, 2006) of HMGB1, and the destabilized association of HMGB1 with chromatin (Ditsworth *et al*., 2007) or a nuclear import protein (Youn and Shin, 2006). HMGB1 is reportedly a substrate of histone acetylase, and HDAC inhibitors induce the relocation of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm (Bonaldi *et al*., 2003; Carneiro *et al*., 2009). The effect of the HDAC-inhibiting activity of butyric acid in the relocation of HMGB1 remains to be elucidated.

Immunohistochemical staining revealed that HMGB1 is exclusively localized in the cytoplasm in the inflamed pocket epithelium. Cytoplasmic HMGB1 is destined for release to the extracellular space, either actively or passively, when the cells receive an appropriate second signal. Butyric acid was shown to induce the release of HMGB1 as a result of necrosis in the gingival epithelial cell line Ca9-22. Thus, it is considered that the pocket epithelium, which is continuously challenged by

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

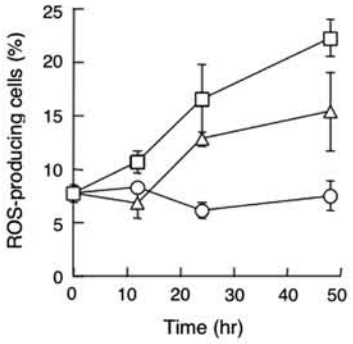


Figure 4. Butyric acid promotes the generation of ROS in Ca9-22 cells. Ca9-22 cells were incubated with butyric acid at concentrations of 1.25 mmol/L (○), 5 mmol/L (Δ), and 10 mmol/L (□) for the indicated times. Cells were stained with dihydroethidium and analyzed by flow cytometry. Values are means ± SD (n = 3). Essentially the same result was obtained in an independent experiment.

periodontopathic bacteria, is in a unique pathological setting for HMGB1 release. Since HMGB1 potentiates the action of lipopolysaccharide (Qin *et al*., 2009), HMGB1 could exaggerate the outcome of bacterial insult.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Shigeru Oda, Dr. Akira Aoki, Dr. Motohiro Komaki, Dr. Shinichi Arakawa, Dr. Hidehiro Shioyama, Dr. Sae Hayakumo, and Dr. Youichi Taniguchi for the preparation of gingival tissues and to Dr. Shizuko Ichinose for the electron microscopy at Tokyo Medical and Dental University. This work was supported by Grants-in-Aid for the Global Center of Excellence (GCOE) Program to Tokyo Medical and Dental University and for Scientific Research 22592060 (to M.Y.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

REFERENCES

Andersson U, Erlandsson-Harris H (2004). HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med* 255:344-350.

Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS (2006). The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1318-C1325.

Bianchi ME, Beltrame M (1998). Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 63:1573-1577.

Bianchi ME, Manfredi AA (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220:35-46.

Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* 21:6865-6873.

Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, *et al*. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22:5551-5560.

Carneiro VC, de Moraes Maciel R, de Abreu da Silva IC, da Costa RF, Paiva CN, Bozza MT, *et al*. (2009). The extracellular release of *Schistosoma mansoni* HMGB1 nuclear protein is mediated by acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1245-1249.

Davie JR (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133(7 Suppl):2485S-2493S.

Ditsworth D, Zong WX, Thompson CB (2007). Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem* 282:17845-17854; *erratum* in *J Biol Chem* 284:22500, 2009.

Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, *et al*. (2009). Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol* 24:292-298.

Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS (2007). The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. *J Immunol* 178:6495-6503.

Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, *et al*. (2002). High mobility group box chromosomal protein 1: a novel pro-inflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 46:2598-2603.

Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K (1995). Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Dent Res* 74:1367-1373.

Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K (1997). Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. *Infect Immun* 65:35-41.

Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K (1998). Volatile fatty acid, metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and RAJI B lymphoma cells and splenic B cells. *Infect Immun* 66:2587-2594.

Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K (2001). Butyric acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and -9 activation in a Fas-independent manner. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:325-332.

Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, *et al*. (2008). Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 87:51-55.

Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, *et al*. (2005). Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 97:e73-83.

Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC (1988). Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 67:1476-1482.

Matsumoto T, Hayasaki T, Nishimura Y, Nakamura M, Takeda T, Tabuchi Y, *et al*. (2006). Butyrate induces necrotic cell death in murine colonic epithelial cell MCE301. *Biol Pharm Bull* 29:2041-2045.

Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, *et al*. (2004). High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 173:307-313.

Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T, Hashiguchi T, *et al*. (2008). Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res* 43:76-83.

Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, *et al*. (2007). A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 26:1129-1139.

Page RC (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26(3 Pt 2):230-242.

Pajak B, Orzechowski A, Gajkowska B (2007). Molecular basis of sodium butyrate-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Adv Med Sci* 52:83-88.

Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, *et al*. (2004). Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 164:441-449.

Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, *et al*. (2005). Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52: 3639-3645.

Qin YH, Dai SM, Tang GS, Zhang J, Ren D, Wang ZW, *et al*. (2009). HMGB1 enhances the proinflammatory activity of lipopolysaccharide

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

by promoting the phosphorylation of MAPK p38 through receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 183:6244-6250.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418:191-195.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, *et al.* (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285:248-251.

Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ (2007). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 81:59-66.

Youn JH, Shin JS (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177:7889-7897.

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 13, 2011

MEMO

硬組織病態制御学

柳下 正樹

医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻
硬組織病態制御学・教授

1） 研究課題名と研究内容

歯周病学分野とのイノベーション研究

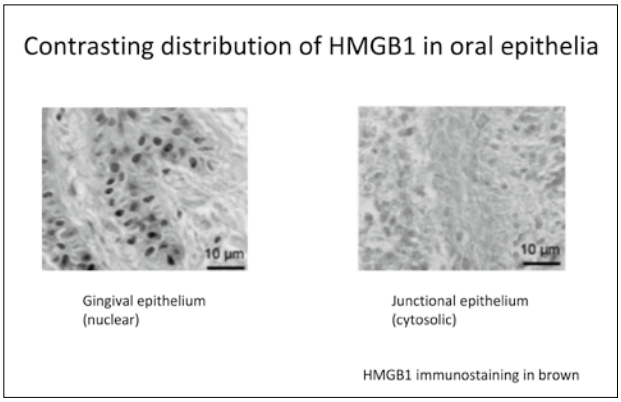
歯周組織炎症部位における酸化ストレスの組織学的・生化学的解析

”Histological and biochemical analyses of oxidation stress at the inflammation site of periodontal diseases”

歯周病は歯周病原菌の感染による歯周組織の炎症を特徴とする慢性炎症性疾患で、日本人における歯周病罹患率は非常に高く45歳以上では40%を越えている（厚生労働省の平成17年歯科疾患実態調査）。歯周病の進行とともに歯周ポケットは深さを増し、ポケット内に嫌気性菌を中心として歯周病原菌が増加する。これに反応して歯周炎局部には様々な免疫応答が惹起され結果的に歯周組織の破壊が生じ、最後には歯の喪失に至る。また歯周疾患の炎症部位に由来する細菌由来成分や炎症性サイトカインが血流を介して全身に作用し糖尿病、心臓血管病、低体重児出産・早産、呼吸疾患、骨粗しょう症などの疾患の誘発に関与すると考えられている。歯周病および歯周病と関連する全身疾患の治療や予防のためには原因となる炎症部位の特殊性、すなわち「嫌気性細菌が繁殖する場となる低酸素領域（歯周ポケット）に隣接していること」の意味を明らかにすることが不可欠である。

本研究では歯周ポケットに嫌気性菌が感染した際にみられる局所細胞の病態生理学的変化を細胞レベルで明らかにしようとするものである。本年までの我々の研究で、転写因子/late inflammatory mediatorであるHMGB（high-mobility group box）1タンパク質が嫌気性菌に直接暴露されるjunctional epitheliumと細菌侵襲の少ない口腔部位の上皮ではその細胞内分布が大きく異なることを発見した（添付パワーポイントファイル）。これはHMGB1が口腔内粘膜免疫に大きく関与している可能性を示唆した。また、歯周病原菌から放出される内毒素（LPS）、外毒素、短鎖脂肪酸などはin vitroの実験系において細胞内の活性酸素産生を引き起こす。LPSに対して組織から放出される炎症性サイトカインも組織自身に作用して活性酸素産生を促進する。また歯周ポケット内が低酸素状態であることにより隣接する歯周組織の活性酸素産生が亢進する可能性がある。そこで歯周疾患の炎症部位は歯周ポケットに存在する細菌の種類や繁殖状況および免疫系、循環系の状態などの複数の因子の寄与を反映した酸化ストレスの状況を呈すると考えられる。しかし現在までに歯周疾患の病態と炎症部位の酸化ストレス状態とを直接結びつける知見はほとんど報告されていない。本年度以降、歯周病の炎症部位の臨床サンプルの酸化ストレスの状態を組織学的、生化学的に解析し、細菌侵襲に対する口腔組織反応を解析する。

2)



3） 研究内容の英文要約

During the years of 2010, we initiated a new study developing a technique directly demonstrating oxydative status in periodontal tissue associated with bacterial periodontitis. This will clarify factors involved in initiation and continuation of immunological responses、especially those involving HMGB（high-mobility group box）1, toward bacterial infection in periondontium.

We also continued our study identifying the presence of a molecular complex on the cell surface involving heparan sulfate proteoglycans, and the role of heparan sulfate chains on the integrity of membrane raft structure. Biochemical properties of heparan sulfate proteoglycans point to the presence of intimate molecular interactions in specialized domains of cell surface and their importance in the cellular signaling mechanisms. Research results, using isolation procedures of plasma membrane and identification of several membrane proteins together with heparan sulfate proteoglycans, indicated that cholesterol-rich, cell surface microdomains constitute one of specialized functional units of the plasma membrane and are associated with a species of cell surface heparan sulfate proteoglycan, syndecan-4. Biological significance of heparan sulfate proteoglycans in specialized membrane domains will be further investigated.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

異なる分野のInnovationの確立する研究「歯周組織炎症部位における酸化ストレスの組織学的・生化学的解析」を提案。採択を受け研究計画を遂行。

B（研究教育環境）

活発な国際シンポジウム、セミナーなどの開催、GCOE総合講義担当

C（人材確保）

特任講師中村博幸博士との共同研究体制確立。

D（人材育成）

大学院生（AISS）への奨学金授与、大学院生セミナーの開催

E（国際化）

国際シンポジウム開催、国際セミナーへの参加、発表。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

特任講師との共同研究体制、大学院生への教育活動に参加することを心がけた。

6）英文原著論文

◎N. Ebe, M. Hara-Yokoyama, K. Iwasaki, S. Iseki, K. Terasawa, K. A. Podyma-Inoue, M. Yanagishita and Y. Izumi, Periodontal pockets as the pathological setting for HMGB1 release, J. Dental Res.（2011）in press、

Sachiko Takehara, Masaki Yanagishita,Katarzyna Anna Podyma-Inoue,Masayuki Ueno,Kayoko Shinada and Yoko Kawaguchi, Relationship between Oral Malodor and Glycosylated Salivary Proteins, J. Med. Dent. Sciences（2010）57:25-33

Vincent C. Hascall, Bryan P. Toole, Carol de la Motte, Masaki Yanagishita and Koji Kimata, HA 2010 overview, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 22:261-267（2010）

7）総説並びに著書

Masaki Yanagishita, Special Issue on Hyaluronan, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 22: 55-56（2010）

8）平成22年度までの自己評価

中村博幸特任講師との共同研究体制確立に努力した。その他の活動内容のうちで私の参加できる主な項目としては大学院生、GCOE教官に対する評価関連の活動および、大学院生に対するセミナーシリーズでの講義であった。これらの活動はGCOE事業全体からすると微力とは思いますが、可能な限り参加させていただきました。

9）学会発表（英文）

N. Ebe, M. Hara-Yokoyama, K. Iwasaki, S. Iseki, S. Okuhara, K. A. Podyma-Inoue, K. Terasawa, A. Watanabe, T. Akizuki, H. Watanabe, M. Yanagishita and Y. Izumi, Pocket Epithelium in the pathogical setting for HMGB1 release. IADR, July 14-17, 2010, Barcelona, Spain

Yamanokuchi, H., Torigoe, K., Ohnuki, Y., Yoshida, K. and Yanagishita, M., HA-tetrasaccharide stimulates differentiation and regeneration of neuron. International Symposium on Hyaluronan 2010, June 6, 2010, Kyoto, Japan

Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama and Masaki Yanagishita, Association of Heparan Sulfate Proteoglycans with Membrane Rafts. Gordon Research Conference on Proteoglycan, July 11-16, 2010, Andover, NH, U.S.A.

Miki Yokoyama, Kazue Terasawa, Shizuko Ichinose, Yoshio Hirabayashi, Yasuyuki Igarashi and Masaki Yanagishita, Increase in the plasma membrane permeability by intracellular generation of sphingosine-1-phosphate. 生化学会、2010年12月7-10日、神戸

S. Takehara, M. Yanagishita, K. A. Podyma-Inoue, M. Ueno, K. Shinada and Y. Kawaguchi, Proteolytic Degradation of Human Salivary MUC5B and MUC7, the 25th International Carbohydrate Symposium, August 2, 2010, Makuhari

10）学会発表（和文）

横山三紀、寺澤和恵、柳下正樹、「スフィンゴシンキナーゼ2に依存した細胞膜透過性の亢進」、スフィンゴテラピー研究会、2010年7月16-17日、米子

11）外部資金の獲得状況

（受託研究）
糖質科学研究所、「グリコサミノグリカンオリゴ糖の生理活性解析と医薬応用」、期間:平成17年 -平成22年、総額:840万円

12）主催学会

International Symposium on Hyaluronan 2010, June 6-11, 2010, Kyoto, Japan

13）GCOE総合講義

講義題名
“Posttranslational Modification by Glycosylation”

（要約）タンパク質の多くはその細胞内生合成過程において様々なを受けて初めて完成型となりその生物学的機能を発揮することが可能となる。翻訳後修飾の中でもとりわけ糖付加を含む反応は頻繁にみられその意義が詳しく解明されつつある。付加される糖鎖構造の大部分はN-結合型およびO-結合型の糖鎖に分類されそれぞれが大きく異なった生合成過程を経る。N-結合型糖鎖はその前駆体がRERで合成され、前駆体が一体となって翻訳中のタンパク質に転移される、その後さらにRER及びGolgi装置内で糖脱離、糖付加を受け完成型のN-結合型糖鎖となる。一方O-結合型はGolgi装置内で糖が一つずつ付加され完成される。最近の研究でN-結合型糖鎖はRER内でのタンパク質品質管理機構に関与することも知られるようになった。糖付加反応は酵素反応であり、これが糖の非鋳型的合成/構造的microheterogeneityの原因となっている。

14）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授：横山三紀
講　師：粂井康宏
助　教：井上-Podyma Katarzyna Anna
大学院生：Anupama Rajapakshe, 歯周病学分野より○江部典子

15）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など自由形式で記載

執行上の細かい決定に了承を求める必要はないと思います。

Release of HMGB1 from epithelial gingiva facing periodontal pocket

N. Ebe[1, 3], M. Hara-Yokoyama[2, 3], K. Iwasaki[1, 3, 4], S. Iseki[5], Kazue Terasawa[2], [3], K. A. Podyma-Inoue[2, 3], H. Watanabe[1, 2], M. Yanagishita[2, 3], and Y. Izumi[1, 3]

[1]Section of Periodontology and [2]Section of Biochemistry, Department of Hard Tissue Engineering, Biochemistry, Division of Bio-Matrix, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan, [3]Global Centre of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan, [5]Department of Molecular Craniofacial Embryology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8549, Japan,

Running title: Release of HMGB1 from periodontal pocket

ABSTRACT (126 words < 150 words)

High-mobility group box (HMGB1) protein is highly expressed in the nucleus, where they regulate chromatin structure and transcription, but it is also released to the extracellular fluids upon tissue injury or inflammation and triggers tissue repair and defense programs. Immunohistochemical staining of gingiva from patients with chronic periodontal disease revealed that HMGB1 is dislocated from the nucleus of inflamed epithelial gingival cells close to periodontal pocket. Butyric acid, an extracellular metabolite from periodontopathic bacteria populating in the periodontal pocket and also known as a histone deacetylase inhibitor, induced necrotic cells death and the release of HMGB1 in the human gingival epithelial cell line Ca9-22. The present results suggested that periodontal pocket represents an unique pathological setting to render the extracellular release of HMGB1 by bacterial insult.

INTRODUCTION

High mobility group box 1 (HMGB1) is one of the most abundant nuclear non-histone proteins (Bianchi and Beltrame, 1998). In the nucleus, HMGB1 acts as a DNA chaperone facilitating the rate-limiting DNA distortion during nucleosome sliding and regulates transcription (Bonaldi et al., 2002). On the other hand, HMGB1 acts as a cytokine when released in the extracellular milieu upon tissue injury or inflammation (Bianchi and Manfredi, 2007). Extracellular HMGB1 induces migration and/or proliferation of stem cells in muscle (Palumbo et al., 2004) and heart (Limana et al., 2005), and enhances an immune response via facilitating dendritic cell maturation (Messmer et al., 2004; Yang et al., 2007), accumulation of neutrophils (Orlova et al., 2007), or activation of monocyltes/macrophages (Scaffidi et al., 2002). Thus, HMGB1 is considered to be a danger signal (alarmin) that triggers repair and defense programs. However, HMGB1 could induce maladaptive or exaggerated autoimmune responses and becomes pathogenic when released chronically and/or in the absence of infection. In fact, HMGB1 has been identified as a late mediator of endotoxin lethality in mice (Wang et al., 1999). Studies of intra-articular HMGB1 injections in knee joints support for a pathogeneic role of HMGB1 for the development of arthritis (Bianchi and Manfredi, 2007). Since administration of antibodies to HMGB1 attenuates the endotoxin lethality (Wang et al., 1999), HMGB1 is currently highlighted as a new potential therapeutic target.

In LPS-stimulated monocytes and macrophages, HMGB1 is relocated to the cytoplasm, possibly via hyperacetylation (Bonaldi et al., 2003), subsequently accumulated in secretory lysosomes and then actively released (Gardella et al., 2002). In the case of tissue injury, it is considered that HMGB1, transiently existing in the cytoplasm during the course of nucleocytoplasmic shuttling, is passively released when the cells lose integrity of plasma membrane as a result of necrosis (Bianchi and Manfredi, 2007). The relocation of HMGB1 from the nucleus occurs during some types of necrosis, such as induced by DNA-alkylating agent (Ditsworth et al., 2007). On the other hand, HMGB1 is retained in the nucleus by condensed chromatin during apoptosis and therefore the release of HMGB1 does not occur even when plasma membranes are impaired after secondary necrosis (Scaffidi et al., 2002). However, some contradictory results have been demonstrated (Bell et al., 2006; Jiang et al., 2007), implying that the release of HMGB1 from apoptotic cells is context-dependent. Since extracellular

HMGB1 can be pathogenic, it is important to investigate the correlation between the mode of cell death and the release of HMGB1 in each case.

The oral cavity is continuously challenged by bacterial invasion. The host inflammatory response to the bacteria is involved in the onset of periodontal disease and further amplified after formation of periodontal pocket, where various virulent factors are produced. Recently, the release of HMGB1 into gingival crevicular fluid of periodontal patients has been reported (Morimoto et al., 2008). In the present study, we hypothesized that a periodontal pocket causes an unique pathological setting to induce the HMGB1 release. Thus, we observed the distribution of HMGB1 around periodontal pocket by immunohistochemistry and also examined the effect of butyric acid, a metabolite of periodontopathic bacteria and a virulence factor common to *Porphyromonas gingivalis, Prevotella loescheii*, and *Fusobacterium nucleatum* (Kurita-Ochiai et al., 1995), on the induction of cell death and the release of HMGB1 in human gingival epithelial cell line (Ca9-22 cells).

MATERIALS & METHODS

Reagents

Butytic acid was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Eagle's minimum essential medium and fetal bovine serum were from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). z-VAD-fmk was purchased from the Peptide Institue (Osaka, Japan). Dihydroethidium from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Preparation of gingival tissues

Both healthy (n = 2) and chronic periodontitis (n = 11; five men/six women; average age 12.9 years; probing depth 4-12 mm) tissues were obtained after informed consent was obtained according to guidelines approved by the Ethics Committee of Tokyo Medical and Dental University. The excised tissues were immediately fixed in 4% formalin and then embedded in paraffin.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections (5 μm in thickness) of gingival tissues were deparaffinized in xylene and rehydrated through a series of decreasing concentrations of ethanol. After

blocking, sections were incubated with affinity-purified rabbit anti-HMGB1 antibody (SHINO-TEST Corporation, Kanagawa, Japan) or irrelevant polyclonal rabbit IgG overnight at 4□ and with biotinylated secondary antibody, and with avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC Elite Kit; Vector Laboratories). The staining was visualized by treatment for 10 min in a 0.05% solution of 3-diaminobenzidine and 0.01% H_2O_2 in PBS. Sections were counterstained with hematoxylin and eosin.

Cell culture

A human gingival epithelial cell line (Ca9-22) was obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB, Osaka, Japan) and maintained in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (50U/ml), and streptomycin (50 μg/ml). Cell viability was evaluated based on the reduction of tetrazolium salt by the respiratory chain enzymes in mitochondria. Absorbance at 450 nm wave length due to the reaction of water-soluble terazolium salt (WST-8) was measured using a Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan). Cell death was evaluated based on the permeability of plasma membrane to propidium iodide (PI). Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry using a FACSCaliber (BD Bioscience, Moutain View, CA).

Stable Transfectant

cDNA encoding the full length human HMGB1 (ORIGENE) was subcloned into pCEpuro vector tagged with a triple FLAG epitope at the N-terminus. Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and puromycin-resistant cells were obtained.

Transmission Electron Microscopy

Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4□. After exchanging the fixative for 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), the samples were treated with 2% osmium tetroxide for 2 hr and then dehydrated. The samples were finally embedded in Epon. Semi- and ultra-thin sections were made using LKB ultramicrotome. The specimens were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined under a HITACHI H-700 transmission electron microscope, at an accelerating voltage of 75 kV.

HMGB1 release

Cells were cultured for 48 hr and conditioned media were passed through GHP Acrodisc Syringe Filter with 0.2 μm GHP Membrane (PALL, Ann Arbor, MI). The amount of HMGB1 in supernatants was measured using HMGB1 ELISA Kit (SHINO-TEST Corporation, Kanagawa, Japan). Various reagents were added at the beginning or after 24 or 36 hr for the 48 hr-, 24 hr-, and 12 hr-treatment, respectively.

The oxidation state of released HMGB1 was assessed based on the electrophoretic mobility, which is increased in the presence of the Cys23-Cys45 disulfide bond (oxidized state) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoeresis under non-reducing conditions (Hoppe et al., 2006). It was necessary to concentrate the culture medium to detect released HMGB1 by immunoblotting using currently available anti-HMGB1 antibody. Thus, to minimize an oxidation of HMGB1 during such preparation step, a stable transfectant expressing HMGB1 with a triple FLAG tag at the N-terminus was used. After incubation, conditioned media were immediately subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoeresis in non-reducing conditions and the proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were probed with anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), followed by goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody and visualized by chemiluminescence (ECL, Amersham International, Buckinghamshire, England). It should be noted that the oxidized HMGB1 (fast-migrating form) was appreciably less effectively reacted with anti-FLAG antibody than the reduced HMGB1 (slow-migrating form), probably because an access of the antibody to the N-terminal tag is restricted in the presence of the Cys23-Cys45 disulfide bond.

Statistical analysis

Differences between mean values were assessed by a Student't t test. A p value of <0.05 or <0.01 was considered statistically significant.

RESULTS

HMGB1 Is Dislocated from the Nucleus in the Epithelial Gingiva Facing

Periodontal Pocket

In consistent with the previous study, HMGB1 was abundant in the epithelial gingiva more than in the subepithelial connective tissue as shown in Fig. 1B (Morimoto et al., 2008). The staining of HMGB1 in the outer epithelium facing the oral cavity was more intense than that in the sulcular epithelium facing periodontal pocket (Fig.1). In the outer epithelium, HMGB1 was located both cytoplasmically and intranuclearly in the basal layer (Fig. 1D) and cytoplasmically in the prickle cell layer (Fig. 1C). By contrast, in the sulcular epithelium, where infiltration of leukocytes (neutrophils and eosinophils) was observed, HMGB1 was mostly dislocated from the nucleus (Figs. 1E & 1F).

Butyric Acid Induces Necrosis in Ca9-22 Cells

Using human gingival epithelial cell line (Ca9-22) in culture, we investigated the effect of butyric acid on the release of HMGB1. The concentration of butyric acid is previously shown to reach 14-20 mM in subgingival plaque at a site of periodontitis (Margolis et al., 1988).

The viability of Ca9-22 cells was decreased after 24 hr in the presence of 10 mM butyric acid (Fig. 2A). After 48 hr, the decrease was also observed at 5 mM butyric acid. In parallel, butyric acid induced cell death assessed by an increase in the permeability to propidium iodide (Fig. 2B). Butyric acid at concentrations lower than 1.3 mM did not have such effects (data not shown).

Induction of cell death caused by a combination of TNF-α and cycloheximide (CHX), which leads to apoptosis, was appreciably suppressed in the presence of a pan-caspase inhibitor, z-VAD (Fig. 2C). By contrast, the butyric acid-induced cell death was mostly unaffected by z-VAD, although partly suppressed at 10 mM butyric acid. On the other hand, the butyric acid-induced cell death was appreciably suppressed in the presence of CHX (Fig. 2D).

During incubation with butyric acid, Ca9-22 cells were detached from a substratum and rounded as previously reported (Takigawa et al., 2008). Chromatin condensation was clearly observed when Ca9-22 cells were stimulated with TNF-α and CHX (Figs. 3B & 3E) but not with butyric acid (Figs. 3C & 3F). Nucleoplasm was uniformly stained after incubation with butyric acid. In addition, traces of vacuolization within the cytoplasm or close to the nuclei were frequently observed (Figs. 3C and 3F).

Butyric Acid Promotes Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) in Ca9-22 Cells

The population of Ca9-22 cells producing ROS was increased by incubation with butyric acid at 10 mM for 48 hr (Fig. 4B). The production of ROS was apparent after 12 hr and also at 5 mM butyric acid after 24 hr (Fig. 3C). Butyric acid at a concentration as low as 1.3 mM did not promote the production of ROS (Fig. 3C).

Butyric Acid Induces Release of HMGB1 in Ca9-22 Cells

Incubation of Ca9-22 cells with 10 mM butyric acid induced the release of HMGB1 (Fig. 4A). A substantial release of HMGB1 by butyric acid was observed even in the presence of z-VAD, whereas the release of HMGB1 induced by a combination of TNF-α and CHX was almost undetectable.

When the Ca9-22 cells stably expressing FLAG-tagged HMGB1 were stimulated with butyric acid, the oxidized HMGB1 appeared in the culture medium after 24 hr (Fig. 4C).

DISCUSSION

Proliferation of bacteria within the periodontal pocket is closely involved in exacerbation of periodontal disease. Immunohistochemical staining of gingiva from patients with chronic periodontal disease revealed that the dislocation of HMGB1 from the nucleus in the sulcular epithelium facing periodontal pocket is more evident than in the outer epithelium in the basal layer (Fig.1). In the prickle cell layer, although HMGB1 was dislocated from the nucleus in both cases, the amount of HMGB1 was considerably lower in the sulcular epithelium, suggesting the extracellular release of HMGB1 into the periodontal pocket.

Previous studies reported the release of HMGB1 from gingival epithelial cells (Morimoto et al., 2008) and gingival fibroblasts (Feghali et al., 2009) by tumor necrosis factor-α and lipopolysaccharide, respectively. These observations explain the dislocation of HMGB1 when leukocytes are migrating or an epithelial barrier is disrupted to allow an access of endotoxin. In addition to such factors, we demonstrated

that butyric acid, an extracellular metabolite from periodontopathic bacteria, induces the release of HMGB1 from gingival epithelial cells.

Butyric acid induces apoptosis in murine and human T- and B- cells (Kurita-Ochiai et al., 1997; Kurita-Ochiai et al., 1998; 2001) and fibroblasts isolated from inflamed periodontal lesions of adult persons with periodontitis (Kurita-Ochiai et al., 2008). In Ca9-22 cells, the butyric acid-dependent cell death was not fully suppressed by a pan-caspase inhibitor (Fig. 2C) and did not exclusively cause condensation of chromatin, a sign of apoptosis (Fig. 3). Thus, it is considered that butyric acid mainly induces necrosis in Ca9-22 cells. However, at present, the involvement of apoptosis cannot be ruled out, because the addition of z-VAD partly inhibited the butyric acid-dependent cell death. Since the butyric acid-induced cell death was suppressed by CHX (Fig. 2D), synthesis of proteins due to increased gene expression by HDAC inhibitor activity of butyric acid may be involved in necrosis.

The butyric acid-induced necrosis was also reported in murine colonic epithelial cell MCE301 (Matsumoto et al., 2006). When the caspase-dependent pathway is blocked in mouse embryonic fibroblasts with knockout of Apaf-1 or Bcl-XL-overexpressing HeLa cells, HDAC inhibitors (butyric acid and suberoylanilide hydroxamic acid) induce necrosis with morphological features of autophagic cell death (Shao et al., 2004). A specific inhibition of class I HDAC induces autophagy in HeLa cells (Oh et al., 2008). Marked vacuolization within the cytoplasm of Ca9-22 cells after incubation with butyric acid implied necrosis via autophagic cell death. Since most, if not all, radiation- and chemotherapy-resistant cancers have apoptotic defects, the ability of butyric acid to induce necrosis may have clinical implications in treating cancer in oral tissues.

In contrast to the butyric acid-induced upregulation of antioxidant system in vascular smooth muscle cell proliferation, the butyric acid-dependent production of ROS has been reported in T cells (Kurita-Ochiai et al., 2003) and in Ca9-22 cells (Fig. 4B). The production of ROS was evident after incubation of Ca9-22 cells for12 hr with butyric acid at 10 mM, which coincided with the release of oxidized HMGB1 (Fig. 4B). Thus, HMGB1 can be a target of an oxidative stress induced by butyric acid. Since it was not able to suppress the butyric acid-dependent ROS production by preincubation with ROS scavengers (N-acetylcysteine as well as Tiron, data not shown), further study is required to elucidate an involvement of ROS production in the induction of necrosis.

The effect of butyric acid, alone or in combination with other factors such as TNF-α or LPS, on the oxidation of Cys106 within the HMG-box B also should be studied. Although the oxidation of Cys106 does not occur in mild oxidative conditions (Hoppe et al., 2006), it abolishes the ability of HMGB1 to activate dendritic cells (Kazama et al., 2008).

A bacterial fermentation product of dietary fiber is the principle source of butyric acid in the body and butyric acid has the antiatherogenic potential (Ranganna et al., 2007). In the oral cavity, periodontopathic bacteria produce butyric acid within a periodontal pocket. Butyric acid acts as an HDAC inhibitor (Davie, 2003) and the acetylation of HMGB1 by histone acetylase has been reported (Bonaldi et al., 2003; Carneiro et al., 2009). Thus, we reasoned that butyric acid causes the displacement of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm by maintaining the acetylation state of HMGB1 or chromatin. Subsequently, disruption of membrane integrity, caused either by necrosis or secondary necrosis, facilitates the passive release of HMGB1 to the extracellular space. Since recent report suggested HMGB1-RAGE signaling in osteoclastogenesis, butyric acid might be involved in the bone resorption and subsequent tooth loss by promoting the release of HMGB1.

Figure legends

Figure 1. Dislocation of HMGB1 from the nucleus in inflamed gingival epithelium
A. Schematic presentation of gingiva and periodontal pocket. Outer epithelium (O. E.) and sulcular epithelium (S. E.) are indicated. B-E. The sections were stained with anti-HMGB1 antibody (upper), control IgG (middle), hematoxylin and eosin (H.E., lower). Magnifications: x 5 (A), x400 (C, E), x 1000 (D, F). The epithelial gingiva facing oral cavity (C, D) and periodontal pocket (E, F) were shown.

Figure 2. Butyric acid-induced cell death in Ca9-22 cells
(A, B) Ca9-22 cells were incubated with butyric acid at concentrations of 1.25 mM (○), 5 mM (△), 10 mM (□) for indicated time and cell viability (A) and cell death (B) were evaluated. C. Ca9-22 cells were incubated without (white) and with (gray) 5 μM z-VAD for 48 hr in the absence or presence of 10 ng/ml TNF-α with 10 μg/ml CHX or 10 mM butyric acid and cell death was evaluated. D. Ca9-22 cells were incubated without (white) and with (gray) 10 μg/ml CHX for 48 hr in the absence or presence of 10 mM butyric acid and cell death was evaluated. Values are means ± s.d. (n = 3). Significant differences with respect to the value without z-VAD are indicated: ** = $P<0.01$; * = $P<0.05$.

Figure 3. Morphology of butyric acid-induced cell death in Ca9-22 cells
Ca9-22 cells were incubated without (A, D) or with 10 ng/ml TNF-α with 10 μg/ml CHX (B, E) or 10 mM butyric acid (C, F) for 48 hr and then fixed and embedded in Epon. Semi-thin sections (200 nm thick) were stained by Toluidine Blue and observed by light microscopy (A-C). Ultra-thin sections (80 nm thick) were observed by transmission electron microscopy (D-F). The bar denotes 10 μm. A similar result was obtained in another independent experiment.

Figure 4. Butyric acid-induced release of HMGB1
Ca9-22 cells were incubated without (white) and with (gray) 5 mM z-VAD for 48 hr in the absence or presence of 10 ng/ml TNF-α with 10 μg/ml CHX or 10 mM butyric acid. The amount of HMGB1 in the conditioned medium was measured as described in "METHODS". B. Ca9-22 cells were incubated with butyric acid at concentrations of

1.25 mM (○), 5 mM (△), 10 mM (□) for indicated time. Cells were stained with dihydroethidium and analyzed by flow cytometry. C. Ca9-22 cells were incubated with 10 mM butyric acid for indicated time and the conditioned medium was subjected to SDS-PAGE (11% acrylamide concentration) in non-reducing conditions. Band intensities of HMGB1 in the slow- and fast-migrating forms (white and gray, respectively) are shown. Densitometric analysis of the band intensity was carried out using ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Values are means ± s.d. (n = 3-4). Significant differences are indicated: ** = $P<0.01$; * = $P<0.05$.

REFERENCES

Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS (2006). The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(6):C1318-25.

Bianchi ME, Beltrame M (1998). Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 63(6):1573-7.

Bianchi ME, Manfredi AA (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220:35-46.

Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* 21(24):6865-73.

Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22(20):5551-60.

Carneiro VC, de Moraes Maciel R, de Abreu da Silva IC, da Costa RF, Paiva CN, Bozza MT, et al. (2009). The extracellular release of Schistosoma mansoni HMGB1 nuclear protein is mediated by acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* 390(4):1245-9.

Davie JR (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133(7 Suppl):2485S-2493S.

Ditsworth D, Zong WX, Thompson CB (2007). Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem* 282(24):17845-54.

Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, et al. (2009). Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol* 24(4):292-8.

Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3(10):995-1001.

Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE (2006). Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res* 312(18):3526-38.

Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS (2007). The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. *J Immunol* 178(10):6495-503.

Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA (2008). Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 29(1):21-32.

Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K (1995). Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Dent Res* 74(7):1367-73.

Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K (1997). Butyric acid-induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. *Infect Immun* 65(1):35-41.

Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K (1998). Volatile fatty acid,

metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and RAJI B lymphoma cells and splenic B cells. *Infect Immun* 66(6):2587-94.

Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Fukushima K (2001). Butyric acid-induced T-cell apoptosis is mediated by caspase-8 and -9 activation in a Fas-independent manner. *Clin Diagn Lab Immunol* 8(2):325-32.

Kurita-Ochiai T, Amano S, Fukushima K, Ochiai K (2003). Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis. *J Immunol* 171(7):3576-84.

Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, et al. (2008). Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 87(1):51-5.

Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, et al. (2005). Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 97(8):e73-83.

Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC (1988). Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 67(12):1476-82.

Matsumoto T, Hayasaki T, Nishimura Y, Nakamura M, Takeda T, Tabuchi Y, et al. (2006). Butyrate induces necrotic cell death in murine colonic epithelial cell MCE301. *Biol Pharm Bull* 29(10):2041-5.

Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. (2004). High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 173(1):307-13.

Morimoto Y, Kawahara KI, Tancharoen S, Kikuchi K, Matsuyama T,

Hashiguchi T, et al. (2008). Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res* 43(1):76-83.

Oh M, Choi IK, Kwon HJ (2008). Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* 369(4):1179-83.

Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, et al. (2007). A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 26(4):1129-39.

Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. (2004). Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 164(3):441-9.

Ranganna K, Mathew OP, Yatsu FM, Yousefipour Z, Hayes BE, Milton SG (2007). Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J* 274(22):5962-78.

Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418(6894):191-5.

Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52):18030-5.

Takigawa S, Sugano N, Nishihara R, Koshi R, Murai M, Yoshinuma N, et al. (2008). The effect of butyric acid on adhesion molecule expression by human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 43(4):386-90.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*

285(5425):248-51.

Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ (2007). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 81(1):59-66.

口腔病理学分野

山口　朗

医歯学総合研究科・口腔機能再構築学系専攻
口腔病理学・教授

1）研究課題名と研究内容

1. 骨芽細胞分化および骨再生過程における細胞・分子間相互作用

Cellular and molecular interactions in osteoblast differentiation and bone regeneration

本研究では、骨芽細胞分化および骨再生過程における細胞・分子間の相互作用を解析し、骨再生の統合的理解を深め、優れた骨再生療法を確立するための分子基盤を構築することを目的とする。今年度は以下の研究を行った。

1）骨再生におけるCCN3の役割:我々はCCN3がBMP, Notchの分子間相互作用により骨芽細胞分化を抑制することを報告した。そのため、今年度は骨芽細胞特異的にCCN3を過剰発現するトランスジェニックマウスおよびCCN3ノックアウトマウスにおける骨再生過程を解析し、CCNノックアウトマウスでは骨形成が促進する傾向を示す結果を得た。

2）骨芽細胞分化におけるAcerogenin Aの役割:Acerogenin A（ACE）はメグスリノキから抽出された天然化合物で、我々は、初代骨芽細胞様細胞、MC3T3-E1細胞、Runx2欠損細胞株（RD-C6）を用いて、ACEがRunx2依存的および非依存的にBMPの作用を活性化することにより、骨芽細胞分化を促進することを明らかにし、ACEの骨再生療法への応用の可能性をて提示した（Biochem Bioph Res Commun in press）。

3）イヌ口腔粘膜を利用した骨再生療法の開発:現在までに、骨髄間葉系幹細胞、筋肉、骨膜細胞などが骨再生の細胞移植療法に用いられているが、これらの細胞は歯科医師にとって簡便に採取できる細胞ソースではない。そのため、本研究ではイヌ口腔粘膜線維芽細胞が骨再生の細胞移植量療法に利用できるか、検討した。成犬の口腔粘膜より採取した線維芽細胞にGFPを導入し、BMP-2とともにヌードマウスに移植した所、GFPとALPの両者が陽性の細胞が異所性骨形成部に観察された。そのため、口腔粘膜線維芽細胞はBMPの作用により、in vivoでも骨芽細胞に分化でき、歯科領域の骨精製療法の開発に有用な細胞源と考えられた（論文投稿中）。

2. 口腔癌による顎骨破壊の分子メカニズム

Molecular mechanism of bone destruction by oral cancer

口腔癌はその解剖学的構造に依存して、容易に顎骨に直接浸潤するという特徴をもち、顎骨浸潤はその予後を規定する重要な要因の一つである。そのため、歯肉癌の顎骨浸潤の予防あるいは顎骨浸潤の進展を阻止することができれば、今後の歯肉癌治療に大きく貢献できる。この目的を達成するために、我々は口腔癌による顎骨破壊の分子メカニズムの解析を行なっている。

1）口腔癌顎骨浸潤におけるIL-6, PTHrPの役割:口腔癌による顎骨浸潤に関与する因子としてIL-6およびPTHrPに着目し、癌細胞および間質細胞との相互作用により引き起こされる破骨細胞形成におけるこれらの因子の役割を明らかにすることを目的として種々の培養細胞を用いた実験を行なった。その結果、口腔癌の顎骨浸潤部では、癌細胞自身がIL-6及びPTHrPを産生するとともに、癌細胞が間質細胞を刺激してIL-6合成を促進させ、これらのIL-6及びPTHrPが間質細胞のRANKL発現を上昇させ、破骨細胞形成を促進していることを明らかにした（Amer J Pathol 176,968-980,2010）。

2）口腔癌による顎骨浸潤制御法の開発:上記研究で口腔癌:骨の境界に存在する線維芽細胞様細胞が産生するRANKLが口腔癌による骨破壊で重要な役割を担っていることが明らかになったので、本研究ではラット抗マウスRANKL特異的中和抗体を担癌（口腔癌細胞）ヌードマウスに投与して、骨吸収抑制作用を検討し

た。その結果、RANKL抗体投与により、口腔癌による骨破壊が顕著に抑制されることが明らかとなった。その効果は骨吸収抑制剤であるビスフォスフォネート（Zometa）投与と同様であった。ヒト口腔癌ではRANKLを発現する症例があるので、現在、RANKLを発現する口腔癌細胞株をヌードマウス頭頂部に移植し、ラット抗ヒトRANKL特異的中和抗体を投与する実験を検討中である。この実験により、癌細胞が産生するRANKLと間質細胞が産生するRANKLの役割を明確に区別化することが可能である。

3）口腔癌が産生する骨吸収促進因子の同定:我々は口腔癌細胞HSC3をヌードマウスの頭頂部に移植すると著明な骨吸収を惹起することを明らかにした。そのため、HSC3細胞より約20の単一細胞に由来するクローンを採取し、それぞれの培養上清を用いて、ST2細胞のRANKL発現誘導能を検討した。その結果、RANKL発現誘導能の顕著なクローンをRANKL発現誘導の弱いクローンを得た。これらのクローンをヌードマウスに移植すると、RANKL発現誘導能の顕著なクローンの方が著明な骨吸収を示すことが明らかとなった。そのため、これらのクローン間でmicroarray解析を行い、口腔癌細胞が産生する骨吸収促進因子を網羅的に解析する準備を進めている。

3. 光メージングと分子生物学の融合によるオステオネットワークの解明を目指したフロンティア研究拠点（イノベーション研究）

New frontier of osteonetwork research by combinational approaches of optical imaging and molecular biology

1）蛍光in situ　3次元イメージングによる骨芽細胞特異的転写因子の細胞内極在変化の解析

骨芽細胞特異的転写因子Runx2、Osterixは骨芽細胞の分化に必須の転写因子である。これらの転写因子は様々な翻訳語修飾を受けることで活性が調節され、細胞内での局在も調節されていることが報告されている。しかし、これらはいずれも培養細胞を用いたin vitroの観察結果であり、in vivoの骨組織で、実際にこのような翻訳後修飾が行われているのかは明らかにされていない。一方で、これまでの細胞内での分子局在の解析は、in vitroの培養細胞など単層の細胞集団を用いた解析が主流であり、骨組織のような多層の細胞集団では、自家蛍光による解像度の低下やシグナルのかぶりなど、さまざまな技術的困難が生じていた。そこで、本研究グループでは、Runx2、Osterixに対する蛍光免疫染色を骨組織で行い、高解像度の3次元蛍光イメージングと画像解析により、これらの転写因子の局在を細胞内（subcellular）レベルで解析する方法を確立し、上記の問題点をクリアすることに成功した。その結果、Runx2、Osterixの細胞内局在は骨組織において時間的・空間的に制御されていることを観察している。今後は、これらの調節が、骨形成や代謝さらには病態とどう関連し、調節されているのかを調べる予定である。

2）蛍光in situ　3次元イメージングによる骨細胞機能の定量的解析

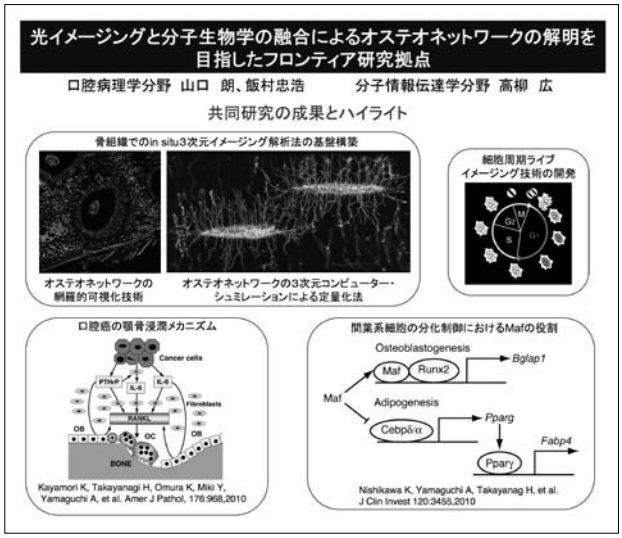
骨細胞は、骨組織に最も多数存在する細胞であり、物理的刺激を化学的刺激に変換し、さらには生物学的なアウトプットに変換して、骨の代謝に関わる調節を担うメカノセンサーと考えられている。また、血中リン酸濃度を調節するホルモン（FGF23）を発現する主な細胞として、内分泌細胞としての機能も有している。骨細胞は、骨基質中に存在し周囲の骨細胞や、骨芽細胞、破骨細胞とも細胞突起を介してネットワークを形成している。すなわち、このような骨細胞ネットワークは多細胞複合体として細胞間コミュニケーションを通じて機能している。したがって、骨細胞の機能解析をする際には、培養細胞のようなin vitroの解析ではその本来の機能を失う可能性がある。また、骨組織をすり潰して、タンパク質や核酸を抽出する生化学・分子生物学的手法では個々の骨細胞での機能変化を捉えることは不十分である。そこで、本研究グループでは、高解像度の3次元蛍光イメージングと画像解析により、骨組織上での遺伝子発現やタンパク質発現量およぶ局在の変化を捉える方法を確立した。この方法により、骨細胞は機能的に単一の集団ではなく、骨組織内で時間的・空間的に機能が調節されたヘテロな細胞集団であることが明らかになりつつある。今後は、これらの骨細胞機能の調節が、骨形成や代謝さらには病態とどう関連し、調節されているのかを調べる予定である。

4. 骨の代謝と疾患におけるケモカイン受容体シグナルの役割に関する研究

ケモカインは細胞遊走活性をもつ低分子量（8-14kDa程度）のタンパク質である。すなわち、おもに炎症部位に発現し、リンパ球などの免疫応答細胞の遊走を促し細胞機能をも活性化する、低分子のサイトカインである。これらのいくつかは、骨吸収性の関節炎やがん細胞の骨転移部位で発現が上昇することが報告されており、骨代謝への機能が注目されていた。そこで、本研究グループは、国際医療センター研究所と東京大学大学院医学系研

究科松島研究室との共同研究で、ケモカイン受容体ノックアウトマウス（KO）の骨の表現型の解析をすすめてきた。まず、ケモカイン受容体のひとつであるCCR1欠損マウスは骨減少症の表現型を示し、さらに骨芽細胞の機能分化と破骨細胞の分化が阻害されていることを明らかにし、JBC誌に報告した。現在さらに他のケモカイン受容体KOマウスの解析を進めており、複数のケモカインと受容体が相互調節しあうことで骨の代謝を調節していることを明らかにしつつある。今後は、その全体像をつかむべく解析を進めていく。

2)



3）研究内容についての英文要約

1. Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi T, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. Amer J Pathol 176,968- 980, 2010

We investigated the roles of IL-6 and parathyroid hormone-related peptide（PTHrP）in oral squamous cell carcinoma（OSCC）-induced osteoclast formation. Microarray analyses performed on 43 human OSCC specimens revealed that many of specimens overexpressed PTHrP mRNA, but a few overexpressed IL-6 mRNA. Immunohistochemical analysis revealed that IL-6 was expressed not only in cancer cells but also in fibroblasts and osteoclasts at tumor-bone interface. Many of the IL-6-positive cells coexpressed vimentin. Conditioned media（CM）derived from the culture of oral cancer cell lines（BHY, Ca9-22, HSC3, HO1-u-1）stimulated Rankl expression in stromal cells and osteoclast formation. CM derived from all of the OSCC cell lines effectively induced IL-6 expression in stromal cells, and the induction was partially blocked by anti-PTHrP antibody. Xenografts of HSC3 cells onto the periosteal region of the parietal bone in athymic mice presented similar histology and expression profiles of RANKL and IL-6 as observed in bone-invasive human OSCC specimens. These results indicate that OSCC provides a suitable microenvironment for osteoclast formation not only by producing IL-6 and PTHrP but also by stimulating stromal cells to synthesize IL-6.

2. Etoh M, Yamaguchi A: Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone. J Bone Miner Metab 28:641-649,2010

We investigated the effects of this regimen by comparing the findings of intermittent and continuous PTH treatments in rats. Infusions of PTH for 24 h followed by 6-day withdrawal periods from PTH transiently increased the serum calcium levels on day 1, but these levels were within the normocalcemic range. The repetition of 4 cycles of continuous PTH infusions followed by PTH withdrawals as well as intermittent PTH treatment increased the trabecular bone thickness, osteoblast surface, and bone formation rate. Continuous PTH infusions followed by PTH withdrawals also increased the cortical thickness of the femoral diaphysis and the osteoid volume in trabecular bones, whereas the continuous treatment failed to induce these changes. These findings suggest that continuous PTH treatment followed by PTH withdrawal is a potential regimen that can induce the anabolic effects of PTH in bone metabolism without inducing hypercalcemia.

3. Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K: Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts.　J Biol Chem 285:28826-28837,2010

We investigated the roles of CCR1 in bone metabolism using CCR1-deficient mice. $Ccr1^{-/-}$ mice have fewer and thinner trabecular bones and low mineral bone density in cancellous bones. The lack of CCR1 affects the differentiation and function of osteoblasts. Runx2, atf4, osteopontin, and osteonectin were significantly upregulated in $Ccr1^{-/-}$ mice despite sustained expression of osterix and reduced expression of osteocalcin, suggesting less potency to differentiate mature osteoblasts. In addition, mineralized nodule formation was remarkably disrupted in cultured osteoblastic cells

isolated from Ccr1$^{-/-}$ mice. Osteoclastogenesis induced from cultured Ccr1$^{-/-}$ bone marrow cells also decreased in number and size due to the abrogated cell-fusion. Ccr1$^{-/-}$ osteoclasts exerted no osteolytic activity concomitant with reduced expressions of RANK and its downstream targets, implying that the defective osteoclastogenesis is involved in bone phenotype in Ccr1$^{-/-}$ mice. The co-culture of wild-type osteoclast precursors with Ccr1$^{-/-}$ osteoblasts failed to facilitate osteoclastogenesis. This result is most likely due to a reduction of the RANKL expression. These observations suggest that the axis of CCR1 and its ligands are likely to be involved in crosstalk between osteoclasts and osteoblasts through modulating RANK-RANKL-mediated interaction.

4. Aragaki T, Michi Y, Katsube K, Uzawa N, Okada N, Akashi T, Amagasa T, Yamaguchi A, Sakamoto K: Comprehensive keratin profiling reveals distinctions between keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst. Human Pathol 42:1718- 1725, 2010

Keratocystic odontogenic tumor is a cystic lesion that behaves more aggressively than other jawcysts. One of its characteristic histologic features is a parakeratinized uniform layer of lining epithelium. A jaw cyst lined with orthokeratinized epithelium is called an orthokeratinized odontogenic cyst. These keratinized jaw cysts are thought to be separate entities, although their histopathogenesis has not been fully assessed. To better understand these lesions, we performed comprehensive Immunohistochemical profiling of the keratin expression of each. Orthokeratinized odontogenic cysts expressed keratin 1, keratin 2, keratin 10, and loricrin, suggesting differentiation toward normal epidermis. Keratocystic odontogenic tumors expressed keratin 4, keratin 13, keratin 17, and keratin 19, which is a unique expression pattern reminiscent of a mucosal squamous epithelium and an epithelial appendage. GLI2, a downstream effector of hedgehog signaling, was significantly expressed in keratocystic odontogenic tumor and basal cell carcinoma, accompanied with robust expression of keratin 17, mammalian target of rapamycin, and BCL2. These findings provide evidence to support the viewpoint that keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst are separate entities, and furthermore suggest their characteristic histology, pathogenesis, and biological behaviors.

5. Nishikawa K, Isogai M, Nakashima T, Takeda S, Michito, Hamada M, Kimura A, Kodama T, Yamaguchi A, Owen MJ, Takahashi S, Takayanagi H: Maf mediates the age-related switch in mesenchymal cell. J Clin Invest 120:3455-3465,2010

Aging leads to the disruption of the homeostatic balance of multiple biological systems. In bone marrow multipotent　mesenchymal cells undergo differentiation into various anchorage-dependent cell types, including　osteoblasts and adipocytes. With age as well as with treatment of antidiabetic drugs such as thiazolidinediones,mesenchymal cells favor differentiation into adipocytes, resulting in an increased number of adipocytes　and a decreased number of osteoblasts, causing osteoporosis. The mechanism behind this differentiation　switch is unknown. Here we show an age-related decrease in the expression of Maf in mouse mesenchymal　cells, which regulated mesenchymal cell bifurcation into osteoblasts and adipocytes by cooperating with the　osteogenic transcription factor Runx2 and inhibiting the expression of the adipogenic transcription factor　Pparg. The crucial role of Maf in both osteogenesis and adipogenesis was underscored by in vivo observations　of delayed bone formation in perinatal Maf$^{-/-}$ mice and an accelerated formation of fatty marrow associated　with bone loss in aged Maf $^{+/-}$ mice. This study identifies a transcriptional mechanism for an age-related　switch in cell fate determination and may provide a molecular basis for novel therapeutic strategies againstage-related bone diseases.

6. Sakamoto K, Aragaki T, Kawachi H, Katsube K, Miki Y, Takizawa T, Omura K, Morita K, Okada N, Yamaguchi A: Concurrent downregulation of keratin 4 and keratin 13 expression defines the neoplastic lesion of oral epithelium and serves as an ideal marker for oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. Histopathol（in press）

To understand the comprehensive alteration of keratin subtype expression and to identify the subtypes relevant to pathological diagnosis, we performed exhaustive keratin profiling in oral squamous cell carcinoma（OSCC）and oral epithelial dysplasia（OED）. Microarray analysis and immunohistochemical examination revealed downregulation of keratin 4（K4）and K13 in OSCC and OED, accompanied with upregulation of K1, K2, K5, K6, K10, K14, K16 and K17. We focused on K4 and K13, that are dominant keratin subtypes in oral mucosa, because their downregulation were more consistent and definite than other keratin subtypes. Immunohistochemical examination on total 100 cases of OSCC and OED revealed consistent downregulation of K4 or/and K13 in OSCC and OED. The downregulation of K4 and K13 usually concurred, and was observed even in mild OED, but not in normal or hyperplastic epithelia, making K4 and K13 ideal biomarkers for oral neoplastic lesions. Considering the tight correlation between the alteration

of keratin expression and generation of abnormal shape, we assume that alteration of keratin expression may be one of the major elements that generate morphological atypia.

7. Kihara K, Ichikawa S, Yonezawa T, Lee JW, Akihisa T, Woo JT, Michi Y, Amagasa T,Yamaguchi A: Acerogenin A, a natural compound isolated from Acer nikoense Maxim,stimulates osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein action. Biochem Bioph Res Commun（in press）

We investigated the effects of acerogenin A, a natural compound isolated from Acer nikoense Maxim, on osteoblast differentiation by using osteoblastic cells. Acerogenin A stimulated the cell proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells and RD-C6 osteoblastic cells（Runx2-deficient cell line）. It also increased alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 and RD-C6 cells and calvarial osteoblastic cells isolated from the calvariae of newborn mice. Acerogenin A also increased the expression of mRNAs related to osteoblast differentiation, including Osteocalcin, Osterix and Runx2 in MC3T3-E1 cells and primary osteoblasts: it also stimulated Osteocalcin and Osterix mRNA expression in RD-C6 cells. The acerogenin A treatment for 3 days increased Bmp-2, Bmp-4, and Bmp-7 mRNA expression levels in MC3T3-E1 cells. Adding noggin, a BMP specific-antagonist, inhibited the acerogenin A-induced increase in the Osteocalcin, Osterix and Runx2 mRNA expression levels. These results indicated that acerogenin A stimulates osteoblast differentiation through BMP action, which is mediated by Runx2-dependent and Runx2-independent pathways.

4）世界的研究拠点の形成に向けて

A（研究拠点形成）

我々が従来行なってきた骨生物学的研究を基盤として、骨再生、癌による骨浸潤などの骨疾患の病態、治療法に関連する研究計画を立案し、「歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点」に相応しい研究を推進することとした。

B（研究教育環境）

In vivo imagingの研究を効率的に推進するために、既存の共焦点顕微鏡をグレードアップし、研究の促進を図った。

C（人材確保）

臨床系分野からの大学院生を受入、本研究を推進している。

D（人材育成）

大学院生の研究レベルを向上させるために、各大学院生には分野内で特定の指導教官を配置し、man-to-manの指導体制をとっている。

E（国際化）

国際学会での発表を目指すよう指導し、国内における外国人の講演への積極的に参加させている。

5）　GCOEを推進するにあたって力を入れた点

現在までに我々が行なってきた骨細胞生物学の研究を基盤として、インージングの手法も取り入れて骨疾患の病態解析、治療法の開発へ向けた研究を推進するようにしている。

6）英文原著論文

1. ◎Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi T, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. Amer J Pathol 176,968-980,2010
2. ◎Etoh M, Yamaguchi A: Repetition of continuous PTH treatments followed by periodic withdrawals exerts anabolic effects on rat bone. J Bone Miner Metab 28:641-649,2010
3. ◎Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Yasuhara M, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K: Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. J Biol Chem 285:28826-28837,2010
4. ◎Aragaki T, Michi Y, Katsube K, Uzawa N, Okada N, Akashi T, Amagasa T, Yamaguchi A, Sakamoto K: Comprehensive keratin profiling reveals distinctions between keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst. Human Pathol 42:1718-1725,2010
5. ◎Nishikawa K, Isogai M, Nakashima T, Takeda S, Michito, Hamada M, Kimura A, Kodama T, Yamaguchi A, Owen MJ, Takahashi S, Takayanagi H: Maf mediates the age-related switch in mesenchymal cell. J Clin Invest 120:3455-3465,2010
6. Sakamoto K, Aragaki T, Kawachi H, Katsube K, Miki Y, Takizawa T, Omura K, Morita K, Okada N, Yamaguchi A: Concurrent downregulation of keratin 4 and keratin 13 expression defines the neoplastic lesion of oral epithelium and serves as an ideal marker for oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. Histopathol（in press）
7. ◎Kihara K, Ichikawa S, Yonezawa T, Lee JW, Akihisa T,

Woo JT, Michi Y, Amagasa T,Yamaguchi A: Acerogenin A, a natural compound isolated from Acer nikoense Maxim,stimulates osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein action. Biochem Bioph Res Commun（in press）

7）総説ならびに著書

1. Iimura T, Himeno A, Nakane A, Yamaguchi A: Hox genes, a molecular constraint for development and evolution of vertebrate body plan. J Oral Biosci 52:155-163,2010
2. 飯村忠浩、中根綾子、姫野彰子、杉山真由、山口朗:骨の形態的解析法の進歩;骨のIn vivo 蛍光イメージングの現状と展望．骨形態計測学会雑誌（印刷中）
3. Iimura T, Sugiyama M, Watanabe T, Nakane A, Makino Y,Yamaguchi A. Lighting up skeletal biology by fluorescent imaging. Journal of Oral Biosciences（in press）
4. Iimura T, Sugiyama M, Makino Y, Nakane A, Watanabe T, Yamaguchi A: Illumination of vertebrate development by fluorescence live imaging. Cytometry Research（in press）
5. 佐藤　潔、栢森高、小村　健、山口 朗:IL-6の骨代謝に対する作用、骨粗鬆症治療（印刷中）

8）平成22年度までの自己評価

我々は長年、骨形成の分子メカニズムの研究を中心として骨生物学の基礎研究を推進してきた。本GCOEプログラムでは、現在までの基礎研究を継続するとともに、骨再生、癌の骨破壊、顎骨の疾患などの研究を推進し、「骨の分子疾患科学」に相応しい研究を推進した。特に、骨再生過程で発現が上昇する遺伝子の機能解析、癌により顎骨浸潤のメカニズム、顎関節に発症する滑膜軟骨軟骨腫症の病態解析に関しては論文発表を行なったので、本研究は概ね順調に推進することができたと考えている。しかし、遺伝子改変マウスの作成に時間がかかり、これらを用いた骨再生に関するin vivoの実験が予定よりやや遅れた点は反省すべき点として挙げられる。

2009年1月より、本GCOEシャペロン教官として飯村忠浩准教授を採用し、骨・歯におけるin vivo imaging研究を開始し、今までの研究にimagingの手法を加えて研究を推進しており、研究成果を挙げつつある。

9）学会発表（英文）

1. Inoue H, Nakashima T, Iwamatsu A, suematsu A, Yamaguchi A, Takayanagi H: Novel screening system for bone matrix proteins that control bone mineralization. 30th American Society for Bone Mineral Research 29th Annual Meeting. Montreal, Canada, September 13,2008
2. Kadouchi I, Sakamoto K, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi A:Latexin is a novel effector of BMP-2 signaling in modulation of chondrocyte differentiation. 30th American Society for Bone Mineral Research 29th Annual Meeting. Montreal, Canada, September 13,2008

10）学会発表（和文）

1. 仲根綾子、姫野彰子、沼野利佳、高木裕三、山口朗、飯村忠浩:骨成長における概日リズムの可視可、第30回日本骨形態計測学会、米子2010年5月14日（ゴールドリボン賞、日本骨形態計測学会奨励賞）
2. 姫野彰子、仲根綾子、和泉雄一、山口朗、飯村忠浩:蛍光イメージングによる骨細胞の形態・機能分化の計測、第30回日本骨形態計測学会、米子2010年5月14日（ゴールドリボン賞）
3. 星野昭芳、飯村忠浩、山本健二、山口 朗:骨代謝におけるケモカイン受容体（CCR1）の機能解析、第28回日本骨代謝学会学術集会、東京（京王プラザホテル）、平成22年7月21日

11）外部資金の獲得状況

1. 科学研究費補助金基盤研究（A）
   研究課題:オステオネットワークの維持と破綻:顎顔面骨疾患の病態解明を目指した基盤研究
   研究代表者:山口　朗
   期間:平成22年―平成24年3月
   研究費総額:3700万円
2. 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）
   研究課題:骨再生過程におけるOsteocrine Factorの同定
   研究代表者:山口　朗
   期間:平成21-22年
   研究費総額:300万円
3. 厚生労働省科学研究費金（再生医実用化事業）
   研究課題:実験的再生歯の臨床応用に関する研究
   研究代表者:山口　朗
   期間:平成21-23年
   研究費総額:1800万円（平成21-22年）
4. 受託研究

研究課題:滑膜性軟骨腫症発症モデル作成とモデルに対する薬剤効果の検討
研究代表者:山口　朗
期間:平成22年3月—6月
研究費総額:195万円

12）特別講演、招待講演、シンポジウム

1. 山口 朗:ビスフォスフォネート関連顎骨壊死の病理、東京都臨床整形外科医会統合研修会（招待講演)、東京カンファレンスセンター品川、2010年5月15日
2. 山口 朗:ビスフォスフォネート関連顎骨壊死（骨髄炎）の病理、市民公開シンポジウム「ビスフォスフォネート系製剤に起因した顎骨骨髄炎・顎骨壊死の現状と対策」、日本学術会議主催、第64回日本口腔科学会学術集会共催、札幌、2010年6月25日
3. 山口　朗:骨形成と血管石灰化の共通点と相違点、シンポジウム「Bone and Vascular Calcification」、第28回日本骨代謝学会学術集会、東京（京王プラザホテル)、平成22年7月21日
4. 山口 朗:オステオネットワークの維持と破綻:顎顔面骨疾患の病態解明を目指して、教育講演、第58回NPO法人日本口腔科学会中国・四国地方部会、広島、2010年11月6日
5. 山口 朗:骨代謝の基礎と骨再生、特別講演、平成22年度日本小児歯科学会秋期大会、郡山市民文化センター、2010年12月2日
6. 山口 朗:骨再生のメカニズムと骨再生療法、招待講演、DENTISTRY, QUO VADIS? 、東京（野口英世記念会館)、2010年12月5日

13）主催学会

第8回日本歯科骨粗鬆症研究会、東京医科歯科大学、平成22年4月4日

14）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

特任准教授　飯村（GCOEシャペロン教官）
講　　師　勝部憲一
助　　教　坂本　啓
特任助教　玉村　禎宏
指導を受けた大学院生
曹　雷
新垣理宣（顎顔面外科学）
○ 木原　翼（顎顔面外科学）（4年）
梅原康佑（部分床義歯学）（4年）
○ 松本　力（顎顔面矯正学）（3年）
○ Samir Kumar Pal（3年）
○ 大上えりか（顎顔面外科学）(3年)
渡辺　高（顎顔面外科学）（3年）
佐藤　潔（顎口腔外科）（3年）
Rumana Khanom（2年）
松下祐樹（顎顔面外科学）（2年）
島田（顎口腔外科）（2年）
Xhao Xin（1年）
芝　多佳彦（歯周病学）（1年）
指導を受けた大学院特別研究学生
牧野祐司
（順天堂大学医学部整形外科）（3年）

The American Journal of Pathology, Vol. 176, No. 2, February 2010
Copyright © American Society for Investigative Pathology
DOI: 10.2353/ajpath.2010.090299

Tumorigenesis and Neoplastic Progression

Roles of Interleukin-6 and Parathyroid Hormone-Related Peptide in Osteoclast Formation Associated with Oral Cancers

Significance of Interleukin-6 Synthesized by Stromal Cells in Response to Cancer Cells

Kou Kayamori,*† Kei Sakamoto,* Tomoki Nakashima,‡ Hiroshi Takayanagi,†‡ Kei-ichi Morita,§ Ken Omura,†§ Su Tien Nguyen,¶ Yoshio Miki,†¶‖ Tadahiro Iimura,*† Akiko Himeno,*†** Takumi Akashi,†† Hisafumi Yamada-Okabe,‡‡ Etsuro Ogata,§§¶¶ and Akira Yamaguchi*†

From the Sections of Oral Pathology, Cell Signaling,‡ Oral and Maxillofacial Surgery,§ and Periodontology,** Graduate School of Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, the Global Center of Excellence Program,† International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, and the Departments of Molecular Genetics,¶ Medical Research Institute, and Pathology,†† Tokyo Medical and Dental University Medical Hospital, Tokyo, the Department of Genetic Diagnosis,‖ Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Pharmaceutical Research Department III,‡‡ Kamakura Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, Kanagawa; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.,§§ Tokyo, and Cancer Institute Hospital,¶¶ Tokyo, Japan*

We investigated the roles of interleukin-6 (IL-6) and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) in oral squamous cell carcinoma (OSCC)-induced osteoclast formation. Microarray analyses performed on 43 human OSCC specimens revealed that many of the specimens overexpressed *PTHrP* mRNA, but a few overexpressed *IL-6* mRNA. Immunohistochemical analysis revealed that IL-6 was expressed not only in cancer cells but also in fibroblasts and osteoclasts at the tumor-bone interface. Many of the IL-6-positive cells coexpressed vimentin. Conditioned medium (CM) derived from the culture of oral cancer cell lines (BHY, Ca9-22, HSC3, and HO1-u-1) stimulated *Rankl* expression in stromal cells and osteoclast formation. Antibodies against both human PTHrP and mouse IL-6 receptor suppressed *Rankl* in ST2 cells and osteoclast formation induced by CM from BHY and Ca9-22, although the inhibitory effects of IL6 antibody were greater than those of PTHrP antibody. CM derived from all of the OSCC cell lines effectively induced IL-6 expression in stromal cells, and the induction was partially blocked by anti-PTHrP antibody. Xenografts of HSC3 cells onto the periosteal region of the parietal bone in athymic mice presented histology and expression profiles of RANKL and IL-6 similar to those observed in bone-invasive human OSCC specimens. These results indicate that OSCC provides a suitable microenvironment for osteoclast formation not only by producing IL-6 and PTHrP but also by stimulating stromal cells to synthesize IL-6. *(Am J Pathol 2010, 176:968–980; DOI: 10.2353/ajpath.2010.090299)*

Bone invasion by various malignant tumors causes diverse complications in patients. In the case of oral cancers, such invasion leads to physical damage of the bone and has a critical influence on patient prognosis. Several research groups have histopathologically investigated the process of bone destruction by oral squamous cell

Supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (14104015 to A.Y.) and by a grant from the Japanese Ministry of Education, Global Center of Excellence Program, "International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases."

Accepted for publication October 15, 2009.

Supplemental material for this article can be found on *http://ajp.amjpathol.org*.

Address reprint requests to Akira Yamaguchi, D.D.S., Ph.D., Section of Oral Pathology, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan. E-mail: akira.mpa@tmd.ac.jp.

carcinoma (OSCC),[1–4] the dominant cancer occurring in the oral cavity. Although these studies indicated that the bone destruction is mediated by osteoclasts rather than directly by cancer cells, the precise mechanism that regulates bone destruction due to OSCC has not been elucidated.

Osteoclastogenesis is regulated by a complex signaling system that involves three essential molecules of the tumor necrosis factor family, namely the receptor activator of nuclear factor-κB (RANK), the RANK ligand (RANKL), and osteoprotegerin.[5,6] RANKL is expressed in osteoblasts and bone marrow stromal cells.[7] It critically regulates the differentiation and function of osteoclasts by binding to its receptor RANK,[8,9] which is expressed in osteoclast lineage cells. Furthermore, osteoblasts and stromal cells synthesize osteoprotegerin,[10] which is a decoy receptor for RANKL. Thus, a balance between the expression levels of RANKL and osteoprotegerin is crucial for regulating osteoclast differentiation and function.

To explore the factors that contribute to cancer-associated bone resorption, several research groups have investigated the expression of bone-resorbing factors such as interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α, and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) in human OSCC.[11–14] Among these, IL-6 is an important cytokine that stimulates osteoclastic bone resorption by inducing RANKL expression in osteoblastic cells.[15] More importantly, several reports have revealed that the serum levels of IL-6 are elevated in patients with head and neck squamous cell carcinoma (SCC).[16–18] Duffy et al[18] reported that elevated serum IL-6 levels could serve as a valuable biomarker for predicting tumor recurrence and survival among patients with head and neck SCC. Although the increased serum IL-6 is considered to be synthesized by OSCC, this has not been well elucidated. PTHrP, which was originally identified as a factor responsible for humoral hypercalcemia of malignancy,[19] is synthesized by many malignant tumors such as those in breast, lung, colon, and prostate gland.[20–23] PTHrP expression in OSCCs also has been investigated.[24–27] Because PTHrP stimulates osteoclast activity by inducing RANKL in osteoblastic cells,[28] it might play a key role in cancer-associated bone resorption. Although previous reports have suggested the importance of IL-6 and PTHrP in OSCC-induced bone resorption, few studies have investigated extensively the roles in osteoclast formation associated with OSCC.

Cancer stroma comprises various types of cells including fibroblasts, myofibroblasts, endothelial cells, and inflammatory cells. These cells and their products play crucial roles in establishing the tumor microenvironment, which regulates the proliferation, survival, invasion, and metastasis of the cancer cells.[29,30] We investigated histopathologically 97 cases of OSCCs with bone invasion and demonstrated the significant role of fibrous stroma in bone invasion.[31] In all of the cases, we found that the fibrous stroma intervened between the invading cancer nests and the resorbing bone surface, and fibroblastic cells expressing RANKL were observed at the bone resorbing region close to the cancer nests, suggesting that OSCCs synthesize factor(s) that induce RANKL expression in the fibrous stroma adjacent to the bone surface, leading to osteoclastic bone resorption.

In the present study, we examined the expression profiles of IL-6 and PTHrP in human OSCCs extensively and investigated the roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation using various cancer cell lines. Herein we demonstrate that OSCC provides a suitable microenvironment for bone resorption not only by releasing PTHrP and IL-6 but also by stimulating stromal cells to synthesize IL-6.

Materials and Methods

Antibodies Used

Rat anti-mouse IL-6 receptor neutralizing monoclonal antibody (MR16-1)[32] and mouse anti-human PTHrP neutralizing monoclonal antibody[33] were provided by Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Mouse anti-human IL-6, rat anti-mouse IL-6 neutralizing monoclonal antibodies, and rat and mouse IgG_1 used as controls were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Mouse anti-human RANKL monoclonal antibody (Calbiochem, Darmstadt, Germany), goat anti-human, mouse, and rat RANKL polyclonal antibody (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), mouse anti-human IL-6 monoclonal antibody (Novocastra, Newcastle, UK), goat anti-mouse and rat IL-6 polyclonal antibody (sc-1265; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit anti-human vimentin monoclonal antibody (Epitomics, Burlingame, CA), and rabbit anti-human CD14 and CD20 monoclonal antibodies (Epitomics) were used for immunohistochemical analyses.

Laser Capture Microdissection and Microarray Analysis

Primary oral cancer specimens were obtained from 43 anonymous patients who had been treated at the Dental Hospital of Tokyo Medical and Dental University. All cancers were histopathologically diagnosed as OSCC. None of the patients had received chemo- or radiotherapy before the specimens had been obtained. Informed consent was obtained from all of patients, and all of the experimental procedures were approved by the university ethics committee. Cancer cells were isolated from all of the hematoxylin-stained sections by laser capture microdissection as described previously.[34] From 9 patients, oral epithelial tissue adjacent to the tumor was also isolated by laser capture microdissection to compare the expression levels in this tissue with those in cancer cells. Microarray analyses were conducted on the samples using the Human Genome U24133 Plus 2.0 array purchased from Affymetrix as described previously.[34] Of the 43 cases of OSCCs in this study, 30 had been analyzed by microarrays in our previous report.[34] The expression level of mRNA was determined by fluorescence intensity, which was the absolute value of fluorescence intensity in each case.

Histochemical and Immunohistochemical Staining

After fixation in 10% neutral buffered formalin, small blocks approximately 1.5 × 1.0 × 0.5 cm containing the interface of tumor and bone were dissected from 13 of the surgical cases. These specimens were decalcified in 10% EDTA at 4°C for 4 weeks and embedded in paraffin. For immunohistochemical staining, the sections were pretreated with microwave irradiation in 0.01 mol/L citric acid for 1 hour at 80°C for RANKL antibody or PBS containing 0.1 mg/ml trypsin (BD, Franklin Lakes, NJ) for 30 minutes at 37°C for IL-6 antibody. After quenching of endogenous peroxidase activity by incubation in 0.3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes, the sections were incubated overnight at 4°C with mouse anti-human RANKL monoclonal antibody (1:50) or mouse anti-human IL-6 antibody (1:50). After washing with PBS, the sections were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (EnVision + Dual Link System Peroxidase Kit, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) for 1 hour. Diaminobenzidine was used as a chromogen. The RANKL- and IL-6-positive fibroblastic cells present between the invading tumor nests and the bone resorption surface were counted using Scion Imaging Software.

For immunofluorescent antibody staining, the specimens were dual-stained with a mouse anti-human IL-6 antibody (1:50) and goat anti-human vimentin antibody (1:200), anti-human CD14 antibody (1:500), or CD20 antibody (1:100) as a primary antibody. Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used as secondary antibodies and sections were incubated overnight at 4°C. After immunofluorescent antibody staining, specimens were scanned by a confocal laser microscope (Pascal LSM5, Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) with excitation wave lengths of 488 and 543 nm. Acquired fluorescent images and differential interference contrast images were processed using LSM Image browser (Carl Zeiss GmbH).

For immunohistochemical staining in the xenograft experiments, we used goat anti-human, mouse, and rat RANKL polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), goat anti-mouse and rat IL-6 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and mouse anti-human IL-6 monoclonal antibody (Novocastra) as primary antibodies. As secondary antibodies, an Imm PRESS REAGENT KIT with anti-goat Ig (MP-7405, Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used to detect immunoreaction with goat antibodies and a Histofine Mouse Stain Kit (414322, Nichirei Corporation, Tokyo, Japan) was applied to detect immunoreaction with mouse antibody.

Cell Culture

We used four human OSCC cell lines (BHY, Ca9-22 [Ca9], HSC3, and HO1-u-1 [HO1]). BHY and Ca9 are derived from human gingival SCC, HSC3 from SCC of tongue, and HO1 from SCC of the floor of the mouth. In addition, we used four cancer cell lines derived from nonoral regions (EBC1, MKN28, A549, and MCF7). EBC1 is derived from lung SCC, MKN28 from gastric adenocarcinoma, A549 from lung adenocarcinoma, and MCF7 from breast adenocarcinoma. All cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 units/ml penicillin G, and 50 mg/ml streptomycin. The stromal cell line ST2, derived from mouse bone marrow, was maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FBS. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FBS, 2 ng/ml basic fibroblast growth factor, and antibiotics.[35] BHY was provided by Dr. Masato Okamoto (TELLA Inc., Tokyo, Japan), and Ca9-22 and HSC3 were purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources. HO1-u-1 and MCF7 were provided by the Cell Resource Center for Biomedical Research (Tohuku University, Miyagi, Japan). EBC1, MKN28, A549, ST2, and human mesenchymal stem cells were purchased from RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan).

Preparation of Conditioned Medium from Cancer Cell Lines

All of the cancer cells were grown to confluence in 100-mm dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FBS. After washing with PBS three times, they were cultured for an additional 48 hours in 4 ml of serum-free α-modified minimum essential medium. The collected culture supernatants were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes and filtered using a 0.22-μm filter unit. The media thus obtained were stored at −80°C and used as conditioned medium (CM). For all experiments, the CM was diluted with α-modified minimum essential medium in a 1:1 ratio (50%).

RT-PCR Analyses

Total RNA extracted from the cultured cells was reverse-transcribed into cDNA using a First-Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The cDNA products were amplified by RT-PCR using gene-specific primers as shown in Table 1. The amplified products of human *PTHrP*, human *IL-6*, human *OPG*, and human *ACTB* were electrophoresed on 2% agarose gel and visualized under UV light illumination after staining ethidium bromide staining. The mRNA expression levels of human *RANKL*, mouse *Rankl*, mouse *Opg*, human *IL-6*, and mouse *Il-6* were quantified by real-time RT-PCR using a Light-Cycler System (Roche Diagnostics) and a Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen) with the specific primers as shown in Table 1. The relative expression level of each mRNA was normalized to the 18S rRNA expression level.

Osteoclast Formation

The osteoclast formation activity in the CM was assessed using an *in vitro* osteoclast formation assay.[36] We inocu-

Table 1. Primers Sequences Used for RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
Human *PTHrP*	5′-GCTGTGTCTGAACATCAGCT-3′	3′-TTTGTACGTCTCCACCTTG-5′
Human *RANKL*	5′-CCAGCATCAAAATCCCAAGT-3′	3′-CCCCAAAGTATGTTGCATCCTG-5′
Human *IL-6*	5′-AAATTCGGTACATCCTCGAC-3′	3′-CAGGAACTGGATCAGGACTT-5′
Human *ACTB*	5′-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3′	3′-TCAAGTTGGGGGACAAAAAG-5′
Mouse *Pthrp*	5′-CGGTTTGGGTCAGACGATG-3′	3′-TTCCCGGTGTCTTGAGTG-5′
Mouse *Rankl*	5′-ATGATGGAAGGCTCATGGT-3′	3′-CCAAGAGGACAGAGTGACTTT-5′
Mouse *Opg*	5′-CTGCCTGGGAAGAAGATCAG-3′	3′-TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC-5′
Mouse *Il-6*	5′-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3′	3′-AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA-5′
Mouse *Tnf-α*	5′-GGCATGGATCTCAAAGACAACC-3′	3′-CAGGTATATGGGCTCATACCAG-5′
18SrRNA	5′-GTAACCCGTTGAACCCCATT-3′	3′-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-5′

lated ST2 cells onto a 24-well plate (5×10^4 cells/well) and cultured them in α-modified minimum essential medium containing 10% FBS, 1×10^{-8} mol/L 1,25-dehydroxyvitamin D_3 (Sigma-Aldrich), and 1×10^{-7} mol/L dexamethasone (Sigma-Aldrich) for 24 hours. Then, mouse bone marrow cells (5×10^5 cells/well) isolated from the femora and tibiae of 6-week-old C57BL/6 mice were cocultured with ST2 cells in 0.5 ml of α-modified minimum essential medium containing 10% FBS, $1 \times 10^{[8}$ mol/L 1,25-dehydroxyvitamin D_3, and 1×10^{-7} mol/L dexamethasone in the presence or absence of CM derived from each cancer cell line. The culture medium was replaced every other day. After coculturing for 6 days, the cells were fixed in 10% buffered formalin and stained with tartrate-resistant acid phosphatase for osteoclast identification by incubation with 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 5.0) containing AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich) and red violet LB salt (Sigma-Aldrich) in the presence of 50 mmol/L sodium tartrate (Sigma-Aldrich). Tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that contained more than three nuclei were identified as osteoclasts and were counted.

Xenograft Experiments of HSC3 Cells into Athymic Mice

HSC3 cells (5×10^5 cells/injection) were injected onto the periosteal region of the parietal bones in athymic mice using a 1-ml syringe after the periosteum was scratched once with the syringe needle. Three weeks after the transplantation, the calvarial region was dissected and fixed with 4% paraformaldehyde. Soft X-ray photographs were taken after fixation. The tissues were embedded in paraffin after decalcification with 10% EDTA at 4°C for 10 days. The sections were used for histological observation including immunohistochemical analysis for RANKL, human IL-6, and mouse IL-6. The experimental procedures were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committees at Tokyo Medical and Dental University.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test and Pearson's correlation coefficient. $P < 0.05$ was considered significant. The data are the mean ± SEM of independent replicates.

Results

Expression of IL-6 and PTHrP mRNA in Primary Human OSCC

The clinical and pathological data for the 43 cases of primary OSCC used for microarray analysis are summarized in Table 2. As shown in Figure 1A, mRNA expression of *IL-6* varied among the cancers and the oral epithelium adjacent to the cancers. Although only two SCC specimens expressed *IL-6* mRNA at extremely high levels, the average fluorescence intensity in the cancer cells was 199.82 ± 427.67 and that in the adjacent oral epithelium was 302.92 ± 367.88 without a significant difference between these two groups (Figure 1A). In contrast, most of the cancer tissue specimens overexpressed *PTHrP* mRNA (average fluorescence intensity 735.58 ± 769.59) compared with the adjacent epithelial specimens (average fluorescence intensity 20.59 ± 12.80) (Figure 1B), demonstrating significantly higher expression level of *PTHrP* mRNA in the cancer tissues than in the adjacent epithelium ($P < 0.000001$). These results imply that many of the OSCC specimens overexpressed *PTHrP* mRNA, but few overexpressed *IL-6* mRNA, compared with the adjacent epithelium specimens.

Expression of IL-6 at Bone Invasive Region in Gingival SCC

To confirm the expression profile of IL-6 by microarray analysis, we examined immunohistochemically the distribution of IL-6-positive cells at the bone-invasive regions in gingival SCC. Although IL-6 was expressed in some tumor cells and oral epithelia adjacent to the tumors, expression varied among the cases studied. More importantly, the fibroblastic cells at the tumor-bone interface also expressed IL-6 (Figure 2, A and B). Incubation of the sections with nonimmunized IgG exhibited no positive reactions (data not shown). The fibroblastic cells at the bone-invasion region also expressed RANKL (Figure 2C). These findings were noted in 10 of 13 specimens examined; we further analyzed the distribution of the positive cells in these 10 specimens by histomorphometry. Because the percentages of RANKL- and IL-6-positive cells among the total number of fibroblasts in a given area varied among the specimens examined (RANKL-positive cells, 11.4 to 65.9%; IL-6-positive cells, 25.1 to 84.1%),

Table 2. Clinical and Histological Characteristics of the 43 Cases of Primary Human Oral Squamous Cell Carcinoma Used for Microarray Analysis

Case	Sex	Age	Primary site	T	N	Histological grade*
1	M	56	Lower gingiva	2	0	Moderately
2	M	55	Upper gingiva	2	0	Well
3	M	56	Upper gingiva	2	0	Well
4	F	64	Lower gingiva	4a	1	Well
5	M	77	Lower gingiva	2	2b	Poorly
6	M	78	Lower gingiva	2	1	Well
7	M	71	Lower gingiva	3	2b	Well
8	M	60	Lower gingiva	4	2b	Moderately
9	M	57	Upper gingiva	4a	1	Poorly
10	M	52	Lower gingiva	4a	2b	Moderately
11	M	66	Lower gingiva	2	0	Well
12	F	66	Upper gingiva	2	0	Moderately
13	M	72	Lower gingiva	2	0	Well
14	M	68	Lower gingiva	4a	2b	Moderately
15	F	66	Tongue	2	0	Moderately
16	M	80	Tongue	2	0	Well
17	M	30	Tongue	2	0	Well
18	F	60	Tongue	2	0	Well
19	M	59	Tongue	3	0	Moderately
20	M	54	Tongue	1	0	Well
21	M	43	Tongue	2	0	Moderately
22	M	46	Tongue	2	0	Well
23	M	58	Tongue	2	0	Well
24	M	66	Tongue	1	2b	Moderately
25	M	61	Tongue	1	2c	Moderately
26	M	70	Tongue	3	1	Moderately
27	M	37	Tongue	2	3	Poorly
28	M	73	Tongue	2	0	Poorly
29	M	32	Tongue	3	0	Moderately
30	F	54	Tongue	2	2b	Moderately
31	M	60	Tongue	4	2c	Moderately
32	M	53	Tongue	2	2b	Moderately
33	M	62	Buccal mucosa	1	0	Well
34	F	74	Buccal mucosa	2	1	Moderately
35	M	71	Buccal mucosa	3	2b	Poorly
36	M	58	Floor of mouth	2	0	Well
37	M	58	Floor of mouth	3	0	Moderately
38	M	66	Floor of mouth	3	1	Moderately
39	M	59	Floor of mouth	4	1	Moderately
40	M	67	Floor of mouth	4	1	Well
41	M	72	Hard palate	1	0	Moderately
42	F	81	Retromolar pad	1	0	Well
43	M	68	Retromolar pad	2	0	Moderately

M, male; F, female; T, tumor; N, node.
*Histological grading: well, well differentiated SCC; moderately, moderately differentiated SCC; poorly, poorly differentiated SCC.

we tested the correlation between the numbers of each cell type per specimen. The number of RANKL-positive fibroblastic cells correlated significantly with the IL-6-positive fibroblastic cells at the tumor-bone interface ($r = 0.935926$, $Y = 0.8115X - 28.644$, $P < 0.0001$) (Figure 2D), suggesting that the RANKL and IL-6 synthesized by stromal cells interact closely. The RANKL-positive cells are located close to the bone surface and osteoclasts (Figure 2C). The distribution of IL-6-positive cells at the tumor-bone interface varied depending on the areas examined in each case; the cells were located close to the cancer nests at some areas (Figure 2B) and to the bone and osteoclasts at other areas (Figure 3, B–D).

To further characterize the IL-6-positive cells, we performed dual immunohistochemical analysis using fluorescence-labeled antibodies. Numerous fibroblastic cells expressed IL-6; furthermore, IL-6 expression was also observed in cancer cells located at the periphery of cancer nests (Figure 3, B–D). Several osteoclasts were also IL-6-positive (arrows in Figure 3, A and C). Many IL-6-positive fibroblastic cells coexpressed vimentin (Figure 3B); furthermore, the number of IL-6-positive fibroblastic cells was very high compared with the number of IL-6-positive B cells (Figure 3C) and macrophages (Figure 3D), suggesting that fibroblastic cells dominantly produce IL-6.

Human Oral Cancer Cells Secrete Factors That Stimulate Osteoclast Formation by Inducing RANKL Expression in Stromal Cells

We performed *in vitro* experiments to examine whether CM derived from the various cancer cell lines could induce RANKL expression in stromal cells. The CM derived from all cancer cell lines, with the exception of A549,

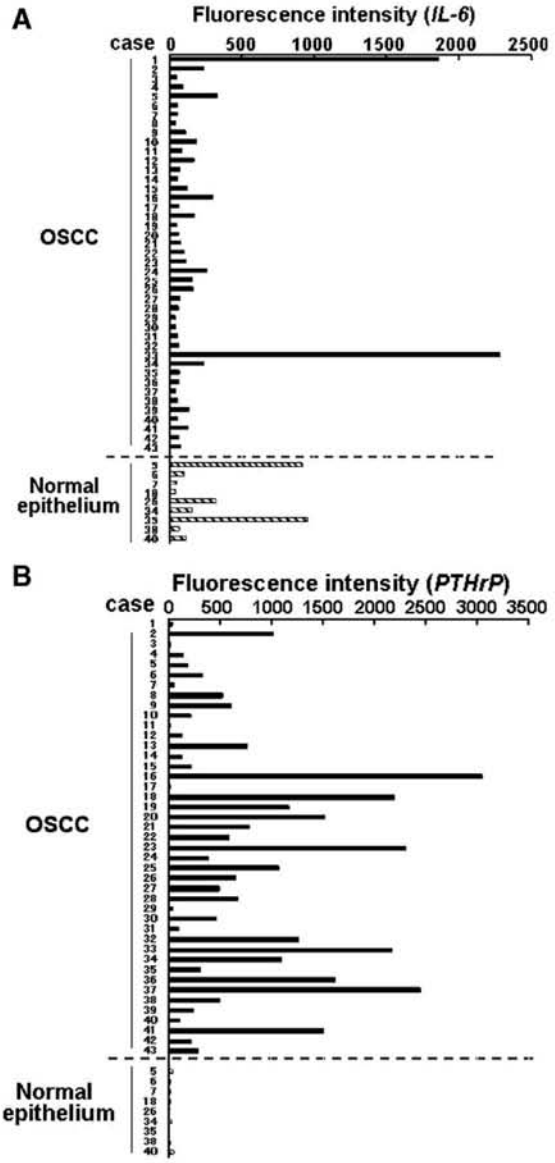


Figure 1. Expression of *IL-6* and *PTHrP* in OSCC. Expression profiles of *IL-6* (**A**) and *PTHrP* mRNA (**B**) in 43 primary human OSCC specimens assessed by microarray analyses as described in *Materials and Methods*. Expression levels in normal epithelium are also shown at the bottom of **A** and **B**. The fluorescence intensity, which was the absolute value of fluorescence intensity in each case, was used to indicate the mRNA expression level.

stimulated *Rankl* mRNA expression in ST2 cells (Figure 4A). The CM derived from BHY and HSC3 cells markedly increased this expression. In addition, the CM derived from oral cancer cell lines (BHY, Ca9, and HSC3) significantly enhanced *RANKL* mRNA expression in mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow (Figure 4B). However, none of the CM significantly altered *Opg* mRNA expression (data not shown).

We also investigated the effects of CM on osteoclast formation by using a mouse coculture system. As shown in Figure 4C, the CM derived from all of the cancer cell lines increased the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclasts. These results suggest that oral cancer cell lines as well as cancer cells originating from nonoral regions stimulate osteoclast formation by inducing RANKL expression in stromal cells.

IL-6 and PTHrP Synthesized by Cancer Cells Are Involved in RANKL Expression and Osteoclast Formation

We then investigated the expression levels of IL-6 and PTHrP in various cancer cell lines. As shown in Figure 5A, all of the cell lines expressed *PTHrP* mRNA at substantial levels, whereas only BHY and HSC3 cells, which are derived from OSCC, expressed *IL-6* mRNA at substantial levels. These results suggest that many OSCC cells express *PTHrP*, but only limited numbers of OSCC express *IL-6*.

To explore the roles of IL-6 and PTHrP, we next examined the effects of neutralizing antibodies against mouse IL-6 receptor[32] and human PTHrP[33] on *Rankl* mRNA expression in ST2 cells. Both antibodies inhibited BHY-CM-induced *Rankl* mRNA expression (Figure 5B) in a dose-dependent manner (Supplemental Figure S1, see *http://ajp.amjpathol.org*). The maximum concentration of PTHrP antibody used (10 μg/ml) almost completely blocked PTHrP-induced cAMP production in ROS 17/2.8-5 cells.[33] Similar results were obtained with HSC3-CM (data not shown). Because BHY and HSC3 cells expressed *IL-6* mRNA at substantial levels, we tested the effects of these antibodies on *Rankl* mRNA expression by using CM derived from Ca9 cells (Ca9-CM), which expresses *IL-6* mRNA at undetectable levels (Figure 5A). As expected, human PTHrP antibody significantly inhibited Ca9-CM-induced *Rankl* expression in ST2 cells (Figure 5C). Interestingly, anti-mouse IL-6 receptor antibody inhibited *Rankl* mRNA expression more effectively than anti-human PTHrP antibody (Figure 5C). These results suggest that IL-6 synthesized not only by human oral cancer cells but also by mouse ST2 cells can stimulate *Rankl* expression in ST2 cells.

As shown in Figure 5D, antibodies against both human PTHrP and mouse IL-6 receptor significantly inhibited BHY-CM-induced osteoclast formation. Considered collectively, these results suggest that IL-6 and PTHrP are involved in the osteoclast formation induced by OSCC.

Oral Cancers Induce IL-6 Expression in Stromal Cells, Leading to RANKL Expression

The results described above suggest that oral cancer cells induce IL-6 expression in stromal cells and that this cytokine in turn plays a role in osteoclast formation induced by OSCC. The distribution of IL-6-positive fibroblastic cells in human gingival SCC as determined by immunohistochemical analysis (Figures 2 and 3) strongly supports this hypothesis. To confirm this finding, we investigated the effects of the CM derived from all of the

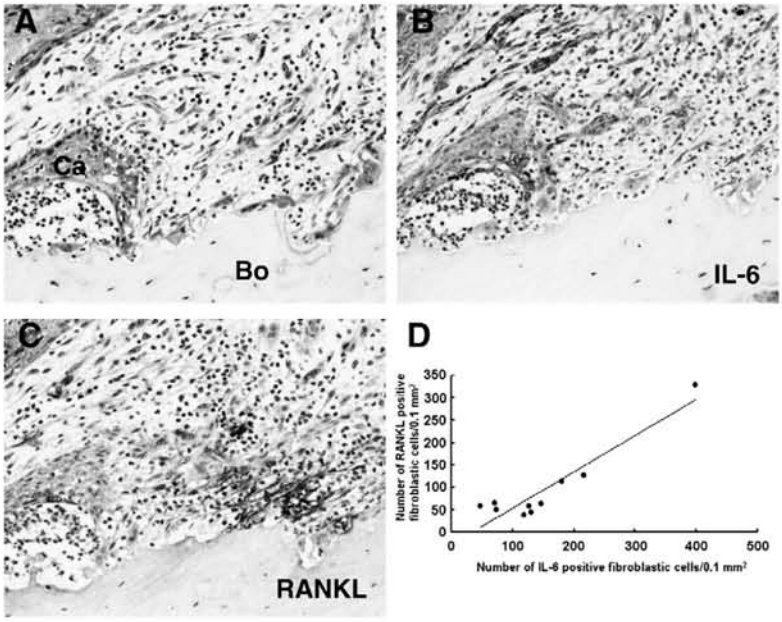


Figure 2. Distribution of RANKL-positive and IL-6-positive cells at the interface of the tumor front and resorbing bone in human gingival SCC. **A:** Histological analysis of tumor-bone interface. Ca, cancer cells; Bo, bone. H&E staining. **B:** Distribution of IL-6-positive cells. **C:** Distribution of RANKL-positive cells. Cells stained brown in **B** and **C** represent positive cells for each antibody. Original magnification, ×200. **D:** Correlation between the number of RANKL-positive and IL-6-positive fibroblastic cells at the tumor-bone interface in 10 human gingival SCCs; a positive correlation was noted ($r = 0.935926$, $Y = 0.8115X - 28.644$, $P < 0.0001$).

cancer cell lines on IL-6 expression in stromal cells. We found that CM derived from oral cancer cell lines significantly increased *Il-6* mRNA expression in ST2 cells (Figure 6A). The stimulatory effects of CM derived from BHY and HSC3 cells were much higher than those of CM from Ca9 and HO1 cells. The CM derived from the non-oral cancer cell lines, with the exception of MCF7, failed to induce *Il-6* mRNA expression (Figure 6A). The CM derived from every cancer cell line induced the production of IL-6 protein from ST2 cells in a similar fashion to levels

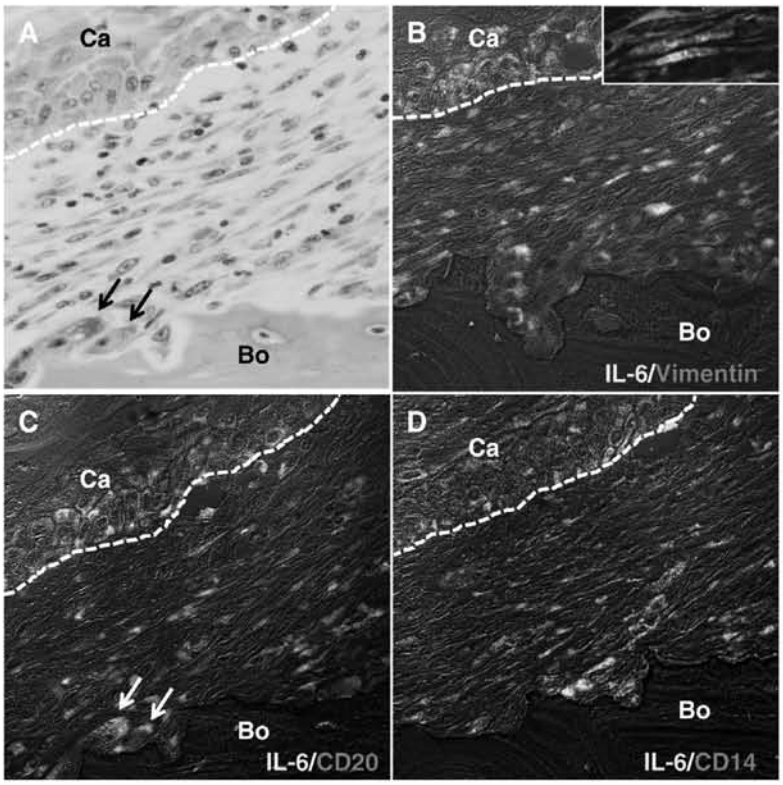


Figure 3. Characterization of IL-6-positive cells at the interface of the tumor front and resorbing bone in human gingival SCC. **A:** Histology of the tumor-bone interface. H&E staining. **B:** Dual immunohistochemical analysis for IL-6 (green) and vimentin (red). **Inset:** High magnification image of the fibroblastic cells dual positive for IL-6 and vimentin. **C:** Dual staining for IL-6 (green) and CD20 (red). **D:** Dual staining for IL-6 (green) and CD14 (red). **A** and **C** are the same section; the section was stained with H&E (**A**) after pictures were taken for immunohistochemical analysis in (**C**). **White dotted lines** indicate interfaces of cancer nest and stroma. **Arrows** in **A** and **C** indicate osteoclasts. Ca, cancer cells, Bo, Bone. Original magnification: ×400 (**A–D**); ×1600 (**inset** in **A**).

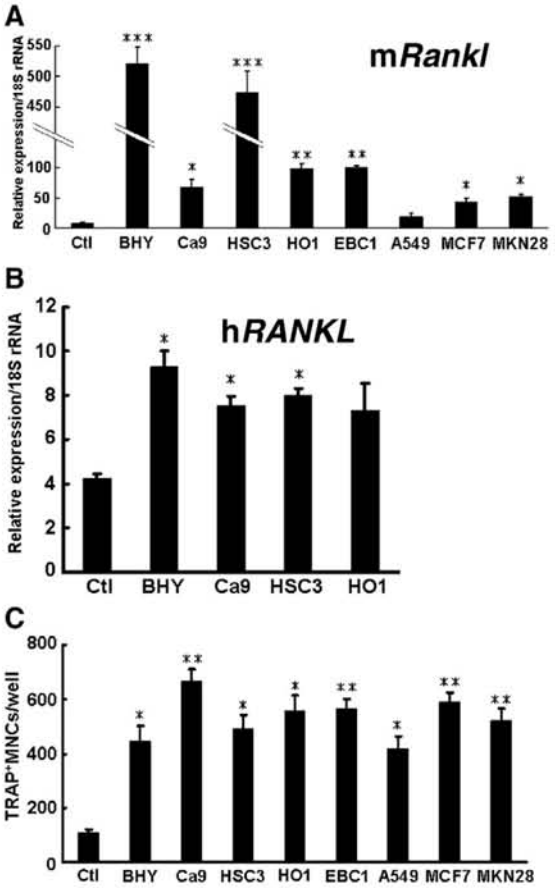


Figure 4. Effects of CM on *RANKL* expression in stromal cells and on osteoclast formation. Effects of CM derived from various cancer cell lines on mouse *Rankl* (m*Rankl*) mRNA expression in ST2 cells (**A**). ST2 cells were cultured for 2 days in the presence or absence (Ctl) of CM derived from various cancer cell lines, and the expression levels of *Rankl* were determined by using mouse specific primers. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$, significantly different from Ctl. **B:** Effects of CM derived from OSCC cell lines on human *RANKL* (h*RANKL*) mRNA expression in human mesenchymal stem cells. These cells were cultured for 2 days with or without (Ctl) CM, and the expression levels of *RANKL* were determined by using human specific primers. $^{*}P < 0.01$, significantly different from Ctl. **C:** Effect of CM derived from various cancer cell lines on osteoclast formation. Osteoclast formation was assessed by adding CM from various cancer cell lines to coculture of ST2 with mouse bone marrow cells as described in *Materials and Methods*. $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.005$, significantly different from the control (Ctl). TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase; MNCs, mononuclear cells.

of *Il-6* mRNA induced by each CM (Figure 6B). CM derived from OSCC cell lines also enhanced *IL-6* mRNA expression in human mesenchymal stem cells (Figure 6C). These results indicate that oral cancer cells effectively induce IL-6 expression in stromal cells. None of the CM induced *Pthrp* or *Tnf-α* mRNA expression in ST2 cells (Supplemental Figure S2, see *http://ajp.amjpathol.org*).

To discriminate between the roles of IL-6 synthesized by cancer cells and stromal cells in the induction of *Rankl* expression, we conducted experiments using antibodies that specifically neutralize human IL-6 and mouse IL-6. Both antibodies inhibited BHY-CM-induced *Rankl* mRNA expression in ST2 cells (Figure 7A). Moreover, compared with treatment with one of these antibodies alone, simul-

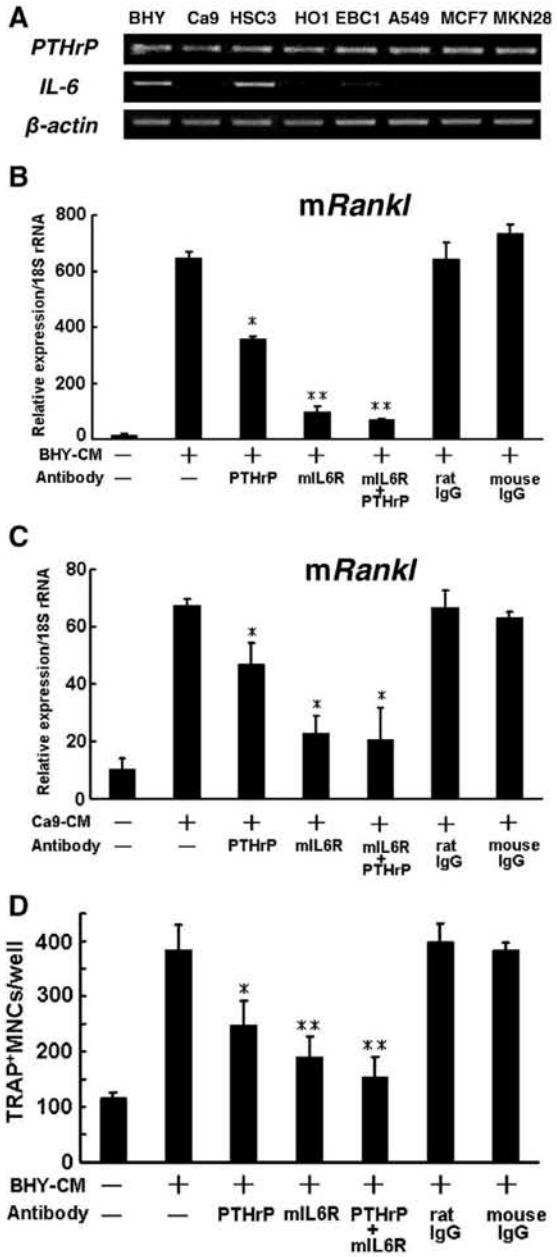


Figure 5. Role of IL-6 and PTHrP in *Rankl* expression and osteoclast formation. **A:** mRNA expression of *IL-6* and *PTHrP* in various cancer cell lines. **B** and **C:** Effects of anti-human PTHrP antibody and anti-mouse IL-6 (mIL-6) receptor antibody on *Rankl* mRNA expression induced by BHY-CM (**B**) and Ca9-CM (**C**) in ST2 cells. ST2 cells were cultured for 2 days in the presence or absence of BHY or Ca9-CM, and the expression of *Rankl* was determined by using mouse specific primers. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, significantly different from the value for BHY-CM(+) and antibody(−) in **B**, and $^{*}P < 0.05$, significantly different from the value for Ca9-CM(+) and antibody (−) in **C**. **D:** Effects of anti-human PTHrP and anti-mouse IL-6 receptor antibodies on formation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive osteoclast after stimulation with BHY-CM in cocultured ST2 and bone marrow cells. $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.005$, significantly different from the value of BHY-CM treated cells without any antibodies. In each experiment, the cells were treated with 10 μg/ml of each antibody. MNCs, multinucleated cells.

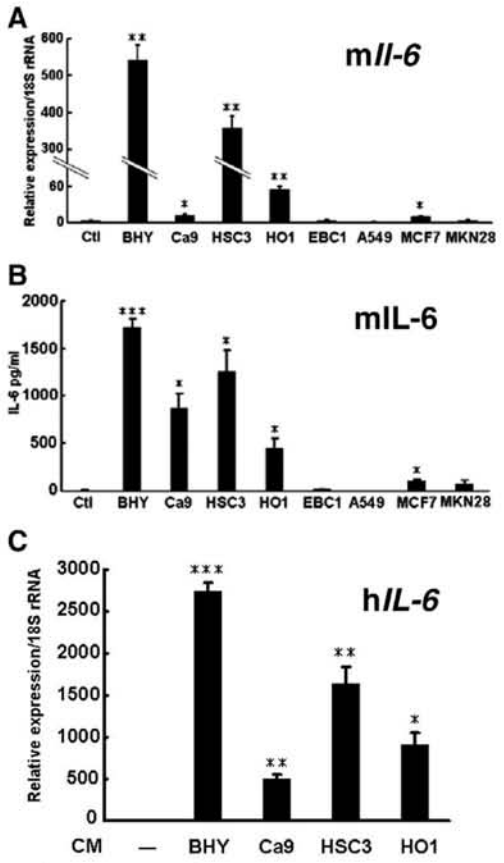


Figure 6. Stimulation of IL-6 in ST2 cells and human mesenchymal stem cells by various cancer cell lines. Effects of CM derived from various cancer cell lines on *Il-6* mRNA expression (**A**) and IL-6 production (**B**) in ST2 cells. ST2 cells were cultured for 2 days in the presence or absence (Ctl) of CM derived from various cancer cells and mouse *Il-6* (mIL-6) mRNA expression was determined by using mouse specific primers (**A**). IL-6 protein levels secreted by ST2 cells, which were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using culture supernatants obtained from ST2 cells cultured for 24 hours with various CM in the absence of FBS (**B**). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$, significantly different from the control culture (Ctl). **C:** Effects of CM derived from OSCC cell lines on human *IL-6* (hIL-6) mRNA expression in human mesenchymal stem cells. These cells were cultured for 2 days in the presence or absence of CM derived from OSCC cells, and the expression of human *IL-6* mRNA was examined by using human specific primers. $^{*}P < 0.001$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$, significantly different from human mesenchymal stem cells cultured in the absence of any CM.

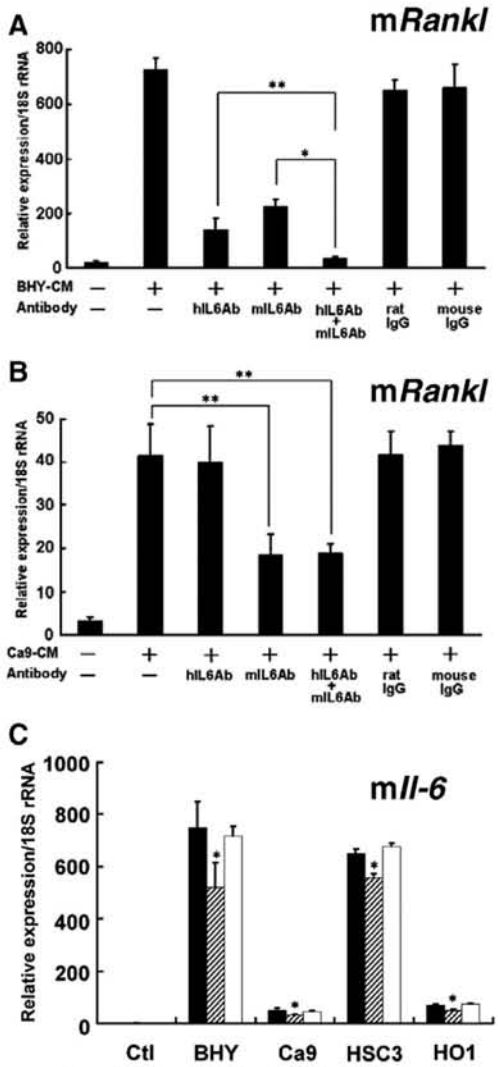


Figure 7. Effects of anti-human IL-6 antibody (hIL6Ab) and anti-mouse IL-6 antibody (mIL6Ab) on *Rankl* mRNA expression induced by BHY-CM (**A**) and Ca9-CM (**B**) in ST2 cells. ST2 cells were cultured for 2 days in the presence or absence of each CM, and the *Rankl* mRNA expression in ST2 cells was determined by using mouse specific primers. $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.05$. **C:** Effect of anti-human PTHrP antibody on mouse *Il-6* mRNA expression induced by CM-isolated from OSCC cell lines in ST2 cells. ST2 cells were cultured for 2 days in the presence or absence of CM isolated from each OSCC cell line, and the effect of anti-PTHrP antibody on *Il-6* expression was determined. In each experiment, the cells were treated with 10 μg/ml each antibody. Black bars, values treated with each CM only; gray bars, values treated with each CM and anti-PTHrP antibody; white bars, values treated with each CM and normal mouse IgG_1 (10 μg/ml). $^{*}P < 0.05$, significantly different from each CM induced *Il-6* mRNA expression.

taneous treatment with both produced an additive inhibitory effect on *Rankl* mRNA expression (Figure 7A). When we used CM derived from Ca9 cells (Ca9-CM), which expressed *IL-6* mRNA at undetectable levels (Figure 5A), the anti-human IL-6 antibody did not alter *Rankl* mRNA expression, whereas anti-mouse IL-6 antibody significantly inhibited it (Figure 7B). These results demonstrate that IL-6 synthesized by both cancer cells and stromal cells induces RANKL expression in stromal cells.

We explored the factors that regulate IL-6 production in stromal cells. Because PTHrP is reported to stimulate IL-6 synthesis in osteoblastic cells,[37] we examined the effects of anti-human PTHrP antibody on *Il-6* mRNA expression in ST2 cells. As shown in Figure 7C, this antibody partially inhibited OSCC (BHY, Ca9, HSC3, and HO1)-induced *Il-6* mRNA expression (15 to 36% inhibition) at a concentration of 10 μg/ml. Almost the same inhibitory effects on BHY-CM-induced *Il-6* mRNA expression in ST2 cells occurred at concentrations of 5 and 10 μg/ml of anti-PTHrP antibody (Supplemental Figure S3, see *http://ajp.amjpathol.org*), suggesting that the concentration of anti-PTHrP antibody used (10 μg/ml) exerted the maximum inhibitory effect. These results support the

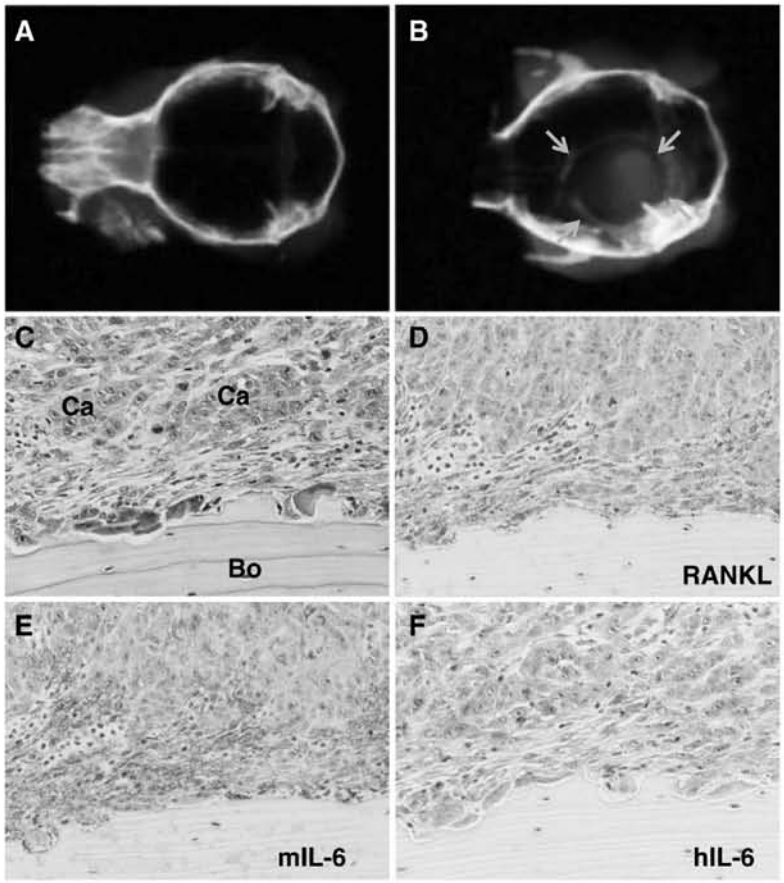


Figure 8. Xenograft experiments of HSC3 cells into athymic mice. The HSC3 cells were transplanted onto the periosteal region of parietal bone as described in *Materials and Methods*. **A** and **B:** Bone resorption was confirmed by soft X-ray examination 3 weeks after transplantation. A soft X-ray picture of calvaria in control group with injection of PBS only **(A).** A soft X-ray picture of calvaria in experimental group with injection of HSC3 cells (**B**). **Arrows** in **B** indicate the margin of bone destruction. **C–F:** Histology of bone resorbing region by HSC3 cells in semiserial sections. **C:** Typical histological appearance of the bone resorbing region by HSC3 cells. Note that fibroblastic cells are scattered between cancer cells (Ca) and bone (Bo) surface. Numerous osteoclasts are observed on the bone surface. H&E stain. **D:** Immunohistochemical analysis of RANKL. Note the RANKL-positive fibroblastic cells between cancer cells and bone surface. **E:** Immunohistochemical analysis of mouse IL-6 (mIL-6). Note that only fibroblastic cells between cancer cells and bone surface are positive for mIL-6. **F:** Immunohistochemical analysis of human IL-6 (hIL-6). Note that only cancer cells are positive for hIL-6.

hypothesis that PTHrP is partially involved in the regulation of cancer-induced IL-6 expression in stromal cells.

Xenograft Experiments of HCS3 Cells into Athymic Mice

Soft X-ray analysis revealed that transplantation of HSC3 cells onto the periosteal region of the parietal bone induced marked bone destruction in all athymic mice injected with HSC3 cells (n = 3) (Figure 8, A and B). Histologically, many osteoclasts were observed on the bone surface exposed to the injected cancer cells (Figure 8C). In addition, numerous fibroblastic cells were located between the cancer cells and the resorbing bone surface. These findings are similar to the bone resorption caused by human OSCC found in the surgical specimens. We therefore investigated the expression of RANKL, human IL-6, and mouse IL-6 by immunohistochemistry. The fibroblastic cells between the cancer cells and the bone surface expressed RANKL (Figure 8D). Interestingly, mouse IL-6 was identified in the fibroblastic cells (Figure 8E), which originated from athymic mice, whereas the expression of human IL-6 was limited to the cancer cells, which were derived from human OSCC (Figure 8F).

Discussion

Several reports have demonstrated that the elevated levels of serum IL-6 in patients with head and neck SCC serve as a valuable biomarker for predicting clinical outcome such as radioresistance, recurrence, and survival.[16–18] However, direct evidence of IL-6 production by OSCC is not well documented. Woods et al[38] reported that IL-6 was expressed in all of the 12 OSCC specimens examined, but other groups have reported that the expression levels varied among the OSCCs they tested.[17,39] The results of microarray analysis in the present study demonstrated that a few OSCC specimens expressed IL-6. Thus, the cells responsible for the elevated serum IL-6 levels noted in human OSCC patients should be investigated further. The immunohistochemical analysis in this study using bone-invasive human gingival SCC specimens revealed that IL-6 was expressed both in cancer cells located at the periphery of the cancer nests and in the fibroblastic cells at the tumor-bone interface. Because various cell types produce IL-6, we confirmed the nature of IL-6-producing cells by dual fluorescence immunohistochemistry and found that fibroblastic cells, not B cells or macrophages, are the major cells responsible for IL-6 production. Furthermore, the number of IL-6-positive fibroblastic cells significantly correlated with

the number of RANKL-positive fibroblastic cells at the tumor-bone interface. We also found that oral cancer cell lines effectively stimulated IL-6 synthesis in cultured stromal cells and that this cytokine participates in the induction of RANKL expression.

Thus, we are the first group to propose that IL-6 synthesized by stromal cells plays a significant role in OSCC-induced osteoclast formation, but the regulatory mechanism by which OSCC cells stimulate IL-6 synthesis in stromal cells remains unclear. We demonstrated that an anti-PTHrP antibody partially inhibited OSCC-CM-induced *Il-6* expression in ST2 cells. PTHrP is reported to induce IL-6 production in osteoblastic cells[37]; thus, it might be one of the secretions of OSCC that stimulates IL-6 expression in stromal cells. Mata et al[40] reported on the synergistic effects of IL-6 and PTHrP on bone resorption, and so PTHrP might enhance IL-6 activity during bone destruction by OSCC. However, other factors involved in induction of IL-6 in stromal cells should be explored because anti-PTHrP antibody exerted only partial inhibitory effects (15 to 36%) (Figure 7C). Sohara et al[41] reported that neuroblastoma cells also stimulate IL-6 production in bone marrow mesenchymal stem cells and that this cytokine subsequently activates osteoclasts. More recently, they demonstrated that galectin-3-binding protein secreted by neuroblastoma cells is responsible for inducing IL-6 expression in bone marrow stromal cells.[42] It has also been reported that myeloma cells up-regulate IL-6 in bone marrow stromal cells.[43,44] In the present study, we found that IL-6 expression in stromal cells was enhanced to a greater degree by CM derived from OSCC cells than by those derived from non-oral cancer cells, suggesting that the specific factor(s) produced by OSCC induces IL-6 expression in stromal cells.

We identified IL-6-positive osteoclasts on the resorbing bone surface at the tumor-bone interface by immunohistochemical analysis. Expression of IL-6 in osteoclasts has been reported in several bone diseases, such as Paget's disease of bone,[45] giant cell tumors,[46] renal osteodystrophy,[47] and fibrous dysplasia of bone.[48] It was suggested that the numbers of IL-6-expressing osteoclasts are significantly higher in osteoclasts within diseased bone than in normal osteoclasts.[48] Previous reports suggested that IL-6 synthesized by osteoclasts plays a role in osteoclastogenesis via an autocrine/paracrine fashion in pathological bone diseases.[46,49,50] Thus, IL-6 synthesized by stromal cells, cancer cells, and osteoclasts may collaborate to induce osteoclastic bone resorption in OSCC-associated bone destruction and elevate serum IL-6 levels in patients with OSCC.

In the present study, microarray analyses of human primary OSCC specimens revealed that many of the specimens overexpressed *PTHrP* mRNA. The *PTHrP* expression profile identified in this study was consistent with that described in previous reports.[26,27] By using a neutralizing antibody against PTHrP, we found that PTHrP is involved in *Rankl* mRNA expression in stromal cells and osteoclast formation induced by CM derived from oral cancer cells. These results provide the first evidence that PTHrP synthesized by oral cancer cells participates in osteoclast formation. Although these findings suggest that PTHrP is involved in bone resorption induced by OSCC, the contribution of PTHrP to bone destruction might be smaller than that of IL-6 because neutralizing antibody against IL-6 more effectively inhibited *Rankl* expression in ST2 cells and osteoclast formation than that against PTHrP.

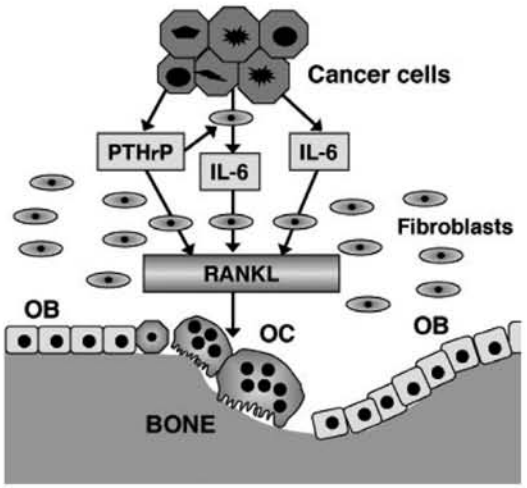


Figure 9. Schematic representation of the roles of IL-6 and PTHrP in OSCC-induced osteoclast formation. OC, osteoclasts; OB, osteoblasts.

Figure 9 summarizes our hypothesis that IL-6 and PTHrP play important roles in OSCC-induced osteoclast formation. OSCC cells provide a suitable microenvironment for osteoclast formation not only by producing IL-6 and PTHrP but also by stimulating stromal cells to synthesize IL-6. IL-6 and PTHrP produced by OSCC cells and IL-6 by stromal cells induce fibroblastic cells/osteoblasts to synthesize RANKL, and subsequently they activate osteoclast formation and bone resorption. To prove this hypothesis, suitable *in vivo* experimental models are required. A few animal models have been generated for this purpose in previous studies[13,14]; however, in these models, OSCC cells are usually in direct contact with the resorbing bone surface lacking the substantial amount of fibrous stroma typically observed in the case of bone-invasive human OSCC. Therefore, these models will not be of much help in clarifying the role of IL-6 synthesized by stromal cells in response to OSCC. To overcome this problem, we successfully developed a suitable bone destruction model by xenotransplantation of OSCC cells (HSC3) into the periosteal region of athymic mice, which exhibits bone invasion patterns similar to those of human OSCC. In this model, we confirmed RANKL expression in fibroblastic cells at the tumor-bone interface. IL-6 expression was also identified in both fibroblastic and cancer cells. Thus, this model will be useful in understanding molecular mechanisms underlying cancer-associated bone destruction.

Acknowledgments

We thank Dr. Yukio Kato for providing the human mesenchymal stem cells and Dr. Masato Okamoto for providing BHY cells.

References

1. Semba I, Matsuuchi H, Miura Y: Histomorphometric analysis of osteoclastic resorption in bone directly invaded by gingival squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1996, 25:429–435
2. Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA: Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. Laryngoscope 2000, 110:65–72
3. Brown JS, Lowe D, Kalavrezos N, D'Souza J, Magennis P, Woolgar J: Patterns of invasion and routes of tumor entry into the mandible by oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2002, 24:370–383
4. Shaw RJ, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Vaughan ED: The influence of the pattern of mandibular invasion on recurrence and survival in oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2004, 26:861–869
5. Takayanagi H: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol 2007, 7:292–304
6. Boyce BF, Xing L: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys 2008, 473:139–146
7. Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM: Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. J Endocrinol 2001, 170:451–460
8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998, 93:165–176
9. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:3597–3602
10. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997, 89:309–319
11. Okamoto M, Hiura K, Ohe G, Ohba Y, Terai K, Oshikawa T, Furuichi S, Nishikawa H, Moriyama K, Yoshida H, Sato M: Mechanism for bone invasion of oral cancer cells mediated by interleukin-6 in vitro and in vivo. Cancer 2000, 89:1966–1975
12. Tada T, Jimi E, Okamoto M, Ozeki S, Okabe K: Oral squamous cell carcinoma cells induce osteoclast differentiation by suppression of osteoprotegerin expression in osteoblasts. Int J Cancer 2005, 116:253–262
13. Shibahara T, Nomura T, Cui NH, Noma H: A study of osteoclast-related cytokines in mandibular invasion by squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg 2005, 34:789–793
14. Cui N, Nomura T, Noma H, Yokoo K, Takagi R, Hashimoto S, Okamoto M, Sato M, Yu G, Guo C, Shibahala T: Effect of YM529 on a model of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma in mice. Clin Cancer Res 2005, 11:2713–2719
15. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylors RL, Manolagas SC: STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-κB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D_3 or parathyroid hormone. J Biol Chem 1999, 274:19301–19308
16. Jablonska E, Piotrowski L, Grabowska Z: Serum levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, sTNF-RI and CRP in patients with oral cavity cancer. Pathol Oncol Res 1997, 3:126–129
17. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C: Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. Clin Cancer Res 1999, 5:1369–1379
18. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, Wolf GT, Teknos TN: Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. Cancer 2008, 113:750–757
19. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF: Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. J Biol Chem 1987, 262:7151–7156
20. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA: Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. J Clin Invest 1987, 80:1803–1807
21. Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, Martin TJ: Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84:5048–5052
22. Shulkes A, Fletcher DR, Rubinstein C, Ebeling PR, Martin TJ: Production of calcitonin gene related peptide, calcitonin and PTH-related protein by a prostatic adenocarcinoma. Clin Endocrinol (Oxf) 1991, 34:387–393
23. Malakouti S, Asadi FK, Kukreja SC, Abcarian HA, Cintron JR: Parathyroid hormone-related protein expression in the human colon: immunohistochemical evaluation. Am Surg 1996, 62:540–544; discussion 544–545
24. Dunne FP, Bowden SJ, Brown JS, Ratcliffe WA, Browne RM: Parathyroid hormone related protein in oral squamous cell carcinomas invading the mandible. J Clin Pathol 1995, 48:300–303
25. Tsuchimochi M, Kameta A, Sue M, Katagiri M: Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and serum PTHrP in normocalcemic patients with oral squamous cell carcinoma. Odontology 2005, 93:61–71
26. Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, Cohen D, Yun J, McFadden M: Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. Laryngoscope 2005, 115:690–698
27. Deyama Y, Tei K, Yoshimura Y, Izumiyama Y, Takeyama S, Hatta M, Totsuka Y, Suzuki K: Oral squamous cell carcinomas stimulate osteoclast differentiation. Oncol Rep 2008, 20:663–668
28. Roodman GD: Biology of osteoclast activation in cancer. J Clin Oncol 2001, 19:3562–3571
29. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA: Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature 2007, 449:557–563
30. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D: Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. Cancer Res 2009, 69:1255–1258
31. Ishikuro M, Sakamoto K, Kayamori K, Akashi T, Kanda H, Izumo T, Yamaguchi A: Significance of the fibrous stroma in bone invasion by human gingival squamous cell carcinomas. Bone 2008, 43:621–627
32. Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Takeda Y, Ohsugi Y: Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 1998, 41:2117–2121
33. Onuma E, Sato K, Saito H, Tsunenari T, Ishii K, Esaki K, Yabuta N, Wakahara Y, Yamada-Okabe H, Ogata E: Generation of a humanized monoclonal antibody against human parathyroid hormone-related protein and its efficacy against humoral hypercalcemia of malignancy. Anticancer Res 2004, 24:2665–2673
34. Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, Tomioka H, Ushijima M, Noda M, Omura K, Miki Y: Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci 2007, 98:740–746
35. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y: Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys Res Commun 2001, 288:413–419
36. Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S: Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. J Cell Biochem 2008, 103:335–345
37. Guillén C, Martinez P, de Gortazar AR, Martinez ME, Esbrit P: Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. J Biol Chem 2002, 277:28109–28117
38. Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA: Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. Cancer Res 1998, 58:3132–3141
39. Wang YF, Chang SY, Tai SK, Li WY, Wang LS: Clinical significance of interleukin-6 and interleukin-6 receptor expressions in oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2002, 24:850–858

40. de la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD: Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. J Clin Invest 1995, 95:2846–2852
41. Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolta JA, DeClerck YA: Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. Cancer Res 2005, 65:1129–1135
42. Fukaya Y, Shimada H, Wang LC, Zandi E, DeClerck YA: Identification of galectin-3-binding protein as a factor secreted by tumor cells that stimulates interleukin-6 expression in the bone marrow stroma. J Biol Chem 2008, 283:18573–18581
43. Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA: A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. Stem Cells 2006, 24:986–991
44. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, Larghero J: Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. Leukemia 2007, 21:158–163
45. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR: Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone, J Clin Invest 1992, 89:46–52
46. Reddy SV, Takahashi S, Dallas M, Williams RE, Neckers L, Roodman GD: Interleukin-6 antisense deoxyoligonucleotides inhibit bone resorption by giant cells from human giant cell tumors of bone. J Bone Miner Res 1994, 9:753–757
47. Langub MC Jr, Koszewski NJ, Turner HV, Monier-Faugere MC, Geng Z, Malluche HH: Bone resorption and mRNA expression of IL-6 and IL-6 receptor in patients with renal osteodystrophy. Kidney Int 1996, 50:515–520
48. Riminucci M, Kuznetsov SA, Cherman N, Corsi A, Bianco P, Gehron Robey P: Osteoclastogenesis in fibrous dysplasia of bone: in situ and in vitro analysis of IL-6 expression. Bone 2003, 33:434–442
49. Roodman GD: Regulation of osteoclast differentiation. Ann NY Acad Sci 2006, 1068:100–109
50. O'Keefe RA, Teot LA, Singh D, Puzas JE, Rosier RN, Hicks DG: Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Lab Invest 1997, 76:457–465

顎顔面矯正学分野

森山 啓司

医歯学総合研究科・顎顔面頚部機能再構築学系専攻
顎顔面矯正学・教授

1）研究の課題名

頭蓋早期癒合症のモデルマウスの解析と可溶型 FGFR2 の効果

Analysis of a model mouse of craniosynostosis and the effect of soluble FGFR2

Apert syndrome の原因は Fibroblast Growth Factor 2（FGFR2）の細胞外ドメインである Ig Ⅱと Ig Ⅲの結合領域における S252W および P253R の変異である。しかしながら、その発症の分子細胞メカニズムには不明な点が多く残されている。そこで FGFR2 IIIc S252W を受精卵に遺伝子導入した transgenic mouse（S252W）と、FGFR2 IIIc S252W から細胞内ドメインを欠如する可溶型のコンストラクトを遺伝子導入した transgenic mouse（SOL）を作製し、解析した。S252W 由来の細胞は、アリザリンレッド染色で強染され、アルカリフォスファターゼ活性が亢進した。さらに免疫不全マウスの背側皮下に S252W 由来の細胞を移植したところ、異所性骨形成が誘導された。一方、SOL の細胞を移植したところ、骨組織誘導は全くみられなかった。さらに S252W と SOL の両マウスを交配して得られたマウス由来の細胞は、SW06 の頭蓋冠由来のマウスの細胞と比較して、アリザリンレッド染色で淡染され、アルカリフォスファターゼ活性も低値を示した。興味深いことに、この細胞を免疫不全マウスの背側皮下に移植した結果、SOL 由来の細胞移植によって誘導される骨形成を有意に抑制した。上記の結果は、FGFR2 IIIc S252W の遺伝子機能に対して、その細胞内ドメインを欠如する可溶型のコンストラクトが治療ターゲットとして有用なことを示唆する。

頭蓋冠縫合部の発生における Hedgehog シグナルの機能解析

Analysis of the role of Hedgehog signaling in the calvaria suture development

頭蓋冠縫合部は、隣接する頭蓋骨を結合する線維性組織であり、頭蓋冠の成長に重要な役割を果たす。頭蓋冠縫合部早期癒合症（Craniosynostosis）は、縫合部が早期に閉鎖する先天性の骨系統疾患であり、重篤な不正咬合を呈する事が多い。

Gli3 変異は、頭蓋の変形や多指症を主症状とする Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome の原因となることが知られている。Gli3 欠損マウス（Gli3Xt－J/Xt－J）がラムダ状縫合に早期石灰化を呈することに着目し、Craniosynostosis に対する治療法の開発に向けての基礎的な研究を行ってきた。

野生型（Wt）頭蓋冠において、Gli3 mRNA は、ラムダ状縫合および前頭縫合に接する osteogenic front で限局的に認められた。Gli3Xt－J/Xt－J ラムダ状縫合では Patched1, Runx2-II, 及び Dlx5 等の明らかな発現上昇、および Twist1 の発現低下が観察され、骨芽細胞分化の亢進が確認された。BrdU 取り込み実験によって Gli3Xt－J/Xt－J では縫合部中央部の間葉系細胞で有意な細胞増殖亢進が認められた。FGF2 除放ビーズを Gli3Xt－J/Xt－J ラムダ状縫合に適応したところ、ビーズ周囲に Twist1 発現が誘導され、同部位における早期癒合を阻止した。最後に、Gli3/Runx2 複合変異マウスを作成したところ、Gli3Xt－J/Xt－J Runx2+/-マウスではラムダ状縫合の開存が全例で認められた。以上より、頭蓋冠縫合部の適切な発生には、Gli3 が重要な働きをすることが示唆され、Runx2 の機能抑制により、縫合部における早期石灰化が阻止されることが示された。以上の結果は、将来 RNAi 等を利用した craniosynostosis に対する非外科的治療法開発へのヒントとなることが期待される。

ペリオスチンノックアウトマウスを用いた歯および歯周組織の生物学的特性の解明

Phenotypic and functional analysis of tooth and periodontal tissues found in periostin null mice.

ペリオスチンは特に骨外膜、歯根膜、心臓弁に特異的に局在する細胞外基質（ECM）タンパクであり、細胞接着、コラーゲン線維形成・架橋形成への関与、線維芽細胞の遊走・活性化促進に重要であると考えられている。ペリオスチンを欠失させたマウス（ノックアウトマウス）を解析した以前の報告では、咬合力に対抗して歯周組織を健全に維持する機能にペリオスチンが関与していることが示唆されていた。本研究では、マウスの歯の発育時に咬合力のような機械的な力が付加された際、ペリオスチンの有無がどのような影響を果たしているかを解析した。詳細な発現解析により歯髄内の象牙芽細胞、象牙芽細胞下細胞層、およびエナメル芽細胞にペリオスチン発現が確認された。咬合力が負荷された切歯において、ペリオスチンノックアウトマウスは野生型に比して象牙質形成が有意に増加していた。一方、ノックアウトマウスには切歯臼歯ともエナメル質の石灰化低下が確認された。切歯の象牙質にみられる非コラーゲン性タンパク（DSPP, DMP1, BSP, OPN）の発現がノックアウトマウスにおいて変化していた。また、切歯を切除して咬合力を取り除いたモデルにおける切歯象牙質形成速度は、野生型マウスは減少したが、ノックアウトマウスでは増加した。象牙芽細胞様細胞の培養実験や、TGF-beta1を過剰発現するトランスジェニックマウスとの比較から、これらの変化にはTGF-beta1によって直接制御されているペリオスチンの発現量が関与している可能性が示された。今後は再度歯周組織に着目し、近年示唆されているECMとしてのペリオスチンが細胞内で機能している可能性を、機械的な力が付加された条件下で検討する予定である。

ペリオスチンに着目した歯根膜弾性線維の機能解明

The function analysis of elastic fiber focased on periostin in periodontal ligament

歯根膜は矯正治療中の歯の移動や矯正治療後の歯の安定に深く関与し、歯根膜の恒常性は健全な歯列や歯周組織を保つためにきわめて重要である。近年、歯根膜の弾性線維が歯根膜のコラーゲンの走行方向の調整に関連があることが報告され、弾性線維が歯根膜の恒常性に関与していることが示唆された。しかし、弾性線維がどのようにコラーゲンの走行方向を調整しているのかを含め、その機能に関しては不明な点が多く、機能解析が求められている。

弾性線維は様々な組織に存在し、組織に弾力を与えていると言われている。歯根膜中の線維成分では主要な構成要素はコラーゲン線維と弾性線維である。コラーゲン線維は歯槽骨とセメント質を結合するように存在し、咬合力に耐えるように歯を支持する役割があることが知られている。一方、歯根膜弾性線維は主要構成タンパクがfibrillin-1であることや機能の一部が知られるのみである。fibrillin-1が低発現するマウスを使った歯根膜弾性線維の解析では、不規則なコラーゲン線維の走行が確認された。また、興味深いことに歯根膜や骨外膜に特異的に発現するペリオスチンが有意に減少していた。そこで本研究では歯根膜弾性線維とペリオスチンとの関連を解析することで、歯根膜弾性線維が歯根膜の恒常性にどのように関連しているかを明らかにしようとするものである。

毛髪・歯・骨症候群 （Trichodentoosseous（TDO）syndrome）の歯と骨の表現型発現メカニズムの解析

In vivo impact of a 4 bp deletion mutation in the DLX3 gene: understanding the mechanisms of TDO syndrome phenotypes.

毛髪・歯・骨症候群 （Trichodentoosseous（TDO）syndrome）は、常染色体優性遺伝の外胚葉異形成症（Ectodermal dysplasia; ED）の1つであるとされている。典型的な毛髪・歯・骨症候群では、巻き毛やエナメル質形成不全のほか、頭蓋冠や長管骨の骨硬化症をおこす。まれに頭蓋骨縫合早期癒合症が見られるが、その場合は長頭症となり、上下顎の咬合状態に影響を及ぼすだけでなくエナメル質形成不全から口腔機能に重大な障害を引き起こす可能性がある。現在までに、毛髪・歯・骨症候群の原因遺伝子であるDLX3 遺伝子上の変異のタイプによって表現型に様々なバリエーションがあること判明しているが、表現型発現のメカニズムに関しては不明な点が多い。今回我々は、骨症状を引き起こすことで知られるc.571_574delGGGG変異についてトランスジェニック（TG）マウスを作成し、個体レベルの表現型（病態）の理解を目標とした。マウス2.3kb-Col1a1プロモーター下に変異DLX3を発現させたところ、生体内では破骨細胞数が減少することによって骨硬化が引き起こされている事が以前の報告で示唆された。今回の報告では、歯における表現型（タウロドンティズム: 長胴歯）についてその発現メカニズムを解析した。変異マウスに見られたタウロドンティズムは、象牙質厚みの菲薄化が原因で、象牙芽細胞にはアポトーシスを示す像が見られた。象牙芽細胞様細胞株を用い、免疫染色、プロモーター解析、siRNAを利用して解析したところ、変異DLX3によって細胞極性と一次繊毛形成に重要なTBC1D19の発現変化が確認された。象牙芽細胞の形態異常とアポトーシスは、変異DLX3によるTBC1D19の発現変化のためで、結果

としてタウロドントが形成されたことが示唆された。

マルファン症候群の重篤な歯周炎に関する分子機構

Molecular mechanism of severe periodontitis in Marfan syndrome

弾性線維の主要構成タンパクfibrillin-1をコードするFBN1遺伝子は、心血管（大動脈乖離や拡張）、骨格（高身長）、目（水晶体脱臼）などを主症状とする1型Marfan 症候群の責任遺伝子である。この疾患ではさらに重篤な歯周疾患に罹患することが知られているが、その発症機構は不明である。そこでFbn1の遺伝子を改変したhypomorphic mice（Mg Δ）に実験的に歯周疾患を誘発し解析を行った。

昨年度に引き続き本年度も、Mg Δヘテロ接合子に歯周病原菌P.gingivalisを上顎頬側歯肉に2日毎計3回播種させて惹起した歯周炎モデルを用いた。本年度は、最近Marfan 症候群の心血管治療薬として使用されることが多いAngiotensin II receptor blocker（ARB）の一つであるテルミサルタンの歯周疾患に対する作用を中心に検討した。テルミサルタンの飲料水中への添加は、P.gingivalisをMg Δヘテロ接合子に惹起させた歯槽骨吸収を有意に抑制した。さらにこの抑制は、血中の活性化TGF-bレベルとTNF-αレベルを有意に抑制した。
これらの結果より、Angiotensin II receptor blocker（ARB）は心血管のみならず、歯周疾患の予防や進行抑制に効果的な薬剤であることが示唆された。

先天性多数歯欠損家系におけるPAX9変異解析

Non-syndromic Oligodontia with a Novel Mutation of PAX9.

歯の喪失や欠損が多数歯は、咀嚼、発音、摂食といった口腔機能に重大な障害を引き起こし、患者のQOLに深刻な影響を与える。歯の再生に対するreverse geneticなアプローチとして本課題では、6本以上の多数歯欠損が家族性にみられ、非症候群性に発症するケース（Familial oligodontia）の遺伝子解析を行ってきた。
遺伝子解析の結果、この家系においてFamilial oligodontiaを示す3名に、動物実験より歯の発生における機能が既に報告されている転写因子PAX9に、フレームシフト型の遺伝子変異（321_322insG）を同定した。この変異は様々な種間で保存され、DNA 結合能を持つpaired domainに存在した。

この家系内でFamilial oligodontiaを伴わない方からもDNA試料を提供いただき、遺伝子解析を行った結果、321_322insGは見られなかった。

321_322insGの変異遺伝子機能をin vitroで解析した。この変異遺伝子をCOS-7に遺伝子導入した結果、野生型タンパクと異なり、321_322insGは分解されやすく、タンパクの安定性に劣ることが示唆された。

口唇裂発症時におけるエピジェネティックな変化

Epigenetic changes in cleft lip pathogenesis

口唇裂・口蓋裂は、高頻度（1/600人）にみられる先天異常疾患であり、他に先天的な異常を持たない非症候群性のものが大半である。非症候群性の口唇裂・口蓋裂は、遺伝要因および環境要因との相互作用によって生じるものと考えられている。近年、環境要因によるエピジェネティックな変化が、がん化を引き起こしているという報告が多数されている。しかしながら、口唇裂・口蓋裂を発症する際の環境要因によるエピジェネティックな変化についての報告は、ほとんどない。申請者は、ニワトリにレチノイン酸を過剰投与し、口唇裂を発症させるシステムの構築に成功している。本研究では、そのシステムを用い、口唇裂発症時においてのエピジェネティックな変化、特にヒストンメチル化機構について検討することを目的とする。

2010年9月より本格的にセットアップを開始しはじめた。現在、レチノイン酸を過剰投与後48時間のRNAの収集を行っているところである。今後は、ヒストンメチル化酵素の変化をみ、促進もしくは抑制されたヒストンメチル化酵素遺伝子を過剰発現もしくはノックダウンさせ口唇裂が発症するかを検討していく予定である。

先天異常診断エキスパートシステムのための三次元バーチャルフェイスの合成

Evaluation of the three-demensional-virtual-face for diagnosis of congenital anomalies

当分野は国内の矯正歯科で最も多くの先天異常患者を有し、長年蓄積してきたデータを広く社会に発信し、先天異常患者の診断・治療に役立てたいと考え、以前から診断・矯正治療を支援する先天異常診断エキスパートシステムを構築し、仮想外来システムの実現を進めてきた。先天異常疾患の約70%に頭蓋顔面領域の異常を認め、本システムのさらなる発展のためには、顔貌の視覚情報を組み込むことが必須であると考えるが、個人情報保護の観点から公開は極めて困難である。本システムに個人情報保護対策を取り入れた視覚的な頭蓋顔面情報を取り入れるため、先天異常患者の頭蓋顔面領域の三次元情報から、先天異常疾患の特徴を有し、個人として特定できない三次元バーチ

ャルフェイスを作成し、本システムに組み込むことを本研究課題の目的とした。3Dデジタイザを用いて、先天異常疾患の複数患者の三次元顔データの計測を行い、所定のデータ形式に変換後、顔画像へのワイヤーフレームのフィッティングを行い、三次元先天異常バーチャルフェイスを作成した。今後はバーチャルフェイスの先天異常疾患としての妥当性の評価を行い、アンケート結果集計・解析し、バーチャルフェイスの個人としての異同評価を行い、総合判定とする。先天異常バーチャルフェイスの種類の加増の後、診断エキスパートシステムへのバーチャルフェイスの導入、E-learningへ登用し、情報の発信・普及につとめ、患者のQOLの向上につとめる。

ヒト脳機能の咀嚼運動制御の解明:脳機能画像と咀嚼筋活動・咬合力との同時計測の試み

Human brain function of masticatory motor control; Simultaneous functional MRI-electromyographic/ bite force measurement.

先天異常症例は、頭蓋顎顔面領域に特徴的な表現型を呈する場合が多く、広範囲な口腔機能の障害を合併する。末梢の機能障害が中枢に与える影響については、神経科学分野においては数多く研究されている。しかしながら、顎顔面口腔領域の末梢機能障害、例えば咀嚼運動の機能障害などが高次中枢に与える影響に関する研究は、先天異常症例のみならず健常者においても皆無である。

咀嚼に限らず運動制御における大脳皮質の役割を調べるためには、その反応が何に起因するかを特定するため、運動条件を規定して研究を行うことが必須である。非侵襲的に脳機能計測を行う機能的磁気共鳴画像法（functional magnetic resonance imaging:fMRI）を用いた、大脳皮質の運動制御機構に関する先行研究は多数存在し、なかでも手指に関するものは数多く、それらは必ず測定中発揮した握力や筋活動量の測定を行っている。一方、咀嚼運動時におけるヒト大脳皮質活動部位に関してfMRIを用いて調べた先行研究はわずかに存在するが、これらの研究は咀嚼運動中の咬合力や咀嚼筋活動の測定を行っていない。すなわち、規定された一定の条件下でデータを採得していないため変動するパラメータが多く、結果の解釈に主観的要素が介入することが問題点である。

そこで本研究の目的は、第一にfMRI-筋電図の同時計測を用いた、健常者における歯のタッピング時の脳活動の同定、第二に咀嚼運動障害を呈する先天異常症例における歯のタッピング時の脳活動の同定である。

健常者においては、前歯部および臼歯部におけるタッピング時の脳活動部位は、大部分は共通の領域が活動していた。しかしながら、前歯部におけるタッピング時の方が、臼歯部におけるタッピング時より強く活動している領域が存在した。本研究より、臼歯部と比較し前歯部のタッピング時は、より広範囲の脳活動が必要であることが示唆された。

MR画像上への歯冠部の描出および構音運動評価時のMRI動画への応用

Tooth visualization in MRI and its application in MRI movie for the evaluation of articulatory movements

子音の中でも、特に歯音/s/および/t/を発音する際には、歯が重要な役割を担う。近年、発音時の構音器官の評価には、非侵襲的かつ放射線被曝を伴わない磁気共鳴画像法による動画撮像法（MRI動画）が用いられているが、通常の撮像法では画像上に歯が描出されないという欠点があり、この問題を克服するためいくつかの改良法が考案されてきた。しかしながら、種々のアーチファクトにより歯冠形状を正確に再現するには至っていなかった。そこで本研究では、第一に、MRI動画像上で歯冠を精度よく描出する方法の開発に取り組んだ。第二に、歯冠を描出したMRI動画像上で、複数のパラメータを用いて構音器官運動の解析を行った。まず、上下顎切歯部周囲に空隙を有するシーネに寒天状のクエン酸鉄アンモニウムを築盛し、仰臥位にて撮像を行った。その結果、この手法を用いることによりMR画像上に歯冠形状を正確に描出することが可能となった。さらに、得られた歯冠部の画像を、symphysis形態を参照してMRI動画像上に重ね合わせることにより、摩擦音/s/と破裂音/t/発音時の構音器官運動の差異、および口腔内前方部の経時的な形態変化の解析が可能となった。以上のことから、今回開発した歯冠部の描出法が、不正咬合者における発音の機能評価に応用できる可能性が示唆された。

fMRIおよびMRI動画法を用いた口蓋裂言語の脳および末梢機能解析

Brain and peripheral functional analysis of cleft speech using fMRI and MRI movie

口唇口蓋裂（CLP）患者における構音障害は口蓋裂言語と呼ばれている。口蓋裂言語の有無とCLPの有無との関連を知る目的で機能的磁気共鳴画像法（fMRI）およびMRI動画法（MRI movie）を用いて、軟口蓋破裂音（/k/）発音（内言語および外言語）時における脳賦活パタンと末梢構音器官運動を解析した。被験者は、健常成人10名と術後成人口唇口蓋裂患者3名（片側性1名およ

び両側性2名、うち両側性の1名のみ軟口蓋音に構音障害あり）であった。その結果、fMRI実験からは、内言語発音時には、CLPの有無にかかわらず運動前野が賦活した。外言語発音時には、健常者ならびに構音障害を有しないCLP患者においては運動前野、一次運動野および小脳が賦活したが、構音障害を有するCLP患者においては後帯状回が賦活した。一方、MRI movie実験からは、外言語発音時の舌形状は、健常者および構音障害を有しないCLP患者では類似していたが、構音障害を有するCLP患者ではほとんど変化しなかった。これらの結果から、発音時において脳賦活パタンおよび末梢構音器官運動は、構音障害の有無に依存し相互に関連していることが示唆された。

口唇閉鎖不全に対する筋機能療法の効果：マルチモダリティ解析

Effect of muscle function therapy on lips imperfect close:Multimodality analysis.

口唇閉鎖不全を伴う、上下顎骨の前後的・垂直的位置関係の不調和が著しい不正咬合においては、矯正歯科治療単独での咬合の改善や顔貌の調和を図ることが困難である。このような場合に併用される筋機能療法のエビデンスには不明な点が多い。そこで、「口唇閉鎖不全患者における口輪筋収縮訓練に伴う口唇圧、口唇血流量および口輪筋筋活動の経時的変化における相互関連を探り、顎態および歯列に与える影響を解明する」ことを本研究の具体的な目的として遂行する。本研究では、口輪筋収縮訓練時に上顎前歯部における口唇圧を超小型圧センサを用いて測定することが可能な装置の実用化を図る。次に、開発した装置を用いたデータ採得中に、口唇血流量および口輪筋筋活動を同時計測を可能な環境を整える。その装置を用いて、健常者群（対照群）、口唇閉鎖不全患者群（実験群）の2群をそれぞれ2グループに分け、2種類の異なる口輪筋収縮訓練課題(低負荷・長時間課題および高負荷・短時間課題)を行い、その効果に関する機能的評価を行うとともに、顎態および歯列の形態計測による形態的評価を行う。この過程で、対照群と実験群を横断的比較するとともに、実験群において課題の持続効果を縦断的に比較する。

側性臼歯部交叉咬合を有する成人骨格性下顎前突症患者における下顎蝶番軸の評価

Mandibular hinge axis in skeletal class III posterior unilateral crossbite patients.

不正咬合は、口腔衛生上の障害あるいは社会心理的障害を誘発するのみでなく、幼少期においては顎顔面頭蓋の正常な成長発育と機能の獲得を、青年期以降においては顎顔面口腔領域が関与する咀嚼や発音など様々な機能の円滑な遂行を、それぞれ阻害する要因となることから、歯科矯正治療の目的の一つとして機能的咬合を獲得することが挙げられている1。言うまでもなく、正常な咬合とは形態的（静的）観点からのみでなく機能的（動的）観点からも考慮されるべきものである。しかし、不正咬合が顎顔面形態にいかなる影響を与え、その結果としていかなる顎口腔機能異常が惹起されるかに関しては不明な点が多い。そこで、「下顎蝶番運動回転軸の3次元的な位置の定量的評価法を確立した上で、骨格性下顎前突症患者における片側性臼歯部反対咬合（posterior unilateral crossbite:PUXB）が顎顔面形態および下顎運動に与える影響について評価する」ことを本研究の具体的目的として遂行する。

下顎側方偏位症例における大臼歯の頬舌的位置および角度と口腔内圧の関連

Association between intraoral pressure and molar position and inclination in subjects with facial asymmetry.

上下顎骨の前後的、垂直的あるいは水平的な位置関係の不調和が著しい骨格性不正咬合においては、矯正治療単独での咬合の改善や顔貌の調和を図ることが困難である。このような場合には、外科的矯正治療が併用されることになる。外科的矯正治療においては、顔貌における審美性の改善、上下顎の位置関係および咬合の改善による個性正常咬合の確立、生理的な口腔機能の回復、心理的障害の排除と社会適応性の向上などを目標とする。以上の治療目標の達成および確立された咬合の維持には、歯や歯列を取り巻く口腔周囲の機能的安定が不可欠である。そこで、「顔面非対称患者における安静時口腔内圧と下顎の側方偏位との関連を解析する」ことを本研究の具体的な目的として遂行する。

歯槽骨延長部への歯の移動に高気圧酸素が与える影響

The effects of hyperbaric oxygen to tooth movement into the regenerated area after distraction osteogenesis.

近年骨延長によって生じた新生骨への歯の移動に関する報告は散見されるものの、口唇口蓋裂患者を想定した上顎骨に対して評価した基礎的報告はまだない。一方、骨延長術に高気圧酸素を適用させると延長部位における血流量の増加・骨化促進・末梢循環の増加による血管新生が確認されており、延長部位での新生骨の有意な形成が報告されている。しかし歯の移動に対しての高気圧酸

素療法に関する報告はほとんど認められないのが現状である。そこで、本研究の目的は骨延長によって新生した骨内に歯の移動を行った際の高気圧酸素の影響を移動歯の歯根周囲の骨改造様相において組織学的・放射線学的に解析を加えることとした。

10匹のビーグル犬を用い、上顎左側切歯3本相当部に顎裂を想定した10mmの人為的骨欠損を作成し、その骨欠損部位に向かい1mm/日の割合で10日間骨延長を行い、骨延長終了後第二前臼歯を骨延長部位に向かって牽引した。20日間2.5ATAで高気圧酸素に曝露した5匹を高気圧酸素群とし、屠殺後、移動歯の近心根・遠心根それぞれの近心側（牽引側）・遠心側（圧迫側）において骨密度解析、骨組織形態計測法による構造計測を行った。また、有意差検定はMann-Whitney U-testを行った。

骨密度解析から新生骨内に移動された遠心根の近心側において高気圧酸素群の骨密度が有意に高かった。また、同部位では骨形態計測からも高気圧酸素群では新生骨の骨梁間隙・骨梁数・血管数において有意に高い値を示した。今回得られた骨密度・骨梁幅・血管数の有意な差は、高気圧酸素適用下で骨延長部位への歯の移動を行うことにより、新生骨内の牽引側において血管新生が促進された結果と考えられた。

骨延長により新生した骨内に歯の移動を行う際に高気圧酸素を用いることで、移動歯の牽引側では骨形成が促進される可能性が示唆された。

イヌ顎裂モデルを用いた上顎歯槽骨延長術後の歯髄血流量及び硬組織変化の観察

Observation of Pupal Blood Flow and Bone Mineralization after Alveolar Distraction Osteogenesis in a Canine Cleft Model.

【目的】顎顔面領域の形態異常に対する治療として広く用いられている骨延長術は、口唇口蓋裂患者においても、顎裂閉鎖治療の選択肢の一つとして近年試みられている。しかし、骨延長後の回復には長期間を要すため、より確実で普遍性の高いプロトコールの確立が望まれているが、総骨延長量が回復速度に及ぼす影響を検討した報告はない。本研究は、上顎歯槽部骨延長量と骨延長部位の歯髄血流量及び骨組織の回復との関連を、検討することを目的とした。【試料及び方法】ビーグル成犬6 頭を用い、上顎左側に顎裂を想定した10 ㎜の上顎歯槽骨欠損を作製した。治癒期間の後、左側上顎歯槽部に骨切りを行い、犬歯を含む移動骨片を作製し、延長装置を装着した。3日間の待機期間後、骨延長を1日1 mm の延長速度で6日間延長を行った群（3頭:6 mm延長群）、及び同様に10日間延長を行った群（3頭:10 mm延長群）とした。計測及び観察項目は、移動骨片内における犬歯歯髄血流動態の記録、peripheral Quantitative Computed Tomography（ pQCT）による骨密度解析（骨密度、骨塩量、骨面積）、及び骨形態計測法による骨面積、骨梁幅、骨梁数、骨梁間隙の構造計測であった。有意差検定はMann-Whitney U-testを用いた。【結果及び考察】血流動態において、両群とも骨切り直後は血流値の著しい低下を認めたものの、6 mm延長群では有意に早い回復を示した。pQCTによる骨密度解析では、骨密度、骨塩量、骨面積は6 ㎜延長群で有意に高く、骨形態計測からも、延長部位に新生した骨面積、骨梁幅は6 ㎜延長群で有意に高く、骨梁間隙は有意に低い値を認めた。【結論】総骨延長量が新生骨形成や骨延長部周辺組織の回復に影響することが示唆された。

Down症候群患者の歯科臨床的特徴に関する研究

Examination of dental characteristics of Down syndrome patients.

Down症候群（DS）は、21番染色体の過剰により低身長や特異的な顔貌などの外表奇形、心疾患、眼症状など多臓器にわたる異常を呈する先天性疾患として良く知られている。DS患者は不正咬合を呈することも多く、矯正歯科を受診する機会が増えているが、歯科臨床的特徴に関する知見は十分とはいえず歯科矯正治療の指針策定もなされていない。本研究では、当分野を受診したDS患者の初診時資料（側面頭部X線規格写真、パノラマX線写真、歯列模型、顔面写真、口腔内写真）および治療経過に関する資料（診療録、顔面写真、口腔内写真）をもとに歯科臨床的特徴を検討するとともに、歯科矯正治療の評価に関する指標を考案した。これまでに、1）永久歯の先天欠如、2）歯の大きさの異常、3）歯根の異常、4）口蓋の形態、5）頭蓋顔面形態に関する本疾患の特徴が明らかとなり、なかでも小さい下顎角をもつ特有の下顎骨形態が新たに示された。これらはDS患者の不正咬合の成因を理解するのみならず治療方法の選択を行う上でも貴重な情報となりうる。また、これらの特徴に加え、患者および家族の期待等の調査を行い、本疾患患者に対する歯科矯正治療の指針策定への基礎となりうる指標を考案している。

口唇裂・口蓋裂患者に対する骨延長法の適用

Application of distraction osteogensis in patients with cleft lip and palate.

近年、著しい上顎の劣成長を呈する口唇裂・口蓋裂患者に対して骨延長法が適用されている。当分野では、口

唇裂・口蓋裂患者における上顎骨の劣成長に対してLe Fort Ⅰ型骨延長術を、また顎裂の閉鎖や叢生の改善を目的として歯槽骨延長術を適用し、良好な結果を得ている。本研究では骨延長法の適用に関して、臨床および基礎的な多角的見地より検討を行い以下の結果を得た。1）延長に適用する牽引力の測定:創外型延長器の牽引ワイヤーに小型張力計を組み込むことにより、上顎の牽引力を測定し力学的検討を行った結果、延長効率が低い症例において、延長器のアクチベートに伴う牽引力の上昇率が高いことが示唆された。2）硬・軟組織の3次元データの統合:骨延長術前後のCT、歯列模型、および顔面の色彩データ等の3次元情報を解析ソフトウェア（STL-Rugle®, Medic Engineering、京都）を用いて同一座標系に統合することにより、硬・軟組織の変化を評価する手法を構築した。3）顔貌軟組織変化のシミュレーション:Le Fort Ⅰ型骨延長術による顔面軟組織変化と3次元シミュレーションソフト（SimPlant® OMS ver 12、マテリアライズ デンタル ジャパン、千葉）を用いた変化予測と比較した結果、特に鼻形態において両者の不一致を認めた。

上顎骨延長法における牽引力と軟組織変化の同時モニタリングシステムの開発

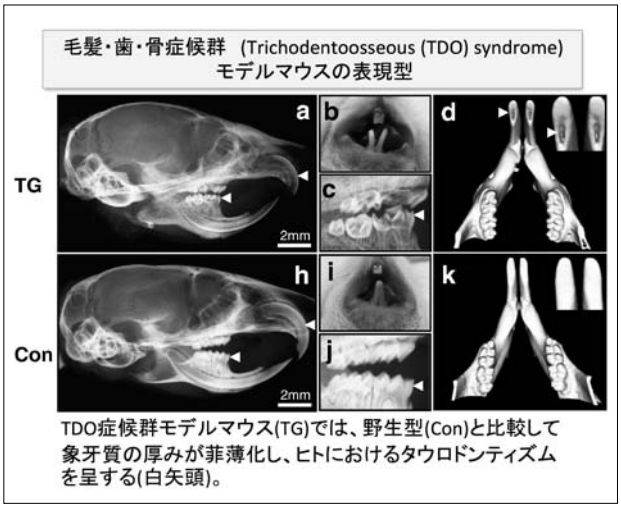
Development of simultaneous monitor system of soft tissue change in distraction osteogenesis for maxilla.

高精度超音波距離測定装置を応用し、骨延長法での上顎骨前方牽引中の顔面軟組織の変化をリアルタイムで計測することにより、牽引量や方向、力の左右差などが軟組織の変化へ及ぼす影響を検討する同時モニタリングシステムを開発する。チェアーサイドで牽引を随時調整することを可能にし、より適切な顔貌を獲得するための延長方向及び量の検討を行う。さらには、現行のエックス線写真での検討を避けることで、患者の被曝量を軽減することを目的としている。

ファントームモデルを用いて上顎骨延長術中のモニタリングに必要な、上顎骨の移動に伴う軟組織変化様相をダイレクトかつリアルタイムに解析・記録するシステムの基礎的な設定や、計測誤差について検討し、次いで、RED Systemにおける上顎牽引力の活性化の量、方向、牽引力の左右差等の要素を変化させた際に、上顎骨にかかる牽引力-軟組織変化の同時モニタリングをシミュレーションする。さらに、測定方法ごとの再現性も比較検討する。その後、ファントームモデルにて確立したマルチモニタリングシステムの臨床応用を行う。実際の上顎骨延長時の軟組織の変化様相の記録と、それに対する影響因子を解析する。計測装置のより臨床的問題点を洗い直し、設定の調整を行う。その計測結果をもとに、張力との相関性を解析し同時モニタリングシステムの確立および、より効果的な上顎骨延長法の検討を行う。

これらの情報を基盤として、上顎骨延長術の適用における、効果的な牽引法の至適化を図り、さらに、後戻りを最小限にするための保定方法や期間を検討する。

2)



TDO症候群モデルマウス(TG)では、野生型(Con)と比較して象牙質の厚みが菲薄化し、ヒトにおけるタウロドンティズムを呈する(白矢頭)。

3）研究内容についての英文要約

Sato K, Haruyama N, Shimizu Y, Hara J, Kawamura H. Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum enhanced by bone marrow stem cell administration in Rabbits. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. July;110（1）:32-40.

Periosteal distraction for osteogenesis is expected to generate new bone without limitations resulting from the width of the osteotomized segment in distraction osteogenesis. However, the bone tissue newly formed by periosteal distraction is generally not suitable for occlusal forces because it is rich in interstitial fatty tissue. Therefore, the development of alternative strategies for periosteal distraction is necessary to induce effective bone formation that will lead to a reduction of the treatment period and to obtain functional bone capable of withstanding occlusal force. This study was performed to investigate whether the administration of mesencymal stem cells（MSCs）promotes bone formation at the gap created by periosteal distraction. Following elevation of the mesh plate placed subperiosteally in rabbit parietal bones, rabbit MSCs were administered into the gap. Controls received phosphate-buffered saline. The MSC administrated group showed significantly increased volume, height, bone mineral density,

and bone mineral content in newly formed bone tissues at the gaps compared with the control group (P <.05), which was examined by microcomputed tomography. Histological analysis revealed that the newly formed bone tissues showed both type I collagen and osteocalcin expression in the MSC-administration group. MSC administration may be useful to induce osteogenesis at sites of periosteal distraction.

Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Dev Biol. (in press).
Fibroblast growth factors (FGF) are pluripotent growth factors that play pivotal roles in the development of various organs. During mandibular organogenesis, Meckel's cartilage, teeth, and mandibular bone differentiate under the control of various FGF. In the present study, we evaluated the role of FGF10 in rat mandibular chondrogenesis and morphogenesis using mandibular organ culture and mandibular cell micromass culture systems. The overexpression of Fgf10 induced by the electroporation of an FGF10 expression vector not only altered the size and shape of Meckel's cartilage, but also upregulated the expression of the cartilage characteristic genes Col2a1 and Sox9 in a mandibular organ culture system. Meckel's cartilage was deformed, and its size was increased when Fgf10 was overexpressed in the lateral area of the mandible. Meanwhile, no effect was found when Fgf10 was overexpressed in the medial portion. In the mandibular cell micromass culture, recombinant FGF10 treatment enhanced chondrogenic differentiation and endogenous ERK (extracellular signal-regulated kinase) phosphorylation in cells derived from the lateral area of the mandible. On the other hand, FGF10 did not have significant effects on mandibular cell proliferation. These results indicate that FGF10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis by controlling the cell differentiation in the lateral area of the mandibular process in rats.

Ma D, Zhang R, Rios HF, Haruyama N, Sun Y, Xie Y, Kulkarni AB, Qin C, Feng JQ. A novel role of Periostin in postnatal tooth formation and mineralization. J Biol Chem (in press).
Periostin plays multiple functions during development. Our previous work showed critical roles of this disulfide-linked cell adhesion protein in maintenance of periodontium integrity in response to occlusal load. In this study we attempted to address whether this mechanical response molecule played direct roles in postnatal tooth development. Our key findings are 1) periostin is expressed in subodontoblasts, and odontoblasts; and the periostin-null incisor displayed massive increases in dentin formation after mastication; 2) periostin is also expressed in the ameloblast cells, and an enamel defect is identified in both the adult-null incisor and molar; 3) deletion of periostin leads to changes in expression profiles of many non-collagenous protein such as DSPP, DMP1, BSP and OPN in incisor dentin; 4) the removal of the biting force leads to reduction of mineralization, which is partially prevented in periostin-null mice; and 6) both in vitro and in vivo data revealed direct regulation of periostin by TGF-beta1 in dentin formation. In conclusion, periostin plays direct roles in controlling postnatal tooth formation, which is required for the integrity of both enamel and dentin.

Choi SJ, Song IS, Feng JQ, Gao T, Haruyama N, Gautam P, Robey PG, Hart TC. Mutant DLX3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. Dev Biol. Aug 15;344 (2) :682-92.
Tricho-dento-osseous (TDO) syndrome is an autosomal dominant disorder characterized by abnormalities in the thickness and density of bones and teeth. A 4-bp deletion mutation in the Distal-Less 3 (DLX3) gene is etiologic for most cases of TDO. To investigate the in vivo role of mutant DLX3 (MT-DLX3) on dentin development, we generated transgenic (TG) mice expressing MT-DLX3 driven by a mouse 2.3 Col1A1 promoter. Dentin defects were radiographically evident in MT-DLX3 TG mice and consistent with clinical characteristics in patients with TDO. High-resolution radiography, microCT, and SEM revealed a reduced zone of mineralized dentin with anomalies in the number and organization of dentinal tubules in MT-DLX3 TG mice. Histological studies demonstrated that the decreased dentin was accompanied by altered odontoblast cytology that included disruption of odontoblast polarization and reduced numbers of odontoblasts. TUNEL assays and increased expression levels of caspase-3 indicated enhanced odontoblast apoptosis. Expression of TBC1D19 colocalized with DLX3 expression in odontoblasts, and MT-DLX3 significantly reduced expression of the TBC1D19 gene. TBC1D19 functions in cell polarity and decreased TBC1D19 expression may contribute to the observed disruption of odontoblast polarity and apoptosis. These data indicate that MT-DLX3 acts to disrupt odontoblast cytodifferentiation, resulting in decreased dentin and taurodontism.

Jun-ichi Takada, Takashi Ono, Jun J Miyamato, Toshiaki Yokota, Keiji Moriyama. Association between intraoral pressure and molar position and inclination in subjects with facial asymmetry.
Eur J Orthod. (in press)
Although it has been suggested that an imbalance in buccolingual pressure may play a role in dental compensation of the molars and asymmetry in the dental

arch of the mandible in subjects with facial asymmetry, it is still unclear whether buccolingual pressure is associated with this phenomenon. Thus, the purpose of this study was to test the null hypothesis that there were no differences in cheek and tongue pressures between the shifted and non-shifted sides in 12 subjects with facial asymmetry that was defined to have 4 mm or more deviation of the midline in the mandibular incisors on a posteroanterior cephalogram. The resting buccolingual pressure on the bilateral mandibular first molars was simultaneously measured using four miniature pressure sensors. Moreover, a posteroanterior cephalometric radiograph was used to determine the buccolingual positions and the inclination of the mandibular first molars. The present findings did support the null hypothesis. The imbalance in buccolingual pressure in subjects with facial asymmetry appears to be related to dental compensation of the molars and asymmetry in the mandibular arch.

Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Application of MRI movie to observation of articulatory movement during a fricative /s/ and a plosive /t/:Tooth visualization in MRI. Angle Orthod. (in press).
Objective: To use an accurate method of tooth visualization in magnetic resonance imaging (MRI) movie for the observation of spatio-temporal relationships among articulators. Materials and Methods: The subjects were two volunteers. Each subject repeated a vowel-consonant-vowel syllable (ie, /asa/; /ata/), and the run was measured using a gradient echo sequence. A custom-made clear retainer filled with the jelly form of ferric ammonium citrate was then fit onto the dental arch, and a T1-weighted turbo-spin-echo sequence was taken. Landmarks were used for superimposition of the incisor boundary onto sequential images of MRI movie. Tracings were conducted to observe the spatio-temporal relationships among articulators. Results: The incisor boundary was clearly visible in the magnetic resonance images. After superimposition, the contact distance of the tongue to palate/incisor was found to be longer during /t/-articulation than during /s/-articulation. There were prominent differences in images with and without tooth superimposition in the front oral cavity. Conclusions: The method could distinctly extract a tooth boundary in MRI. Detailed configurational relationships between the tongue and tooth were observed during the production of a fricative and a plosive in MRI movie using this method.

A Mongolian patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia with a novel P121S variant in EDARADD. Suda N, Bazar A, Bold O, Jigjid B, Garidkhuu A, Ganburged G, Moriyama K. Orthod Craniofac Res. 13 (2) :114-7, 2010.
Hypohidrotic ectodermal dysplasia is a genetic disorder characterized by diminished or a lack of sweating, congenital missing teeth, and sparse or an absence of hair. Three genes, EDA, EDAR, and EDARADD, all related to tumor necrosis factor (TNF) signaling, have been reported as responsible genes for this disorder. DNA analysis of EDA, EDAR, and EDARADD was performed on a Mongolian patient by polymerase chain reaction-direct sequencing. The 5-year-old Mongolian individual had no erupted deciduous or permanent teeth. A panoramic radiograph showed only one tooth in the right mandible. His hair and eyebrows were sparse, but he did not show short stature. He showed diminished sweating, but the nails of his fingers and toes were normal. Based on these conditions, he was diagnosed with hypohidrotic ectodermal dysplasia. There was no gene mutation of EDA or EDAR. A novel heterozygous variant (P121S; c.361C>T) was identified in the death domain of EDARADD (NM_080738). No other member of his family was affected, and this variant was not identified in his parents or maternal grandparents. This study reports an individual affected with hypohidrotic ectodermal dysplasia with a novel heterozygous P121S variant in the death domain of EDARADD.

The function and regulation of TBX22 in avian frontonasal morphogenesis. Higashihori N, Buchtova M, Richman JM. Dev Dyn. 239 (2) :458-473, 2010.
We focus on the regulation and function of TBX22, a causative gene for X-linked cleft palate (OMIM 303400) and d ynamically expressed in frontonasal mass. Growth factors such as FGFs and BMPs are crucial for facial development. Exogenous FGF signaling induces and BMP signaling inhibits TBX22 expression. To determine the effect of TBX22, we used retroviruses to locally increased expression level only in frontonasal mass. TBX22 retrovirus decreased proliferation, reduced expression of MSX2 and DLX5 and caused cleft lip. Our data suggest that genetic or environmental insults could lead to a gain-of-function of TBX22 and predispose an individual to cleft lip.

The effects of hyperbaric oxygen on tooth movement into the regenerated area after distraction osteogenesis. Inokuchi T, Kawamoto T, Aoki K, Aoki A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Shibayama M, Mano Y, Ohya K, Moriyama K. Cleft Palate Craniofac J. 47 (4) :382-92, 2010.
To analyze the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on regenerated bone in distracted areas by histological and radiological analysis. It was hypothesized the application of HBO to a tooth movement into the distracted area would accelerate ossification and vascularization of newly formed bone in the distracted space.
10 dogs were used. After creating a 10-mm length bone defect, a bony segment was translocated into the defect

area. Following the distraction period, tooth movement was started and the dogs were divided into two groups. 150 days after osteotomy, the distracted area around the moving tooth was evaluated radiologically and histologically. Differences between groups were confirmed by Mann-Whitney rank test.
Trabecular bone density and cortical and subcortical bone area measured by peripheral quantitative computed tomography in the HBO group were significantly higher than those in the control group. Histological observations revealed regenerated bone and blood vessels formation in the tension site of the moving tooth in the HBO group. The regenerated bone structure measured by bone histomorphometry was larger, more active in bone formation in the HBO group.
Applying HBO to tooth movement into a distracted area appears to accelerate ossification and vascularization of regenerated bone in the distracted area.

Amount of bone lengthening affects blood flow recovery and bone mineralization after distraction osteogenesis in a canine cleft palate model. Aoki A, Kawamoto T, Aoki K, Inokuchi T, Kudoh A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Ohya K, Moriyama K. Cleft Palate Craniofac J. 47（3）:303-13, 2010.

Distraction osteogenesis has been widely used to the craniofacial region and even applied to alveolar bones to reduce the cleft width of cleft patients. However, there have been no reports on the limitations to the total amount of lengthening that can be accomplished by distraction osteogenesis Therefore, we investigated how different extents of distraction osteogenesis affect the healing process using a canine cleft palate model. For six beagle dogs, a bony segment including the canine was prepared and translocated into 10-mm bone defect area, imitating a cleft, at a rate of 1 mm / day for six or ten days, resulting in two groups（6- and 10-mm groups）. Canine pulpal blood flow was monitored for 100 days with Doppler flowmetry. Then, the animals were sacrificed and the regenerated bone area was evaluated using peripheral quantitative computed tomography（pQCT）and histological process. Pulpal blood flow recovered to the original levels significantly earlier in the 6-mm group. It was showed by pQCT and histological evaluation that the amount of regenerated bone was significantly higher in the 6-mm group than in the 10-mm group. We revealed that amount of bone lengthening affects healing progress.

Gli3Xt-J/Xt-J mice exhibit lambdoid suture craniosynostosis which results from altered osteoprogenitor proliferation and differentiation. Rice DP, Connor EC, Veltmaat JM, Lana-Elola E, Veistinen L, Tanimoto Y, Bellusci S, Rice R. Hum Mol Genet. 19（17）:3457-67, 2010.

Gli3 is a zinc-finger transcription factor whose activity is dependent on the level of hedgehog（Hh）ligand. Hh signaling has key roles during endochondral ossification; however, its role in intramembranous ossification is still unclear. In this study, we show that Gli3 performs a dual role in regulating both osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation during intramembranous ossification. We discovered that Gli3Xt-J/Xt-J mice, which represent a Gli3-null allele, exhibit craniosynostosis of the lambdoid sutures and that this is accompanied by increased osteoprogenitor proliferation and differentiation. These cellular changes are preceded by ectopic expression of the Hh receptor Patched1 and reduced expression of the transcription factor Twist1 in the sutural mesenchyme. We found that Runx2 expression in the lambdoid suture was altered in a pattern complimentary to that of Twist1. We show that FGF2 will induce Twist1, normalize osteoprogenitor proliferation and differentiation and rescue the lambdoid suture synostosis in Gli3Xt-J/Xt-J mice. Taken together, we define a novel role for Gli3 in osteoblast development; we describe the first mouse model of lambdoid suture craniosynostosis and show how craniosynostosis can be rescued in this model.

Non-syndromic Oligodontia with a Novel Mutation of PAX9. Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. J Dent Res.（in press）.

Agenesis of the permanent teeth is a congenital anomaly that is frequently seen in humans. Oligodontia is a severe type of tooth agenesis involving 6 or more congenitally missing teeth, excluding the third molars. Previous studies have indicated that mutations in the homeobox gene MSX1, paired domain transcription factor PAX9, and EDA are associated with non-syndromic oligodontia. This study reports a Japanese family（eight of 14 family members affected）with nonsyndromic oligodontia who preferentially lacked molar teeth. In this family, a novel frameshift mutation（321_322insG）was identified in the paired domain of PAX9. The frameshift mutation caused altered amino acids in the paired domain and premature termination of translation by 26 amino acids. When transfected into COS-7 cells, the mRNA expression of 321_322insG PAX9 was comparable with that of wild-type PAX9. However, the mRNA of 321_322insG PAX9 was more unstable than that of wild-type PAX9. This mRNA instability caused a marked decrease in protein production, as evaluated by Western blot analysis and immunostaining. These findings suggest that the 321_322insG mutation causes insufficient function of PAX9 protein and haploinsufficiency as a genetic model of familial non-syndromic oligodontia with a PAX9 mutation.

Association between positional changes in laboratory values and severity in subjects with obstructive sleep apnea syndrome. Tamura R, Ono T, Sato M, Hasegawa M, Moriyama K, Araki K. J Med Dent Sci. 57 (2) :147-54, 2010.

NTRODUCTION: The aim of the study was to investigate the association between the difference (defined as the remainder, Rm) in laboratory values determined in the upright and supine positions and the severity of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). MATERIALS AND METHODS: Thirty-three Japanese male subjects with OSAS [apnea/hypopnea index (AHI: the number of apneas and hypopneas per hour) > or =5] underwent cephalometric analysis and measurements of nasal resistance in the upright and supine positions. Several parameters in a dental model and physical features were also analyzed. RESULTS: Significant associations of the logarithmic AHI, with neck depth, Rm for the facial axis, and the minimum airway behind the tongue in the supine position were found in multiple linear regression analysis. CONCLUSION: Our results suggest that neck depth, Rm for the facial axis and the minimum airway behind the tongue in the supine position may be determinants of the severity of OSAS.

Suda N, Hattori M, Kosaki K, Banshodani A, Kozai K, Tanimoto K, Moriyama K. Correlation between genotype and supernumerary tooth formation in cleidocranial dysplasia. Orthod Craniofac Res. 13 (4) :197-202, 2010.

Cleidocranial dysplasia is a genetic disorder characterized by hypoplasia or aplasia of the clavicles, patent fontanelles, and a short stature. Supernumerary teeth and delayed eruption and impaction of permanent teeth are frequently associated with CCD. Our previous study reported wide intrafamilial variation in supernumerary tooth formation associated with a mutation in the RUNT-domain of RUNX2, suggesting a low correlation between the genotype and supernumerary tooth formation. Gene mutational analysis of nine Japanese individuals with CCD was performed. Dental and skeletal characteristics were examined based on patient examinations and radiographs. Four different gene mutations, including one novel mutation in RUNX2 gene, were identified. Among them, four individuals had the R225Q mutation, three siblings had the P224S mutation, and the other two individuals had different frame-shift mutations. Wide variations in supernumerary tooth formation were observed in individuals with identical gene mutations, and discordance was seen between monozygotic twins. Asymmetric supernumerary tooth formation was noted in five out of the nine individuals. Individuals with identical gene mutations showed a wide variation in the supernumerary tooth formation. Not only the genotype but also environmental factors and a complex system including epigenetics and copy number variation might regulate supernumerary tooth formation in CCD.

Dilated capillaries, disorganized collagen fibers and differential gene expression in periodontal ligaments of hypomorphic fibrillin-1 mice. Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Cell Tissue Res. 341 (3) :381-95, 2010.

The periodontal ligaments (PDLs) are composed of collagen and elastic system fibers, blood vessels, nerves, and various types of cells. Elastic system fibers are generally formed by elastin and microfibrils, but PDLs are mainly composed of the latter. Compared with the collagen fibers to support teeth, little is known about the role of elastic system fibers in PDLs. To clarify their role, we examined PDLs of mice under-expressing fibrillin-1 (mgR mice). A close association between the elastic system fibers and the capillaries was noted in WT, homozygous and heterozygous mgR mice. Interestingly, capillaries in PDLs of homozygous mice were dilated or enlarged compared with those of WT mice. A comparable level of type I collagen, which is the major collagen in PDLs, was expressed in PDL-cells of mice with three genotypes. However, multi-oriented collagen fiber bundles with a thinner appearance were noted in homozygous mice, whereas well-organized collagen fiber bundles were seen in WT mice. Moreover, there was a marked decrease in periostin expression, which is known to regulate the fibrillogenesis and crosslinking of collagen. These observations suggest that the microfibrillar protein, fibrillin-1, is indispensable for normal tissue architecture and gene expression of PDLs.

A case of ring chromosome 18 syndrome treated with a combinedorthodontic-prosthodontic approach. Ono T, Okuma M, Hamada T, Motohashi N, Moriyama K. Cleft Palate Craniofac J. 47 (2) :201-10, 2010.

OBJECTIVE: The aim of this study was to report the case of a Japanese subject with ring chromosome 18 syndrome. A cephalometric analysis was performed, and the treatment procedure is described. DESIGN: Lateral and posteroanterior cephalograms were compared with Japanese norms. Dental anomalies were evaluated by a model analysis. The outcome of orthodontic-prosthodontic treatment was evaluated by comparing cephalograms during the course of treatment. RESULTS: The cephalometric analysis showed a reduction in the cranial base length and cranial width, midfacial depth, and height and width. Comparison of lateral cephalograms at age 16 years 6 months and 22 years 4 months showed late growth of the mandible. The model analysis showed that all of the teeth, except for the mandibular canine, were small. CONCLUSIONS: Characteristic craniofacial and dental anomalies were clarified. Successful oral rehabilitation was achieved by combined orthodontic-prosthodontic treatment.

Comparison of the efficiency of two types of intraoral splints in the RED system for maxillary distraction osteogenesis. Ishizaki T, Baba Y, Suzuki S, Dio H, Yoneyama T, Moriyama K. Orthod Waves 69（3）:102-9, 2010.

This study was conducted to compare the ratio of maxillary advancement to the amount of activation achieved by distraction osteogenesis（DOG）using a rigid external distraction system with two different types of intraoral splints and to evaluate the applicability of a new type of splint. The mechanical deformation and the distraction efficiency of two types of intraoral splints, Type 1 and Type 2, were evaluated. The Type 1 was a conventionally used intraoral splint. Type 2 was a reinforced, custom-made splint composed of twin-labial arches made of 0.060-in. orthodontic wires. Type 2 splint demonstrated significantly higher strength than Type 1 in a tensile test. Distraction efficiency for Type 1 and Type 2 was 31.6% and 51.0%, respectively, demonstrating significantly higher efficiency for Type 2. On the other hand, the amount of relapse during the 1-year follow-up period did not show significant difference between two groups. The distraction efficiency was affected by the types of intraoral splints used and maxillary distraction could be effectively performed using the reinforced intraoral splint without impairing the stability after DOG.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

昨年度に整備したGCOEの事業に携わる他の事業推進者や成育医療センターの藤原武男先生との連携をさらに強化するとともに、今年度から、国際医療研究センターの丸岡豊先生と連携することで、さらに疾患に関わる情報を幅広く得られる基盤を確立した。

B（研究教育環境）

当分野では疾患に即した研究グループ分けが行われており、各グループにおいて、その疾患の原因の解明、検査診断や治療法の改良を目的とした研究が行われている。各大学院生は各研究グループに所属しており、そこで定期的にミーティングを行うなど、グループを基盤とした教育体制の充実化を図っている。また大学院生を含めた新人教育の一環として、先天性疾患をテーマにあげ、疾患の成因から臨床的な側面を含めた幅広い内容を求めた発表を課している。

C（人材確保）

本年度、大学院生が5人新たに加わり、各々GCOEのテーマである歯と骨の疾患の分子病態成立のメカニズムの解明を目指した研究だけでなく、当分野の特色である疾患を有する患者の咬合機能の回復のための治療法の開発にも携わっている。

D（人材育成）

GCOEプログラムでは、シャペロン制度やスーパースチューデント制度を創設して、若手研究者の人材の育成に取り組んでいるが、当分野において、本年度4名の大学院生がこの制度を利用している研究に携わっている。当分野の特色である臨床研究と基礎研究の橋渡しが出来る幅広い視野を持った研究者の育成が期待される。

E（国際化）

積極的に海外の学会発表や学術誌に投稿し、成果を発表した。さらに、タイ、ホンジュラスならびに中国とさまざまな国からの留学生を受け入れている。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

GCOEのテーマである歯と骨の疾患の分子病態成立のメカニズムを明らかにするには、ヒトから得られる情報を多角的に集積することが非常に大切であると思われる。そこで昨年度に引き続き、成育医療センターと連携するとともに、今年度から国際医療研究センターとも連携することで、さらに多くの疾患に関わる情報を幅広く得られる基盤を確立した。

6）英文原著論文

◎Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Application of MRI movie to observation of articulatory movement during a fricative /s/ and a plosive /t/:Tooth visualization in MRI. Angle Orthod.（in press）.

◎Suda N, Ogawa T, Kojima T, Saito C, Moriyama K. Non-syndromic oligodontia with a novel mutation of PAX9. J Dent Res.（in press）.

◎Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Dev Biol.（in press）.

Ma D, Zhang R, Rios HF, Haruyama N, Sun Y, Xie Y, Kulkarni AB, Qin C, Feng JQ. A novel role of Periostin in postnatal tooth formation and mineralization. J Biol Chem.（in press）.

◎Takada JI, Ono T, Miyamato JJ, Yokota T, Moriyama K. Association between intraoral pressure and molar position and inclination in subjects with facial asymmetry. Eur J Orthod.（in press）.

Kamata H, Suzuki S, Tanaka Y, Tsutsumi Y, Doi H, Nomura N, Hanawa T, Moriyama K. Effects of pH, potential, and deposition time on the durability of collagen electrodeposited to titanium. Materials Transactions,（in press）.

◎Ishizaki T, Baba Y, Suzuki S, Dio H, Yoneyama T, Moriyama K. Comparison of the efficiency of two types of intraoral splints in the RED system for maxillary distraction osteogenesis. Orthod Waves 69（3）:102-9, 2010.

Choi SJ, Song IS, Feng JQ, Gao T, Haruyama N, Gautam P, Robey PG, Hart TC. Mutant DLX3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. Dev Biol. 344（2）:682-92, 2010.

Rice DP, Connor EC, Veltmaat JM, Lana-Elola E, Veistinen L, Tanimoto Y, Bellusci S, Rice R. Gli3Xt-J/Xt-J mice exhibit lambdoid suture craniosynostosis which results from altered osteoprogenitor proliferation and differentiation. Hum Mol Genet. 19（17）:3457-67, 2010.

◎Sato K, Haruyama N, Shimizu Y, Hara J, Kawamura H. Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum enhanced by bone marrow stem cell administration in Rabbits. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 110（1）:32-40, 2010.

◎Suda N, Hattori M, Kosaki K, Banshodani A, Kozai K, Tanimoto K, Moriyama K. Correlation between genotype and supernumerary tooth formation in cleidocranial dysplasia. Orthod Craniofac Res. 13（4）:197-202, 2010.

◎Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Dilated capillaries, disorganized collagen fibers and differential gene expression in periodontal ligaments of hypomorphic fibrillin-1 mice. Cell Tissue Res. 341（3）:381-95, 2010.

Tamura R, Ono T, Sato M, Hasegawa M, Moriyama K, Araki K. Association between positional changes in laboratory values and severity in subjects with obstructive sleep apnea syndrome. J Med Dent Sci. 57（2）:147-54, 2010.

◎Suda N, Bazar A, Bold O, Jigjid B, Garidkhuu A, Ganburged G, Moriyama K. A Mongolian patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia with a novel P121S variant in EDARADD. Orthod Craniofac Res. 13（2）:114-7, 2010.

◎Inokuchi T, Kawamoto T, Aoki K, Aoki A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Shibayama M, Mano Y, Ohya K, Moriyama K. The effects of hyperbaric oxygen on tooth movement into the regenerated area after distraction osteogenesis. Cleft Palate Craniofac J. 47（4）:382-92, 2010.

◎Aoki A, Kawamoto T, Aoki K, Inokuchi T, Kudoh A, Nagahama K, Baba Y, Suzuki S, Ohya K, Moriyama K. Amount of bone lengthening affects blood flow recovery and bone mineralization after distraction osteogenesis in a canine cleft palate model. Cleft Palate Craniofac J. 47（3）:303-13, 2010.

7）総説ならびに著書

英文

◎Haruyama N, Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Gibson CW, Kulkarni AB. Chapter 3, Lessons from the amelogenin knockout mice. In: Amelogenins: multifaceted proteins for dental and bone formation and repair. 2010, pp. 25-31. M. Goldberg Ed., Bentham Science Publishers Ltd.

和文

医師・歯科医師のための口腔診療必携. 監修　高戸毅. 編集　森山啓司ら 金原出版株式会社. 2010.

森山啓司: 臨床家のための矯正YEAR BOOK’10『世界の矯正歯科の潮流　第7回国際矯正歯科会議のプログラム委員を務めて』
Quintessence, 43-46, 2010.

森山啓司: 骨粗鬆症Q&A（第30回） 骨とメカニカルストレスの関連について教えてください（Q&A）. 骨粗鬆症治療9巻1号 82-85, 2010.

小川卓也、森山啓司: 歯と歯肉の病気, 不正咬合, 家庭医学大全科, 6訂版. 法研, 1623-1636, 2010.

8）平成22年度までの自己評価

研究面においては、基礎研究の成果と臨床的要素を融合した研究を遂行することが可能であったとともに、公衆衛生の分野にも裾野を広げることで、疾患に関連した情報を幅広く得られる基盤を確立することができた。さらに、各々の大学院生が積極的に海外を含めた学会等で発表するとともに、発表した学術大会で受賞している大学院生も多数見られ、教育面でも充実化が図られた。

9）和文原著論文

本田綾、馬場祥行、片岡恵一、鈴木聖一、森田圭一、小村健、森山啓司．Le Fort I型骨切り術により幅の広い顎裂を閉鎖した成人片側性口唇口蓋裂の1症例．日本顎変形症学会雑誌 20巻3号 258-265, 2010.

鈴木剛史、川元龍夫、山田大輔、北村良平、富永直子、福岡裕樹、森山啓司．東京医科歯科大学顎顔面矯正学分野における30年間の顎変形症治療に関する検討．日本顎変形症学会雑誌 20巻3号220-227, 2010.

北村良平、川元龍夫、宮本順、樺沢勇司、小村健、黒原一人、天笠光雄、森山啓司．馬蹄形骨切り併用Le Fort I型骨切り術と下顎枝矢状分割術を施行した骨格性下顎前突症例の術後の顎態変化について．日本顎変形症学会雑誌20巻3号 211-219, 2010.

大久保和美、須佐美隆史、森山啓司．下顎枝矢状分割術を用いた外科的矯正治療を行った顔面非対称症例．東京矯正歯科学会雑誌20巻1号 6-10, 2010.

本田綾、馬場祥行、山田大輔、鈴木聖一、大林尚人、倉林亨、森山啓司．Le Fort I型上顎骨延長術を適用した口唇口蓋裂症例の軟組織変化に対するCT画像を用いた三次元的検討．日本シミュレーション外科学会会誌 18巻1号 11-17, 2010.

10）学会発表（英文）

◎Honda A, Baba Y, Yamada D, Ogawa T, Suzuki S, Ohbayashi N, Kurabayashi T, Moriyama K. Three-dimensional analysis of soft tissue changes using computerized tomography in patients with cleft lip and palate treated by Le Fort I distraction osteogenesis. 7th Asian Pacific Cleft Lip and Palate/Craniofacial Congress, oral presentation, Perth, March, 13-16, 2011.

◎Ahiko N, Baba Y, Okamura E, Tsuji M, Ogawa T, Ohkuma M, Suda N, Moriyama K. Observation of Systemic and Orofacial Anomalies in Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting（EEC）Syndrome. 7th Asian Pacific Cleft Lip and Palate/Craniofacial Congress, poster presentation, Perth, March, 13-16, 2011.

◎Watanabe C, Morita M, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Noda M. Cnot3, a novel critical regulator of a mRNA stability, is involved in the maintenance of the bone mass and the bone structure in senile osteoporosis model. 31st Annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research, poster presentation, Toronto, October 15-19, 2010.

Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. The evaluation of articulatory movements during /s/ and /t/ in MRI movie with tooth visualization. 69th Annual meeting of the Japanese Orthodontic Society, oral presentation, poster presentation, Yokohama, September 27-29, 2010.

◎Suda N, Ganburged G, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Fibrillin-1 is indispensable for normal collagen fiber architecture and gene expression in periodontal ligament. 10th TMD Tooth Morphogeneis and Differentiation, oral presentation, Berlin, September 1-4, 2010.

◎Suzuki H, Suda N, Shiga M, Tanimoto Y, Nakamura M, Iseki S, Moriyama K. Osteoblastic differentiation of transgenic mice overexpressing Apert syndrome-type mutant FGFR2 and its soluble form. 10th TMD Tooth Morphogeneis and Differentiation, poster presentation, Berlin, September 1-4, 2010.

◎Baba Y, Suda N, Inoue MS, Tsuji M, Moriyama K. De novo rod and ring mosaicism in del（18q）syndrome. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, Jul 14-17, 2010.

◎Tsuji M, Baba Y, Kataoka K, Honda A, Suzuki S, Moriyama K. Measurement of traction force in distraction osteogenesis for CLP. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010.

◎Sato M, Baba Y, Inokuchi T, Honda A, Kataoka K, Tsuji M, Suzuki S, Moriyama K. Clinico-statistical analysis of congenitally missing permanent teeth in CLP. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010.

◎Miyamoto JJ, Hanakawa T, Shitara H, Kanaya K, Dei A, Takada J, Ono T, Kurabayashi T, Honda M, Moriyama K. Cortical activity during tooth tapping tasks: A preliminary study. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010.

◎Inokuchi T, Kawamoto T, Aoki A, Itoh Y, Tominaga N, Baba Y, Suzuki S. Ohya K, Moriyama K. Effects of

Hyperbaric Oxygen on Tooth Movement after Distraction Osteogenesis. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010.

◎Ng IW, Ono T, Inoue-Arai MS, Honda E, Kurabayashi T, Moriyama K. Tooth Visualization in MRI Movie for Evaluation of Articulatory Movements. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010

◎Ganburged G, Suda N, Saito M, Yamazaki Y, Isokawa K, Moriyama K. Microfibril is Essential for Normal Development of Periodontal Ligaments（PDLs）. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, poster presentation, Barcelona, July 14-17, 2010.

◎Tsuji K, Negishi-Koga T, Maeda T, P Paolo Pandolfi, Moriyama K, Takayanagi H. Transcriptional repressor, LRF regulates NFATc1 expression in osteoclastogenesis. 3rd international conference on osteoimmunology, Santorini, Greece, June 20-25, 2010.

◎Miyamoto JJ, Hanakawa T, Ono T, Kurabayashi T, Moriyama K. Simultaneous functional MRI-electromyographic measurement during tooth tapping. 86th Congress of the European Orthodontic Society, poster presentation, Slovenia, June 15-19, 2010.

Hanawa.T, Kamata. H, Choi. J, Oya. K, Tsutsumi. Y, Doi. H, Nomura. N, Moriyama.K. Electrodeposition of Collagen on Titanium to Add Hard and Soft Tissue Compatibilities, Society for Biomaterials 2010 ANNUAL MEETING&EXPOSITION, Seattle, April 21,2010.

Kataoka K, Baba Y, Honda A, Suzuki S, Moriyama K. Integration of tree-dimensional hard/soft tissue data in cleft lip palate patients treated by orthognathic surgery. The 2nd International Conference on Orthodontic Treatment, poster presentation. Hiroshima, April 3-4, 2010.

11）学会発表（和文）

鈴木尋之、須田直人、志賀百年、小林起穂、井関祥子、森山啓司． Apert症候群型変異FGFR2とその可溶性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウス由来骨芽細胞の分化形質. 第75回口腔病学会学術大会、東京、2010年12月3-4日.

鎌田秀樹、鈴木聖一、堤祐介、土居壽、野村直之、森山啓司、塙隆夫. Ti表面コラーゲン電着固定化層の耐久性に及ぼすpH,電位,時間の影響、第32回 日本バイオマテリアル学会大会、広島、2010年11月29-30日.

比留間瞳、鎌田秀樹、堤祐介、土居壽、野村直之、塙隆夫、鈴木嘉昭. 電着による金属表面へのコラーゲンの固定化と生体適合性評価、第32回 日本バイオマテリアル学会大会、広島、2010年11月29-30日.

岡本奈那、林深、本田尚三、小栗泉、長谷川知子、小崎里華、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、森山啓司、稲澤譲治. 新規症候群の可能性のある10p12.1-p11.23欠失の2症例. 第55回日本人類遺伝学会、大宮、平成22年10月27－30日.

高田潤一、小野卓史、宮本順、横田俊明、出井彩乃、疋田理奈、森山啓司. 片側性臼歯部交叉咬合を有する成人骨格性下顎前突症患者における下顎蝶番軸の評価. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

金谷和宏、鈴木聖一、宮本順、川元龍夫、森山啓司. 球形樹脂微粒子含有ガムを用いた咀嚼効率の研究（第2報）. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

出井彩乃、小野卓史、宮本順、高田潤一、森山啓司. 口腔周囲筋における血流量および筋活動量に関する検討. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

鈴木尋之、須田直人、志賀百年、谷本幸穂、中村 正孝、井関 祥子、森山 啓司. Apert症候群型の変異FGFR2とその可溶性変異体を過剰発現するトランスジェニックマウスの解析. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

志賀百年、馬場祥行、金沢英恵、徳山英二郎、金子剛、森山啓司、金田一純子. ステント付き口蓋床による治療を試みた両側性口唇口蓋裂児の3症例. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

ガンブルゲド・ガンジャルガル、須田直人、森山啓司.マルファン症候群の歯周疾患モデルにおけるAngiotensin II receptor blocker（Telmisartan）の薬理効果. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

富永直子、川元龍夫、小佐野仁志、草間幹夫、井口隆人、伊藤洋介、森山啓司. 上顎歯槽骨延長部位への歯の移植に高気圧酸素治療が与える影響. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

山田大輔、鈴木聖一、鎌田秀樹、土居壽、塙隆夫、森山啓司. 矯正用線材としてのTi-Nb-Ta-Zr合金の力学的特性について（第1報）. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

大宅彩、保田裕子、渡辺千穂、大隈瑞恵、小川卓也、辻美千子、須田直人、森山啓司. 当分野を受診したDown症候群患者の歯科臨床的特徴について-永久歯の異常に関する検討. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

池田倫世、伊藤洋介、川久保直美、大隈瑞恵、小川卓也、辻美千子、須田直人、森山啓司. 当分野を受診したDown症候群患者の歯科臨床的特徴について-頭蓋顎顔面形態に関する検討. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

三上智彦、森田淳平、大隈瑞恵、小川卓也、辻美千子、須田直人、森山啓司. 当分野を受診したDown症候群患者に対する矯正歯科的アプローチ. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

松田りえ、堀内信也、川上恵実、内田玲子、細木秀彦、森山啓司、田中栄二. 先天性リンパ管腫を伴う下顎側方偏位の一治療例. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

渡邉佳一郎、黒田晋吾、井上雅秀、木島毅、鳥飼勝行、森山啓司、田中栄二. 変則型Le Fort II型骨切りを用いて仮骨延長を行ったCrouzon症候群の一症例. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

三谷薫子、春山直人、五十嵐薫. アメロジェニンスプライスアイソフォームの軟骨細胞分化に与える影響. 第69回日本矯正歯科学会、横浜、平成22年9月27－29日.

須田直人、小川卓也、小島拓、森山啓司. PAX9遺伝子に新規フレームシフト型変異を有する先天性多数歯欠損家系の解析. 第52回歯科基礎医学会学術大会、東京、平成22年9月20－22日.

山田大輔、川元龍夫、東堀紀尚、鈴木剛史、鈴木聖一、森山啓司. 上下顎移動術を適用した骨格性下顎前突症例の鼻形態変化に対するCT画像を用いた三次元的検討. 第44回日本口腔科学会関東地方部会、埼玉、平成22年9月4日.

小川卓也、辻美千子、森山啓司. 長期にわたって矯正歯科的管理を行った小舌症の一例. 第69回東京矯正歯科学会、東京、平成22年7月15日.

志賀百年、馬場祥行、金沢英恵、勝俣由紀、徳山英二郎、今野恵理、金子剛、森山啓司、金田一純子. 国立成育医療センターにおける口唇・口蓋裂児に対するNAM治療. 第50回日本先天異常学会、兵庫、平成22年7月8-10日.

樺沢勇司、佐藤昌、菊池剛、佐藤百合子、樋口佑輔、松本佳奈子、高橋由貴子、小川卓也、森山啓司、小村健. 上下顎移動術を行った鎖骨頭蓋異形成症の1例. 第20回日本顎変形症学会総会、札幌、平成22年6月15-16日.

須田直人、富永直子、新中康史、天笠光雄、森山啓司. 下顎臼歯部歯槽骨切り術にLe Fort I型骨切り術と下顎枝状分割術を施行した下顎狭窄歯列を伴う非対称症例. 第20回日本顎変形症学会総会、札幌、平成22年6月15-16日.

山田大輔、川元龍夫、福岡裕樹、北村良平、富永直子、鈴木剛史、鈴木聖一、森山啓司. Le Fort I型骨切り術を併用し上下顎移動術を行った骨格性下顎前突症例の鼻形態変化に対する三次元的検討. 第20回日本顎変形症学会総会、札幌、平成22年6月15-16日.

木島毅、鳥飼勝行、長西裕樹、錦織なぎ、大木健作、渡邉佳一郎、田中栄二、森山啓司、山本真弓、島崎一夫、米満郁男、大村進. 梨状孔縁骨切・骨延長により中顔面の形態改善を図ったsyndromic craniosynostosisの1例. 第20回日本顎変形症学会総会、札幌、平成22年6月15-16日.

辻美千子、森山啓司. 矯正歯科を受診したBeckwith-Wiedemann症候群の顎顔面領域の特徴と治療としての対応. 第34回遺伝カウンセリング学会. 東京、平成22年

5月28-29日.

阿彦希、須田直人、辻美千子、小川卓也、大隈瑞恵、福岡裕樹、岡村絵里花、鈴木一史、馬場祥行、森山啓司. EEC症候群患者における全身および顎顔面・口腔領域の異常に関する検討. 第34回日本口蓋裂学会総会、東京、平成22年5月27-28日.

佐藤麻緒、馬場祥行、井口隆人、本田綾、片岡恵一、辻美千子、鈴木聖一、森山啓司. 口唇裂・口蓋裂症例の永久歯の先天性欠如に関する臨床統計学的検討. 第34回日本口蓋裂学会総会、東京、平成22年5月27-28日.

森田圭一、佐藤豊、馬場祥行、飯田敏朗、壬生美智子、福山英治、立川敬子、吉増秀實、天笠光雄、森山啓司、谷口尚、小村健.両側唇顎口蓋裂の二次症例に対するチーム医療 両側唇顎口蓋裂の二次症例に対する東京医科歯科大学歯学部附属病院CLP合同カンファレンスによる対応. 第34回日本口蓋裂学会総会、東京、平成22年5月27-28日.

Higashihori N, Buchtová M, Richman JM.A role of TBX2 2 during avian frontonasal prominence morphogenesis. 第34回日本口蓋裂学会総会、東京、平成22年5月27-28日.

塙隆夫、鎌田秀樹、森山啓司、大家 渓、堤祐介、土居壽、野村直之. コラーゲン電着による金属への軟組織接着性付与、第59回JSMS Annual Meetings、北海道、2010年5月22日

12）受賞

Tsuji K, Negishi-Koga T, Maeda T, P Paolo Pandolfi, Moriyama K, Takayanagi H. Transcriptional repressor, LRF regulates NFATc1 expression in osteoclastogenesis. 3rd international conference on osteoimmunology, Travel Award, Santorini, Greece, June 20-25, 2010.

出井彩乃、小野卓史、宮本順、高田潤一、森山啓司. 口腔周囲筋における血流量および筋活動量に関する検討. 第69回日本矯正歯科学会・優秀発表賞、横浜、平成22年9月27－29日.

佐藤麻緒、馬場祥行、井口隆人、本田綾、片岡恵一、辻美千子、鈴木聖一、森山啓司. 口唇裂・口蓋裂症例の永久歯の先天性欠如に関する臨床統計学的検討. 第34回日本口蓋裂学会総会・優秀ポスター賞、東京、平成22年5月27-28日.

13）外部資金の獲得状況

1. 科学研究費補助金、萌芽
   研究題目:コラーゲン電着固定化によるチタンの組織適合性向上
   代表:森山啓司
   期間:平成21年-平成23年
   研究費総額:300万円
2. 厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業
   研究題目:進行性下顎頭吸収の診断基準策定とその治療に関する研究
   分担:森山啓司
   期間:平成22年-平成24年
   研究費総額:100万円
3. 科学研究費補助金、基盤C
   研究題目:骨延長統合モニタリングシステムの開発
   代表:鈴木聖一
   期間:平成21年-平成24年
   研究費総額:370万円
4. 科学研究費補助金、基盤B（海外学術）
   研究題目:アジアにおける先天性多数歯欠損に関する遺伝学的調査
   代表:須田直人
   期間:平成19年-平成23年
   研究費総額:1290万円
5. 科学研究費補助金、基盤B
   研究題目:ヒトiPS細胞を用いた歯根再生への画期的アプローチ
   代表:須田直人
   期間:平成21年-平成24年
   研究費総額:1410万円
6. 科学研究費補助金、基盤C
   研究題目:上顎歯槽部骨延長への歯の移動と移植に高気圧酸素療法が与える影響
   代表:川元龍夫
   期間:平成21年-平成24年
   研究費総額:350万円
7. 科学研究費補助金、若手B　22792040
   研究題目:象牙質細胞外マトリクスによる骨代謝制御

医薬の新規開発
代表:春山直人
期間:平成22年-24年
研究費総額:310万円

8. 科学研究費補助金、若手B
研究題目:眼・顔面・心臓・歯症候群における歯根形成を制御する遺伝子BCORの役割の解明
代表:小川卓也
期間:平成22年-平成25年
研究費総額:300万円

9. 科学研究費補助金、若手B
研究題目:上皮間葉転換に関わる転写因子発現のエピジェネティクス制御機構
代表:大隈瑞恵
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:260万円

10. 科学研究費補助金、若手B
研究題目:口唇閉鎖不全に対する筋機能療法の効果:マルチモダリティ解析
代表:高田潤一
期間:平成22年-平成25年
研究費総額:300万円

11. 科学研究費補助金、若手B
研究題目:上顎骨延長法における牽引力と軟組織変化の同時モニタリングシステムの開発
代表:南綾
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:150万円

12. 科学研究費補助金、特別研究員奨励費
研究題目:非侵襲的脳機能画像法を用いた咀嚼運動時のヒト脳機能の解明
代表:宮本順
期間:平成20年-平成23年
研究費総額:240万円

13. 科学研究費補助金、研究活動スタート支援
研究題目:口唇裂発症時におけるエピジェネティックな変化
代表:東堀 紀尚
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:229万

14）特別講演、招待講演

Keiji Moriyama: Accuracy of orthodontic TAD implantation guided by surgical stent based on cone beam images. The 2011 Angle East meeting, March 24-27, 2011, Rhode Island.

Keiji Moriyama: Mechanodynamics and biological responses in distraction osteogenesis of the maxiila, 22th Annual meeting of Taiwan Association of Orthodontics, December 10, 2010, Taipei.

Keiji Moriyama: Lessons from congenital anomalies at chairside and bench, 7th IOC, Australia, February 8, 2010, Sydney.

Keiji Moriyama: Current and Future of Orthodontic Treatment for Craniofacial Anomalies, Department of Orthodontics, School of Stomatology, April 14, 2010, Peking University.

Keiji Moriyama: Temporomandibular joint function in subjects with cleft lip and palate treated with maxillary distraction osteogenesis, Department of Oral Radiology, School of Stomatology, April 16, 2010, Peking University.

春山直人: 毛髪・歯・骨症候群（Trichodentoosseous（TDO）syndrome）の歯と骨の表現型発現メカニズムの解析． 第3回顎顔面の器官発生・形態形成研究会, 平成22年10月30-31日． 軽井沢

春山直人: Amelogenins: Multi-functional enamel matrix proteins. メインシンポジウム「エナメルタンパク「アメロジェニン」の新規機能について－from bench to clinics and from clinics to bench－」. 第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 平成22年9月21-22日. 東京

森山啓司:「顎変形症と現代社会」琉球大学公開講座,平成22年7月31日. 那覇

森山啓司:「我々が行っている顎変形症に対する外科的矯正治療」教室セミナー, 琉球大学医学部口腔外科学講座, 平成22年7月30日． 那覇

森山啓司:「先天異常に起因する不正咬合」愛知学院大学歯学部講義,平成22年7月3日.名古屋

森山啓司:「先天異常に対する矯正歯科からのアプローチ」岡山大学歯学部講義,平成22年10月20日.岡山

森山啓司:「一般開業医が知っておきたい矯正の知識」杉並区歯科医師会,平成22年10月3日.東京

本田綾、馬場祥行、片岡恵一、鈴木聖一、森山啓司. 上顎骨延長法を適応した口唇裂・口蓋裂症例の長期経過に関する検討. 第20回日本顎変形症学会総会, 平成22年6月16日.　札幌

富永直子、鈴木剛史、山田大輔、北村良平、福岡裕樹、川元龍夫、森山啓司. 下顎枝状分割術を施行した開咬を伴う骨格性下顎前突症例における術後安定性について. 第20回日本顎変形症学会総会, 平成22年6月15日. 札幌

15）主催学会

第15回日本顔学会大会フォーラム顔学2010、2010年10月23日－24日、東京

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには◯印）のリスト

准教授: 鈴木聖一
講　師: 須田直人（9月まで）、川元龍夫（7月から）
助　教: 川元龍夫（6月まで）、辻美千子、小川卓也、東堀紀尚、宮本順
GCOE特任講師:春山直人
硬組織疾患ゲノムセンター特任助教:小林起穂
大学院: 鎌田英樹、◯鈴木尋之、Ng Inn Wo、岡本奈那、◯辻香織、疋田理奈、◯松本力、伊藤洋介、川久保直美、◯森田淳平、駒崎裕子、渡辺千穂、上園将慶、丸岡亮、吉崎正子、Carolina Duarte、Paveenarat Aukkarasongsup

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など

本年度は、昨年度に整備したGCOE事業推進者との研究体制をさらに強化することができた。各研究分野でトップを走る他の事業推進者と連携して研究を進めていくことができる環境は、いち早く最先端の情報を得られることでき、今後の研究の展開に大変有意義であると思われた。

Journal of Dental Research
http://jdr.sagepub.com/

Non-syndromic Oligodontiaw with a Novel Mutation of *PAX9*

N. Suda, T. Ogawa, T. Kojima, C. Saito and K. Moriyama

J DENT RES published online 22 November 2010
DOI: 10.1177/0022034510390042

The online version of this article can be found at:
http://jdr.sagepub.com/content/early/2010/11/20/0022034510390042

Published by:
SAGE
http://www.sagepublications.com

On behalf of:
International and American Associations for Dental Research

Additional services and information for *Journal of Dental Research* can be found at:

Email Alerts: http://jdr.sagepub.com/cgi/alerts

Subscriptions: http://jdr.sagepub.com/subscriptions

Reprints: http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav

Permissions: http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

RESEARCH REPORTS
Clinical

N. Suda[1,2]*, T. Ogawa[1,2], T. Kojima[3], C. Saito[3], and K. Moriyama[1,2]

[1]Maxillofacial Orthognathics, Department of Maxillofacial Reconstruction and Function, Division of Maxillofacial/Neck Reconstruction, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1–5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113–8510, Japan; [2]Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo, Japan; and [3]Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan; *corresponding author, n-suda.mort@tmd.ac.jp

J Dent Res X(X):xx-xx, XXXX

Non-syndromic Oligodontia with a Novel Mutation of *PAX9*

ABSTRACT

Agenesis of the permanent teeth is a congenital anomaly that is frequently seen in humans. Oligodontia is a severe type of tooth agenesis involving 6 or more congenitally missing teeth, excluding the third molars. Previous studies have indicated that mutations in the homeobox gene *MSX1*, paired domain transcription factor *PAX9*, and *EDA* are associated with non-syndromic oligodontia. This study reports a Japanese family (eight of 14 family members affected) with non-syndromic oligodontia who preferentially lacked molar teeth. In this family, a novel frameshift mutation (321_322insG) was identified in the paired domain of *PAX9*. The frameshift mutation caused altered amino acids in the paired domain and premature termination of translation by 26 amino acids. When transfected into COS-7 cells, the mRNA expression of 321_322insG *PAX9* was comparable with that of wild-type *PAX9*. However, the mRNA of 321_322insG *PAX9* was more unstable than that of wild-type *PAX9*. This mRNA instability caused a marked decrease in protein production, as evaluated by Western blot analysis and immunostaining. These findings suggest that the 321_322insG mutation causes insufficient function of PAX9 protein and haploinsufficiency as a genetic model of familial non-syndromic oligodontia with a *PAX9* mutation.

KEY WORDS: oligodontia, *PAX9*, tooth, gene mutation, RNA stabilization.

DOI: 10.1177/0022034510390042

Received June 23, 2010; Last revision October 18, 2010; Accepted October 18, 2010

© International & American Associations for Dental Research

INTRODUCTION

Agenesis of the permanent teeth is an anomaly that is frequently seen in humans. The prevalence of agenesis of 1 or 2 teeth (excluding the third molars) is from 1.6% to 9.6% (Symons *et al*., 1993; Vastardis, 2000). Oligodontia is a severe type of tooth agenesis involving 6 or more congenitally missing teeth, excluding the third molars (Schalk-van der Weide *et al*., 1992; Stockton *et al*., 2000). In a study on Danish schoolchildren, 0.16% of the children were found to have oligodontia (Rølling and Poulsen, 2001). To date, 3 genes, namely, the homeobox gene *MSX1*, paired domain transcription factor *PAX9*, and *EDA*, have been associated with non-syndromic oligodontia (Vastardis *et al*., 1996; Stockton *et al*., 2000; Tao *et al*., 2006).

Familial non-syndromic oligodontia associated with *PAX9* mutation preferentially affects molar formation (Stockton *et al*., 2000; Frazier-Bowers *et al*., 2002; Kapadia *et al*., 2006). To date, 10 gene mutations have been identified in the DNA-binding paired domain of *PAX9* (Nieminen, 2009; Wang *et al*., 2009). One is a frameshift mutation (219_220insG) (Stockton *et al*., 2000; Mensah *et al*., 2004), one is a nonsense mutation (A340T) (Nieminen *et al*., 2001), and 8 are point mutations (Das *et al*., 2003; Lammi *et al*., 2003; Mostowska *et al*., 2003; Jumlongras *et al*., 2004; Kapadia *et al*., 2006; Ogawa *et al*., 2006; Wang *et al*., 2009).

In this study, a novel frameshift mutation of *PAX9* (321_322insG) was identified in a Japanese family with non-syndromic oligodontia. The purpose of this study was to clarify the aberrant function of this gene mutation. We hypothesized that this *PAX9* mutation caused abnormal mRNA and/or protein expression.

MATERIALS & METHODS

Family with Oligodontia

The proband was a 37-year-old female (III:3) in a Japanese family with oligodontia treated in Niigata University Hospital (Fig. 1A). IV:1 (an 18-year-old female) was also treated for oligodontia in the hospital, and their panoramic radiographs were used for the diagnosis. Oral examinations and interviews were performed on II:3 and III:2. An interview was performed by phone on I:1, II:5, III:4, and III:5, who lived far from the Dental Hospital of Tokyo Medical and Dental University and Niigata University Hospital. This

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

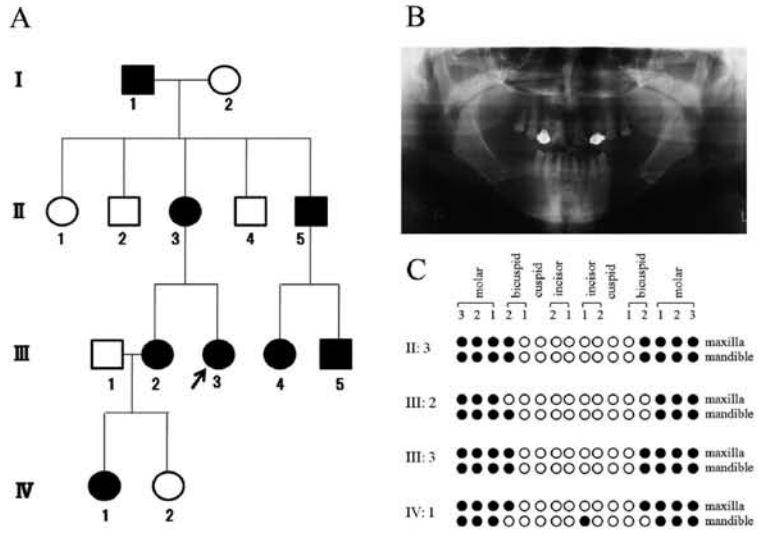


Figure 1. A Japanese family with non-syndrome oligodontia. **(A)** Pedigree of the Japanese family with non-syndromic oligodontia. The arrow indicates the proband. **(B)** Panoramic radiograph of III:3. **(C)** Summary of the permanent tooth agenesis in the present pedigree. Each tooth agenesis is denoted by a black circle.

was carried out by identification of the normal numbers and shapes of permanent teeth of each person. The extraction and loss of any teeth after eruption were carefully queried for each family member. Each individual with more than 6 congenitally missing teeth, excluding the third molars, was diagnosed as having oligodontia for the purposes of this study (Schalk-van der Weide *et al.*, 1992; Stockton *et al.*, 2000). The experimental protocol was approved by the Ethical Review Committee of the Tokyo Medical and Dental University and the Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.

Mutational Analysis

For mutational analysis, we obtained genomic DNA from individuals whose informed consent was obtained. Genomic DNA was isolated from nail samples of II:3, III:2, III:3, IV:1, and IV:2. The isolated DNA was amplified by polymerase chain-reaction in a GeneAmp PCR System 9700 and specific primers for *PAX9* (Das *et al.*, 2003). The amplified products were sequenced with a PRISM® 3100 Genetic Analyzer and a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Plasmid Construct

The human *PAX9* cDNA (NM_006194.2) was subcloned in-frame with a C-terminal Myc-tag downstream of the cytomegalovirus (CMV) promoter into the pReceiver-M09 empty vector (termed EX-NEG; GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). Site-directed mutagenesis was carried out with the QuickChange mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), as previously reported (Wang *et al.*, 2009). The entire coding sequence of the mutant construct was verified by a PRISM® 3100 Genetic Analyzer and a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit.

Transfection of Cultured Cells

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako, Tokyo, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nualle, France). All cultures were maintained in a humidified, 5% CO_2 atmosphere at 37°C. Transient transfection was performed with the Fugene 6 Transfection Reagent (Roche, Basal, Switzerland), according to the manufacturer's instructions.

Western Blot Analysis

COS-7 cells transfected with wild-type or mutant *PAX9* underwent lysis in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 125 mM NaCl, 0.1% Nonident P-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 1 mM each of EDTA (Wako) and phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich), followed by sonication, as described previously (Shiga *et al.*, 2008). Western blot analysis was performed with cell lysates at 12 and 48 hrs after transfection. Briefly, a 20-µg quantity of protein was separated by 10% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred electrophoretically to a Hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK). The membrane was probed with an anti-Myc monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). The bound antibody was detected by ECL plus Western blotting detection reagents (Amersham), according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Transfected COS-7 cells were fixed with methanol for 10 min and stained with the anti-Myc monoclonal antibody. After being washed with PBS, the cells were incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After the washing, fluorescence was observed by fluorescence microscopy (AF6000, Leica, Wetzlar, Germany).

RNA Preparation

COS-7 cells were transfected with wild-type or mutated *PAX9*. At 12 hrs after the transfection, total RNA was isolated from the cells with ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed with TURBO DNA-*free* (Ambion Inc., Austin, TX, USA). cDNA was synthesized from 1 µg of the total RNA with

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Real-time PCR and Examination of mRNA Stability

Each cDNA was used as a template for quantitative analysis of *PAX9* mRNA with a 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems). The real-time PCR amplifications were performed with TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The primers and TaqMan probe used were as follows: forward primer, 5′-GGCATCCGACCGTGTGA-3′, reverse primer, 5′-TCCTGG CAAGATCGAGCC-3′, TaqMan probe, 5′-ATCCTGGCGCGA TAC-3′. These primers and the probe corresponded to the N-terminus of the paired domain and upstream of the 321st nucleotide. The expression of human *PAX9* was normalized by the amplification of eukaryotic 18S rRNA (product number 4331182; Applied Biosystems).

To examine the mRNA stability, we similarly transfected COS-7 cells with wild-type or mutated *PAX9*. At 12 hrs after transfection, 1 μg/mL of actinomycin D (Wako) was added to the culture. Total RNA was isolated from the cells at 3 and 6 hrs after the actinomycin D addition. After treatment with TURBO DNA-*free* and cDNA synthesis with the QuantiTect Reverse Transcription Kit, quantitative analysis of *PAX9* mRNA was carried out in the 7300 Real-time PCR System. The mRNA stability was represented as the *PAX9* mRNA remaining after normalization by eukaryotic 18S rRNA (100% remaining *PAX9* mRNA denoted the value without actinomycin D treatment).

Statistical Evaluations

We used Student's *t* test to examine the differences in the relative expression levels of *PAX9*/18S rRNA and the decay of *PAX9* mRNA following addition of actinomycin D, between wild-type and 321_322insG *PAX9*. The statistical analyses were carried out with StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA). Values of $P < 0.05$ were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

The Family with Non-syndromic Oligodontia

The pedigree of the present family with oligodontia is shown in Fig. 1A. Eight (I:1, II:3, II:5, III:2, III:3, III:4, III:5, and IV:1) of 14 family members had oligodontia. In the regular health examinations, the family members had no medical history of abnormalities in their sweat glands, skin, hair, or nails, indicating the non-syndromic type of oligodontia. A panoramic radiograph of the proband (III:3; 37-year-old female) is shown in Fig. 1B. She had tooth agenesis of the upper and lower second premolars and all molars (agenesis of 12 permanent teeth in total, excluding the third molars) (Figs. 1B, 1C). Based on the oral examinations, interviews, and panoramic radiographs, the positions of the missing permanent teeth in this family are summarized in Fig. 1C. Four members (II:3, III:2, III:3, and IV:1) showed tooth agenesis of the premolars and molars, and the agenesis was also seen in the lower central incisor of IV:1.

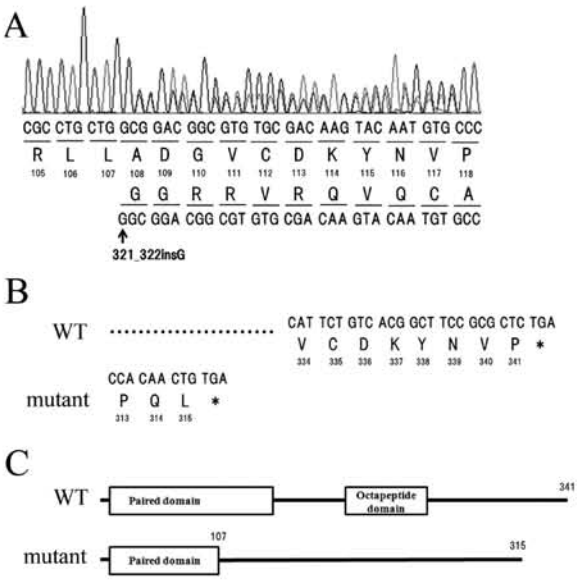


Figure 2. A novel mutation in a Japanese family with non-syndrome oligodontia. **(A)** Nucleotide sequence and amino acid alignment of *PAX9* in affected members (II:3, III:2, III:3, and IV:1) of the pedigree. The small numbers denote the order of the amino acids. The position of the 321_322insG mutation is indicated by the arrow. **(B)** C-termini of wild-type (WT) and 321_322insG (mutant) PAX9. The small numbers denote the order of the amino acids. Each asterisk denotes the terminal codon. **(C)** Constructs of wild-type (WT) and 321_322insG (mutant) PAX9 showing the premature termination of translation by 26 amino acids in the mutant protein. The small numbers denote the order of the amino acids.

DNA Sequence Analysis of the *PAX9* Gene

Since this family preferentially lacked teeth in the molar region, the DNA sequence of *PAX9* was examined in II:3, III:2, III:3, IV:1, and IV:2. II:3, III:2, III:3, and IV:1 had the same heterozygous insertion of G after the 321st nucleotide according to NM_006194.2 (Fig. 2A). This mutation was not seen in IV:2, who was a healthy control without oligodontia. The 321st nucleotide corresponded to an amino acid in the paired domain (Fig. 2B). This mutation caused a heterozygous frameshift mutation, resulting in premature termination of translation by 26 amino acids (Figs. 2B, 2C).

Characteristics of the 321_322insG Mutation in the *PAX9* Gene

Next, we transfected the 321_322insG mutated construct into COS-7 cells to examine the characteristics of the mutant protein. Expression was faintly seen at 12 hrs and clearly seen at 48 hrs after the transfection. A band of the expected size (40 kDa) was seen in the cell lysates of wild-type and mutated *PAX9* transfected COS-7 cells, but not in the lysate of the empty vector-transfected cells (Fig. 3A). The protein level was much lower in the mutated *PAX9*-transfected COS-7 cells than in the wild-type *PAX9*-transfected cells. This finding was also noted in the

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

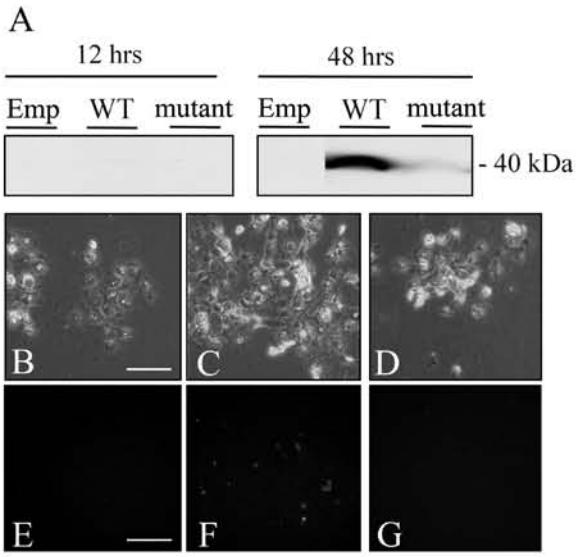


Figure 3. The protein expression of 321_322insG *PAX9*. **(A)** Western blot analysis with an anti-Myc monoclonal antibody. Cell lysates from COS-7 cells transfected with EX-NEG (Emp), wild-type *PAX9* (WT), or 321_322insG *PAX9* (mutant) for 12 or 48 hrs were analyzed. **(B-D)** Phase-contrast microscopic observations of COS-7 cells transfected for EX-NEG (B), wild-type *PAX9* (C), or 321_322insG *PAX9* (D) for 48 hrs. **(E-G)** Immuno-histochemistry with the anti-Myc monoclonal antibody. Fluorescence microscopic images of COS-7 cells transfected with EX-NEG (E), wild-type *PAX9* (F), or 321_322insG *PAX9* (G) for 48 hrs are shown.

immunostaining of COS-7 cells with the same antibody (Figs. 3B-3G). Positive staining was seen in the nuclei of COS-7 cells transfected with wild-type *PAX9* (Figs. 3C, 3F), but was scarcely seen in the COS-7 cells transfected with the mutant construct (Figs. 3D, 3G). Positive staining was not seen in the empty vector-transfected cells (Figs. 3B, 3E).

To clarify the mechanism for the decreased level of the mutant protein, we examined the mRNA expressions of the wild-type and 321_322insG *PAX9*. First, the mRNA expressions were examined by amplification of the N-terminus region of the paired domain. The results showed that the mRNA expression of 321_322insG *PAX9* did not differ significantly from that of wild-type *PAX9* at 12 hrs after transfection (Fig. 4A). Next, the mRNA stabilities of wild-type and 321_322insG *PAX9* were examined. At 12 hrs after transfection, the cells were treated with actinomycin D, an inhibitor of transcription (Fig. 4B). The mRNA levels were decreased for both wild-type and 321_322insG *PAX9* at 3 and 6 hrs after the actinomycin D addition. The mRNA of 321_322insG *PAX9* was significantly more unstable than the mRNA of wild-type P*AX9* during the examined time-course (Fig. 4B).

DISCUSSION

In this study, a novel frameshift mutation of *PAX9* (321_322insG) was identified in a Japanese family with non-syndromic oligodontia.

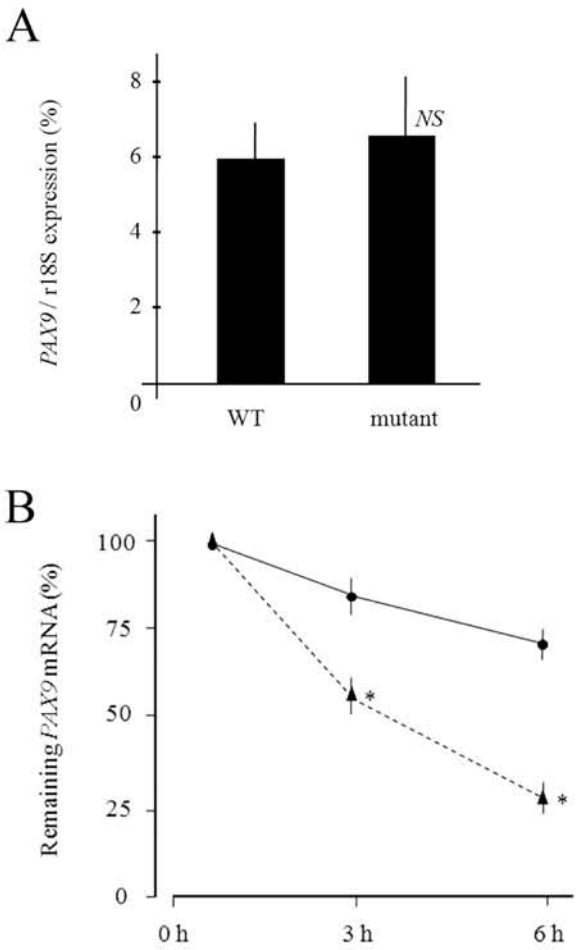


Figure 4. mRNA expression of 321_322insG *PAX9*. **(A)** Relative expression levels of *PAX9*/18S rRNA at 12 hrs after transfection. The expression of *PAX9* mRNA in COS-7 cells transfected with wild-type (WT) or 321_322insG (mutant) *PAX9* is shown. Expression is represented by the percentage (%) of *PAX9* mRNA expression relative to eukaryotic 18S rRNA (18S) expression. All data are expressed as means ± SE (n = 4). *NS*, not significant *vs.* wild-type *PAX9*. **(B)** Decay of *PAX9* mRNA following addition of actinomycin D. The decay of wild-type (solid line) and 321_322insG (dotted line). Each value is represented by the remaining *PAX9* mRNA after normalization by the eukaryotic 18S rRNA (100% remaining *PAX9* mRNA denotes the value without actinomycin D treatment). Data at 0, 3, and 6 hrs after the actinomycin D treatment are shown. All the data are expressed as means ± SE (n = 4). $*P < 0.05$, significant difference *vs.* wild-type *PAX9*.

The family showed permanent tooth agenesis preferentially in the molar region. *In vitro* analyses revealed instability of the mRNA of the mutated *PAX9*, resulting in lower protein production.

The present family had tooth agenesis mainly of the molars. Since I:1, II:5, III:4, and III:5 did not live close to our universities, it was not possible to determine their tooth agenesis directly by oral examination or panoramic radiograph. However, the interview provided us with sufficient information that they had

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

tooth agenesis in the molar region. In addition to the molars, II:3, III:2, III:3, and IV:1 had tooth agenesis of the premolars. This type of tooth agenesis was first reported in a family with a mutation in the paired domain of *PAX9* (Stockton *et al*., 2000). The reported family also showed missing second premolars and mandibular central incisors. Interestingly, tooth agenesis of the mandibular central incisor was also seen in one member of the present family (IV:1). The 321_322insG *PAX9* mutation was identified in this family. Ten different gene mutations have been identified in the paired domain of *PAX9* to date (Nieminen, 2009; Wang *et al*., 2009), but no previous studies have reported the present frameshift mutation.

It has been reported that 219_220insG *Pax9* (frameshift mutation in the paired domain) abrogates translocation of the protein from the cytoplasm to the nucleus (Wang *et al*., 2009). However, the total protein expression (including both the nuclear and cytoplasmic fractions) of this mutated mouse *Pax9* was comparable with that of mouse wild-type *Pax9*. In contrast to this mouse study, the protein expression of the present human mutated *PAX9* was much lower than that of human wild-type *PAX9*, and the mRNA of 321_322insG *PAX9* was significantly more unstable compared with that of the wild-type gene. The results for these mouse and human mutated proteins were obtained by experiments with the same COS-7 cells and mutagenesis kit. Therefore, it is likely that these two frameshift mutations have different gene functions from one another.

Further studies are required to clarify the instability of 321_322insG *PAX9* mRNA. Degradation of mRNA is an important mechanism for controlling gene expression, and eukaryotic mRNAs are primarily degraded by removal of the 3′ poly(A) tail (deadenylation) and cleavage of the 5′ cap structure (decapping) (Mitchell and Tollervey, 2000; Wilusz *et al*., 2001). In mammalian cells, it has been reported that PAN2 and CCR4 are the major poly(A) nucleases active in cytoplasmic deadenylation, and that DCP2-mediated de-capping is required after deadenylation (Yamashita *et al*., 2005). To clarify the mechanism of the mRNA instability, it is essential that we examine the activities of these molecules in the degradation process of the 321_322insG *PAX9* mRNA.

The discovery of one oligodontia family with a deletion encompassing the *PAX9* locus has suggested haploinsufficiency (not a dominant-negative effect) as a cause of non-syndromic oligodontia with mutations of this gene (Das *et al*., 2002). The present study showed that the 321_322insG mutation impaired the mRNA stability of *PAX9*, resulting in lower protein expression. These findings support the model of haploinsufficiency of *PAX9* as a cause of non-syndromic oligodontia.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (19659547, 21390546), and for the Supporting Project for Strategic Research of Nihon University School of Dentistry at Matsudo by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. The authors thank Professor Hayato Ohshima (Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences) for recruiting study participants.

REFERENCES

Das P, Stockton DW, Bauer C, Shaffer LG, D'Souza RN, Wright T, *et al*. (2002). Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet* 110:371-376.

Das P, Hai M, Elcock C, Leal SM, Brown DT, Brook AH, *et al*. (2003). Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet A* 118(A):35-42.

Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, Xue L, Evans B, King T, *et al*. (2002). A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia. *J Dent Res* 81:129-133.

Jumlongras D, Lin JY, Chapra A, Seidman CE, Seidman JG, Maas RL, *et al*. (2004). A novel missense mutation in the paired domain of PAX9 causes non-syndromic oligodontia. *Hum Genet* 114:242-249.

Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D'Souza RN (2006). Molecular characterization of a novel PAX9 missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Eur J Hum Genet* 14:403-409.

Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S, Nieminen P (2003). A missense mutation in PAX9 in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Eur J Hum Genet* 11:866-871.

Mensah JK, Ogawa T, Kapadia H, Cavender AC, D'Souza RN (2004). Functional analysis of a mutation in PAX9 associated with familial tooth agenesis in humans. *J Biol Chem* 279:5924-5933.

Mitchell P, Tollervey D (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 10:193-198.

Mostowska A, Kobielak A, Biedziak B, Trzeciak WH (2003). Novel mutation in the paired box sequence of PAX9 gene in a sporadic form of oligodontia. *Eur J Oral Sci* 111:272-276.

Nieminen P (2009). Genetic basis of tooth agenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312(B):320-342.

Nieminen P, Arte S, Tanner D, Paulin L, Alaluusua S, Thesleff I, *et al*. (2001). Identification of a nonsense mutation in the PAX9 gene in molar oligodontia. *Eur J Hum Genet* 9:743-746.

Ogawa T, Kapadia H, Feng JQ, Raghow R, Peters H, D'Souza RN (2006). Functional consequences of interactions between Pax9 and Msx1 genes in normal and abnormal tooth development. *J Biol Chem* 281:18363-18369.

Rølling S, Poulsen S (2001). Oligodontia in Danish schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 59:111-112.

Schalk-van der Weide Y, Steen WH, Bosman F (1992). Distribution of missing teeth and tooth morphology in patients with oligodontia. *ASDC J Dent Child* 59:133-140.

Shiga M, Saito M, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Kiyono T, *et al*. (2008). Characteristic phenotype of immortalized periodontal cells isolated from a Marfan syndrome type I patient. *Cell Tissue Res* 331: 461-472.

Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI (2000). Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 24: 18-19.

Symons AL, Stritzel F, Stamation J (1993). Anomalies associated with hypodontia of the permanent lateral incisors and second premolar. *J Clin Pediatr Dent* 17:109-111.

Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG, *et al*. (2006). A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet* 51:498-502.

Vastardis H (2000). The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 117:650-656.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE (1996). A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 13:417-421.

Wang Y, Groppe JC, Wu J, Ogawa T, Mues G, D'Souza RN, *et al*. (2009). Pathogenic mechanisms of tooth agenesis linked to paired domain mutations in human *PAX9*. *Hum Mol Genet* 18:2863-2874.

Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:237-246.

Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, *et al*. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12:1054-1063.

Downloaded from jdr.sagepub.com at TOKYO IKASHIKA UNIVERSITY on January 25, 2011

MEMO

整形外科学分野

四宮 謙一

医歯学総合研究科・先端医療開発学系専攻
脊椎・脊髄神経外科学・教授

1）ご研究の課題名

アレンドロネート全身投与がウサギ骨欠損モデルにおいて多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体による骨形成およびその吸収に与える影響

Effects of systemic administration of alendronate on bone formation conducted by porous hydroxyapatite/collagen composite and its absorption in a rabbit bone defect model

近年、骨粗鬆症の治療にビスフォスフォネート（BP）製剤が広く使用されている。一方で、骨欠損部に骨補填剤を移植する機会も増えているが、その一つである多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体（HAp/Col）は骨伝導能を有し、破骨細胞により吸収される。今回我々はBP製剤の一つであるアレンドロネート（ALN）が多孔質HAp/Colによる骨形成とその吸収に及ぼす影響をウサギモデルを用いて評価した。円柱状多孔質HAp/Col（直径6mm、高さ8mm、気孔径100-500mm、気孔率95%）をウサギ大腿骨外顆部に移植した。ALN投与期間により4群に分けた（Control群:ALN投与なし、Pre群:移植前3週間のみALN投与、Post群:移植後ALN投与、Pre+Post群）（ALN投与は週1回7.5μg/kg）。結果、ALN投与によりインプラントの吸収は抑制され、新生骨のmineral densityは12週までALNを投与された群でいずれもcontrol群より低かった。インプラント表面に存在する破骨細胞数は術後3週において新生骨面積に相関した。結論として、骨粗鬆症治療における投与量のALN全身投与は、多孔質HAp/Col移植に伝導された骨組織のmineral densityとリモデリングに影響を及ぼした。

ビタミンEの骨代謝に及ぼす影響に関する研究

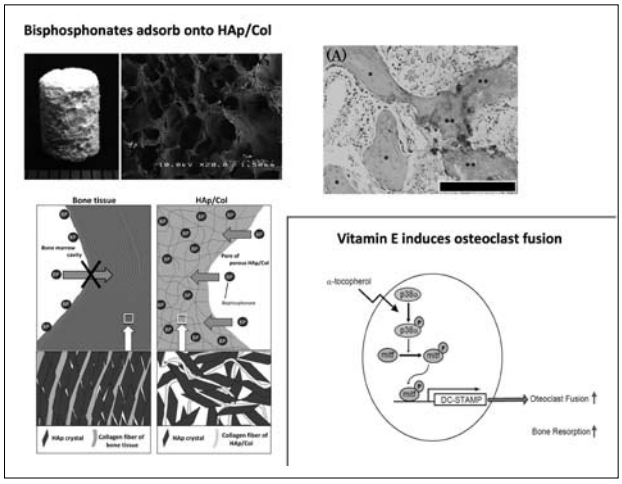
Vitamin E induces osteoclast fusion and decreases bone mass

脂溶性ビタミンであるビタミンEは抗酸化作用を示すと考えられているが、骨代謝に対する影響は明らかにされていない。ビタミンEの異性体のうち、生体内ではα-tocopherolが主に活性を持ち、小腸から吸収されたα-tocopherolは肝臓でα-TTP（tocopherol transfer protein）と結合し末梢組織へ供給される。我々はα-TTP欠損マウスの解析を通して、ビタミンEの骨代謝に対する分子生物学的な作用を明らかにした。

α-TTP欠損マウスは骨吸収減少に伴う骨量増加を示した。一方、骨形成には変化がなかった。野生型マウスから採取した破骨細胞前駆細胞にRANKLを添加し、破骨細胞分化を誘導する際、同時にα-tocopherolを添加すると、破骨細胞の多核化が促進し、骨吸収能が亢進した、さらに、破骨細胞多核化に必須であるDC-STAMPの遺伝子発現が特異的に亢進した。また、破骨細胞前駆細胞でDC-STAMPをノックダウンするとα-tocopherolによる多核化の促進は認められず、同様に、DC-STAMP欠損マウスから採取した破骨細胞前駆細胞を用いた場合、α-tocopherolの添加による多核化の促進は認められなかった。

続いて、食餌中のビタミンEが骨代謝に及ぼす影響を検討するため、野生型マウスに高濃度のα-toocpherolを8週間投与し解析を行った。すると、骨形成には変化がなかったが、骨吸収が亢進し、骨量の減少が認められた。これらの結果から、個体レベルでの検討によりビタミンEはDC-STAMPの発現を通して破骨細胞の多核化を促進し骨吸収を調節することが明らかになった。ビタミンEの摂取過剰が骨粗鬆症を惹起する可能性が示唆された。

2)



3) 研究内容についての英文要約

Recently, several bisphosphonates have become widely used for the treatment of osteoporosis. Porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite is an osteoconductive bone substitute and is resorbed by osteoclasts. The effects of alendronate (ALN), one of the bisphosphonates, on bone formation in porous HAp/Col and resorption by osteoclasts were evaluated using a rabbit model. Porous HAp/Col cylinders (6 mm in diameter and 8 mm in length; 100- to 500- μm pore size; 95% porosity) were inserted into the lateral condyles of the femurs of 72 rabbits. The rabbits were divided into four groups based on the ALN administration period: the "Control" group did not receive ALN treatment, the "Pre" group had ALN treatment for three weeks prior to transplantation, the "Post" group had ALN treatment from after transplantation until euthanasia, and the "Pre+Post" group had continuous ALN treatment from three weeks prior to surgery until euthanasia. All rabbits were injected intravenously with either saline or ALN (7.5 μg/kg) once a week. Each group had 18 rabbits, and 6 rabbits in each group were euthanized at 3, 6, or 12 weeks post-operation. ALN administration suppressed the resorption of the implants, and the mineral densities of newly formed bone in the ALN-treated groups were lower than those in the Control group through 12 weeks post-operation. Interestingly, the number of osteoclasts attached to the implant was correlated with the bone tissue area at three weeks. In conclusion, the systemic administration of ALN at a pharmacological dose suitable for clinical osteoporosis treatment affected the mineral density and remodeling of bone tissue in transplanted porous HAp/Col composites.

Vitamin E, a fat-soluble vitamin, is well known as an antioxidant. Of eight forms of food-derived vitamin E, only α-tocopherol is secreted into the general circulation through the action of α-tocopherol transfer protein (α-TTP) expressed in the liver. Therefore, α-TTP knockout (KO) mice develop severe vitamin E deficiency. To clarify the role of vitamin E in bone metabolism, we analyzed bone phenotype of α-TTPKO mice. At three months of age, α-TTPKO mice showed high bone mass. Histomorphometric analysis revealed that bone resorption of α-TTPKO mice was increased. Addition of α-tocopherol to the culture media during the maturation phase of osteoclastic differentiation significantly induced osteoclast fusion. Molecular analysis revealed that DC-STAMP, essential molecule for osteoclast fusion, was specifically increased by α-tocopherol treatment, while expression of other important molecules for cell fusion was unchanged. Moreover, induction of osteoclast fusion by α-tocopherol was abolished in DC-STAMP knockdown osteoclasts or osteoclasts generated from DC-STAMPKO mice, demonstrating that α-TTP regulates osteoclast fusion through DC-STAMP. Finally, wild type mice fed a high-α-tocopherol diet developed low bone mass phenotype due to increase in bone resorption. Taken together, these results demonstrated that α-tocopherol regulates osteoclast fusion and bone resorption in a DC-STAMP-dependent manner and excessive intake of vitamin E may cause osteoporosis.

4) 本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

- 大学外との連携を図り、また研究環境（設備など）を整備することによって、研究拠点の基礎を立ち上げた（物質材料研究機構、産業技術総合研究所）。
- また、大学内連携を図り、他分野と共同で研究を行った。（生体材料工学研究所・有機材料分野、難治研究所・分子薬理学）
- 企業との連携（オリンパス、HOYA、オリンパス、ストライカー）により、研究設備の充実を図るとともに、基礎と臨床との橋渡し研究領域を充実させた。
- 研究専門部門として寄附講座を運営

B（研究教育環境）

- 週に3回、論文の抄読会や研究報告会を実施することにより、分子生物学、骨・軟骨組織学、骨再生学の研究、教育体制を確立した。
- 科学研究費補助金やその他研究助成金、企業との共同研究により外部資金を得ることによって、研究環境を整備し得た。

C（人材確保）

・寄付講座を開設・運営し、研究に専念できる人材を確保した。

D（人材育成）

・9名（内留学生3名）に対して、骨・軟骨に関する研究教育、指導を行った。
Imperial collegeからの短期留学生を受け入れ、3ヶ月間研究指導を行った。

E（国際化）

・4名の留学生（大学院生3名、外国人特別研究員1名）に研究教育、指導を行った。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

・企業を含む大学内外との連携を強化するなどして、骨・軟骨に関する基礎領域だけでなく、臨床応用を目指した研究にも重点を置いた。
・分野内で研究経過・成果に関するdiscussionを重ねるとともに、外部への研究成果の発表の機会を増やすよう努力した。

6）英文原著論文

◎Sugata Y, Sotome S, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Hirano M, Shinomiya K, Okawa A. Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a rabbit bone defect model. Journal of Bone and Joint Surgery British Edition.（In press）

◎Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen（HAp/Col）and fibroblast growth factor-2（FGF-2）. Journal of orthopaedic research. 2010 May;28（5）:677-86.

◎Yoshii T, Sotome S, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Yamada T, Shinomiya K, Okawa A. Isolating Osteogenic Progenitor Cells From Trabecular Bone For Bone Tissue Engineering. Tissue Engineering Part A. 2010 Mar;16（3）:933-42.

◎Kawasaki Y, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Hirano M, Mochizuki N, Shinomiya K, Okawa A. Effects of gamma-ray irradiation on mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/collagen. Journal of Biomedical and Material Research B Appl Biomater. 2010 Jan;92（1）:161-7.

7）総説ならびに著書

早乙女進一, 四宮謙一, 大川淳 【すべての医師のための骨粗鬆症診療ガイド2010】「骨のバイオマテリアル 人工骨」 綜合臨床 59（4）: 544-547, 2010

大串始, 服部耕治, 牛田多加志, 星和人, 関矢一郎, 早乙女進一, 脇谷滋之, 名井陽, 安達伸生, 加藤幸夫, 河口浩之, 黒田良祐, 木下靱彦, 梅澤明弘, 田中康仁, 山田陽一, 袴塚康治, 山我美佳, 菅原桂, 中島武彦 「臨床研究の活性化と再生医療産業化の促進 骨・関節領域（整形外科、歯科・口腔外科）の実施者からの提言」 再生医療 9（3）: 393-400, 2010

藤田浩二 and 竹田秀,【ニューロペプチド】「骨代謝とニューロペプチド」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 17（1）: 51-56. 2010.

8）特許取得、特許申請

「骨移植片製造装置」発明者:四宮謙一、早乙女進一他、特許番号4545015、特許取得日2010年7月9日

「生体内薬物徐放材料の製造方法」発明者:早乙女進一、四宮謙一他、特許番号4204772、特許取得日2008年10月24日

「多孔質複合材料の製造方法」発明者:早乙女進一、四宮謙一他、国内:特許番号3727059、特許取得日2005年10月7日、アメリカ合衆国:特許番号7163965、特許取得日2007年1月16日

「複合生体材料」発明者:早乙女進一、四宮謙一他、特許番号3770555、特許取得日2006年2月17日 アメリカ合衆国:特許番号7494664、特許取得日2009年2月24日 カナダ:特許番号2467252、特許取得日2008年12月2日

9）平成22年度までの自己評価

研究を遂行する大学院生などの人材が十分確保できなかったため、特に人工骨に関わる研究に滞りが生じた（新しい研究計画があったが、開始できなかった）。しかし、現在進行している研究テーマに関しては順調であり、今後の進展に大きな期待が持てると考えている。

10）学会発表（英文）

◎Koji Fujita, Makiko Iwasaki, Takako Koga, Hiroshi Takayanagi, Kimitaka Takitani, Hiroshi Tamai, Hiroyuki Arai, Hiroshi Ito, Kenichi Shinomiya, Shu Takeda. Vitamin E induces osteoclast fusion and decreases bone mass AmericanSociety for Bone and Mineral Research annual meeting 2010/10/15 トロント　示説

11）学会発表（和文）

1. 藤田浩二、岩崎牧子、古賀貴子、高柳広、瀧谷公隆、玉井浩、新井洋由、宮本健史、伊藤裕、四宮謙一、竹田秀　ビタミンEは破骨細胞融合を促進し骨量減少を引き起こす　第28回日本骨代謝学会学術集会　2010/7/21　大阪
2. 湯浅将人、早乙女進一、菅田祐美、正岡智和、山田剛史、四宮謙一、大川淳　BMPとデキサメサゾン併用による骨形成能に関する検討　第25回日本整形外科学会基礎学術集会　2010/10/14-15
3. 小柳広高、阿江啓介、早乙女進一、前原秀二、菅田祐美、湯浅将人、山田剛史、正岡智和、船内雄生、四宮謙一、大川淳　温熱処理骨と骨髄由来間質細胞導入β-TCPを用いた大型犬の骨欠損モデルにおける再生能　第25回日本整形外科学会基礎学術集会　2010/10/14-15

12）外部資金の獲得状況

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
研究題目:骨粗鬆症椎体骨折に対する低侵襲治療法の開発
代表:四宮　謙一
期間:平成21年-平成24年
研究費総額:平成22年度 ¥12,500,000.-

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究題目:脊柱靭帯骨化症に関する調査研究
分担:大川　淳
期間:平成20年-平成22年
研究費総額:平成22年度¥1,000,000.-

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
研究題目:医療事故にかかわった医療従事者の支援体制に関する研究
分担:大川　淳
期間:平成22年-平成25年
研究費総額:平成22年度¥300,000.-

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
研究題目:骨粗鬆症椎体骨折に対する低侵襲治療法の開発
分担:大川　淳
期間:平成21年-平成24年
研究費総額:平成22年度 ¥2,000,000.-

科学研究費補助金（基盤研究B）
研究題目:骨髄間葉系幹細胞を利用した巨大骨組織再生のための基礎技術の確立
代表:四宮　謙一
期間:平成21年-平成24年
研究費総額:平成22 年度¥4,200,000.-

科学研究費補助金（基盤研究B）
研究題目:医歯学系留学生のためのeラーニングによる医療コミュニケーション学習システムの開発
分担:大川　淳
期間:平成19年度-平成22年度
研究費総額:¥100,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:末梢神経刺激-脊髄誘発磁界測定を用いた完全に非侵襲的脊髄機能診断の開発
代表:川端　茂徳
期間:平成22年-平成24年
研究費総額:平成22年度¥1,200,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:危険因子分析法（HAZOP）に基づいた医療安全演習ソフトウェアの開発
代表:大川　淳
期間:平成21年-平成22年
研究費総額:平成22年度¥300,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:Runx1による軟骨初期分化調節の分子機構の解明と軟骨再生医療への応用
代表:神野　哲也
期間:平成20年度-平成22年度
研究費総額:平成22年度¥1,000,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:靭帯骨化症の分子基盤-Run×3遺伝子欠損

マウスを用いた検討-
代表:阿江　啓介
期間:平成20年度-平成22年度
研究費総額:平成22年度¥1,200,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:マイクロRNAによる骨芽細胞・骨細胞分化調節機構の解明
代表:早乙女　進一
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:平成22年度¥1,000,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:末梢神経損傷に対する低分子Gタンパク質発現制御を標的とした遺伝子治療法の確立
代表:若林　良明
期間:平成20年-平成22年
研究費総額:平成22年度¥1,200,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:脊髄損傷慢性期での細胞移植を併用した再髄鞘化と運動機能再建
代表:榎本　光裕
期間:平成21年-平成23年
研究費総額:平成22年度¥1,000,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:関節軟骨代謝における老化制御因子SIRT1の機能解析
代表:麻生　義則
期間:平成21年度-平成23年度
研究費総額:平成22年度¥1,100,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:関節軟骨細胞に発現する破骨細胞分化制御因子の機能に関する研究
代表:古賀　大介
期間:平成21年度-平成23年度
研究費総額:平成22年度¥1,100,000.-

科学研究費補助金（基盤研究C）
研究題目:高気圧酸素療法を応用した新しい歯牙再植法の開発
分担:加藤　剛
期間:平成22年度-平成24年度
研究費総額:平成22年度　¥100,000.-

研究活動スタート支援
研究題目:注入型多孔質ポリウレタンscaffoldを使用した骨再生
代表:吉井　俊貴
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:平成22年度　¥1,230,000.-

共同研究費（帝人ファーマ株式会社）
研究題目:椎間板ヘルニア治療薬の創薬研究．民間との共同研究
代表:加藤　剛
期間:平成21年度-平成22年度（単年度）
研究費総額:¥1,326,255.-

共同研究費（オリンパス株式会社）
研究題目:骨髄/βTCP複合体/薬剤による骨形成能の検討　.民間との共同研究
代表:早乙女　進一
期間:平成22年度-平成23年度（単年度）
研究費総額:¥2,200,000.-

共同研究費（横河電機株式会社）
研究題目:多部位対応普及型脊髄誘発磁場計測装置の開発.
代表:川端　茂徳
期間:平成20年度-平成22年度
研究費総額:¥4,700,000.-

共同研究費（HOYA株式会社）
研究題目:多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体（HAp/Col）のOsteogenicprotein-1（Op-1）担体としての有用性に関する検討
代表:早乙女　進一
期間:平成21年-平成22年度（単年度）
研究費総額:平成22年度¥1,430,000.-

共同研究費（キッコーマン株式会社）
研究題目:関節軟骨代謝に対するプロアントシアニジンとオリゴヒアルロン酸の作用に関する研究
代表:早乙女　進一
期間:平成22年度

研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:骨誘導性注入型骨補填剤の開発および難治性骨折への応用
代表:早乙女　進一
期間:平成21年度-平成23年度
研究費総額:¥4,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:新規薬剤を用いた末梢神経側枝発芽促進の試み
代表:榎本　光裕
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:自家骨髄由来細胞濃縮法と自己血漿、人工骨を組み合わせた骨再生の可能性
代表:吉井　俊貴
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:Qdotを用いた局所組織ラベリングによる骨形成タンパクによる異所性骨化のメカニズムの解明とその効率化に関する検討
代表:湯浅　将人
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:骨髄由来間葉系細胞（MSC）の骨形成抑制因子の同定
代表:山田　剛史
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　社団法人　日本損害保険協会
研究題目:骨髄間葉系幹細胞を用いたパスツール法の骨髄炎治療への応用
代表:小柳　広高
期間:平成22年度-平成23年度
研究費総額:¥1,000,000.-

助成金　財団法人　整形災害外科学研究助成財団
代表:榎本　光裕
期間:平成22年度
研究費総額:¥1,000,000.-

13）主催学会

第83回日本整形外科学会学術総会、平成22年5月27～30日、東京

14）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

（整形外科学分野）
准 教 授: 大川淳
助　　教: 若林良明、川端茂徳、阿江啓介、加藤剛、古賀大介、富沢将司
大学院生: 岩崎牧子、小柳広高、石井宣一、山内裕樹、○藤田浩二、正岡智和、榊経平、平井高志、○湯浅将人、○山田剛史、請川大、○許レン、○馬成山、○徐成、請川円、谷山崇
（整形外科先端治療開発学講座）
寄付講座准教授: 早乙女進一
寄付講座講師: 榎本光裕、麻生義則

15）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など

GCOEの活動は、整形外科臨床の基盤となる骨に関する基礎科学を追及するうえで、極めて重要な位置を占めている。次年度以後も積極的な人材確保を行い、本年度以上に研究を促進していく予定である。

Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a rabbit bone defect model

Yumi Sugata[1,2], Shinichi Sotome[1,3], Hidetsugu Maehara[1], Masato Yuasa[1,2], Tomokazu Masaoka[1,2] , Masahiro Hirano[4], Kenichi Shinomiya[1,2,5], Atsushi Okawa[1]

[1] Department of Orthopaedic and Spinal Surgery, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

[2] Global Center of Excellence (GCOE) Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Disease, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

[3] Development Division of Advanced Orthopedic Therapeutics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

[4] PENTAX New Ceramics Division, HOYA Corporation, 2-36-9 Maeno-cho, Itabashi-ku, Tokyo 174-8639, Japan

[5] Hard Tissue Genome Research Center, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan

All correspondence concerning this paper should be addressed to: Shinichi Sotome, MD, PhD, Development Division of Advanced Orthopedic Therapeutics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University,1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan.

Tel: +81-3-5803-5272; Fax: +81-3-5803-5272

E-mail: sotome.orth@tmd.ac.jp

Running title: Effects of bisphosphonate on HAp/Col

ABSTRACT

Recently, several bisphosphonates have become widely used for the treatment of osteoporosis. Porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite is an osteoconductive bone substitute and is resorbed by osteoclasts. The effects of alendronate (ALN), one of the bisphosphonates, on bone formation in porous HAp/Col and resorption by osteoclasts were evaluated using a rabbit model. Porous HAp/Col cylinders (6 mm in diameter and 8 mm in length; 100- to 500- μ m pore size; 95% porosity) were inserted into the lateral condyles of the femurs of 72 rabbits. The rabbits were divided into four groups based on the ALN administration period: the "Control" group did not receive ALN treatment, the "Pre" group had ALN treatment for three weeks prior to transplantation, the "Post" group had ALN treatment from after transplantation until euthanasia, and the "Pre+Post" group had continuous ALN treatment from three weeks prior to surgery until euthanasia. All rabbits were injected intravenously with either saline or ALN (7.5 μ g/kg) once a week. Each group had 18 rabbits, and 6 rabbits in each group were euthanized at 3, 6, or 12 weeks post-operation. ALN administration suppressed the resorption of the implants, and the mineral densities of newly formed bone in the ALN-treated groups were lower than those in the Control group through 12 weeks post-operation. Interestingly, the number of osteoclasts attached to the implant was correlated with the bone tissue area at three weeks. In conclusion, the systemic administration of ALN at a pharmacological dose suitable for clinical osteoporosis treatment affected the mineral density and remodeling of bone tissue in transplanted porous HAp/Col composites.

Introduction

A wide variety of bone substitutes have been developed, including sintered calcium phosphates and their composites, and their clinical use has especially increased over the past decade.[1] Recently, types of bone substitutes other than sintered calcium phosphates have also been developed, including a hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite, which was developed by Kikuchi et al[2,3]. In contrast to sintered hydroxyapatite (HAp), which is barely resorbed after implantation, HAp/Col is resorbed by osteoclast-like cells and is involved in natural bone remodeling mechanisms; the coupling mechanisms between osteoblasts and osteoclast-like cells are thought to contribute to this material's osteo-conductibility. The porous body of HAp/Col has a sponge-like elasticity and excellent biocompatibility and osteo-conductibility4,5. It has a large surface area of 75 m^2/g due to its 80% composition of nanoscale HAp crystals; therefore, it is able to adsorb a large quantity of proteins, such as growth factors, and other molecules, including drugs and ions[3,6].

Bisphosphonates are synthetic analogues of pyrophosphate, and the first bisphosphonate was synthesized in 1865 and used in industry as a corrosion inhibitor[7,8]. Etidronate was used to treat myositis ossificans and become the first bisphosphonate to be used for the treatment of a human disease[7]. In 1976, the effectiveness of etidronate for the treatment of osteoporosis was reported, although the biological mechanisms had not been clarified[9]. Thereafter, elucidation of the biological mechanisms of bisphosphonate action and the mechanisms of osteoporosis permitted the development of other bisphosphonates, including alendronate, which is more effective than first-generation bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. Bisphosphonates have a high affinity for HAp and are adsorbed onto the HAp contained in bone after they are administered.

MEMO

膠原病・リウマチ内科学

宮坂 信之

医歯学総合研究科・生体環境応答学系専攻
臨床免疫学・教授

1）研究の課題名

1. 関節リウマチ新規治療法の開発

Arthritis research for development of new therapeutic approaches

現在の関節リウマチ（RA）治療では、単一分子を強力に抑制する生物学的製剤が大きな効果を上げているが、その反面、易感染性が臨床での問題となっている。この点を克服しようとするのが、多くのサイトカインをほどよく抑制する中庸抑制法である。今年度の成果は、E3ユビクチンリガーゼであるc-MIRをRAモデルマウスの滑膜に強制発現させる、全身免疫抑制をきたさずに、IL-6やTNF-αの分泌を抑制し、関節炎を改善するというものである。新たなRA治療法の候補と考えられる。

2. 炎症性筋難病の克服

Myositis research for development of new therapeutic approaches

我々は、骨・関節の動的機能を支配する骨格筋の炎症性疾患である多発性筋炎（PM）の新しいモデル動物（Cタンパク誘導性筋炎:CIM）を開発した。今年度は、CIMマウスから正常マウスへのT細胞移入の際に、CD8T細胞移入で強く筋傷害が起きること、MHC class I欠損マウスやパーフォリン欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、筋傷害が軽いことを示した。PMで予想される通り、CIMも細胞傷害性CD8 T細胞が担っていることが明確になり、PMモデルとしてのCIMの正当性が示された。

3. 関節リウマチの線維芽細胞様滑膜細胞に対するchemerinの作用

Stimulatory Effects of Chemerin on Fibroblast-like Synoviocytes in Patients with Rheumatoid Arthritis.

Chemerinは、マクロファージや樹状細胞に発現するG蛋白共役型受容体であるChemR23のリガンドであり、ChemR23発現細胞の走化因子として働く。本研究では、関節リウマチ（RA）の滑膜組織におけるchemerinおよびChemR23の発現を解析し、またRA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）に対するchemerinの作用について検討した。免疫組織染色によりchemerinはRA滑膜表層および表層下細胞と血管内皮細胞に、ChemR23はマクロファージ、樹状細胞、FLSに発現していた。ChemerinおよびChemR23は、in vitroにおいて無刺激FLSに発現しており、chemerin産生はTNF-αおよびIFN-γ刺激により亢進した。さらに、chemerinはFLSからのIL-6およびCCL-2、MMP-3産生を増加させ、FLSの細胞運動性を亢進させた。FLSに対するchemerinの刺激作用はERK1/2,p38 MAPK,Aktの活性化を介しており、ERK1/2およびp38 MAPK,Akt経路の阻害によりFLSからのchemerin刺激によるIL-6産生は有意に抑制され、p38 MAPKおよびAkt経路の阻害によりFLSの運動性も抑制された。以上のことから、chemerinはFLSを活性化し、RAの病態形成に重要な役割を担っている可能性がある。

4. リゾフォスファチジン酸を標的とした関節リウマチの新規治療法開発

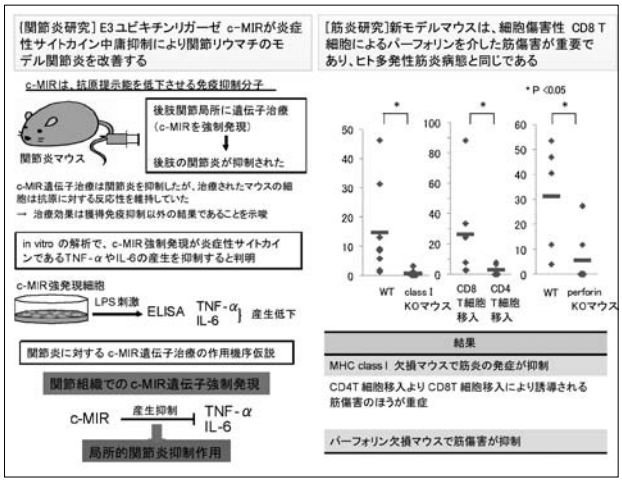
Pathogenic Role of Lysophosphatidic Acid on Rheumatoid Arthritis

リゾフォスファチジン酸（LPA）は、生理活性を持つ脂質メディエーターであり、オートタキシン（ATX）により合成され、LPA受容体（LPAR1-5）を介して作用する。本研究では関節リウマチ（RA）におけるLPA、ATXの病態形成への関与を解明し、それらを標的とする治療の有用性を検討した。RA滑膜ではATX、LPAR1-5の発現が免疫染色で認められ、変形性関節症と比較して発現は増強していた。LPA刺激によりRA線維芽細胞様滑膜細胞（FLS）からのIL-6、MCP-1、

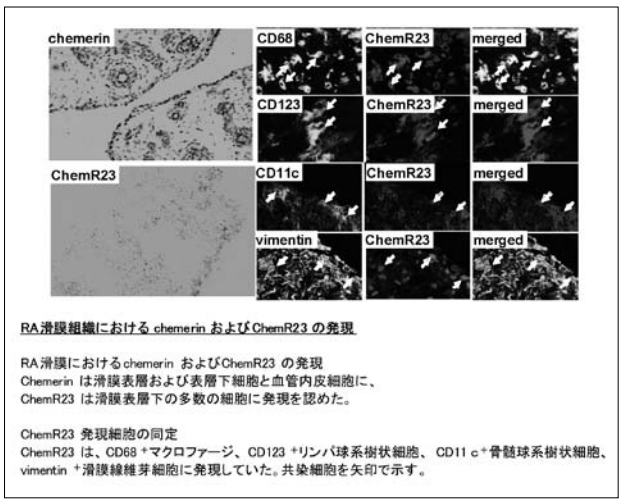
MMP-3発現が上昇し、細胞増殖、細胞遊走も亢進した。マウスコラーゲン誘導関節炎は、day 1およびday 22にコラーゲン免疫をすることにより発症するが、ATX及びLPAR阻害活性を有するBrP-LPAを2回目免疫（day 22）後から投与すると関節炎スコアは抑制された。また足関節の炎症細胞浸潤や骨破壊も抑制された。マウス脾細胞をコラーゲン刺激しサイトカイン産生能を解析すると、IFN-γ、IL-17産生は著明に低下した。一方、関節炎発症後からのBrP-LPA投与でも関節炎抑制効果を認めた。以上からLPAはFLS刺激、Th細胞分化に関与し、その阻害がRAの新規治療となる可能性が示唆された。

2)

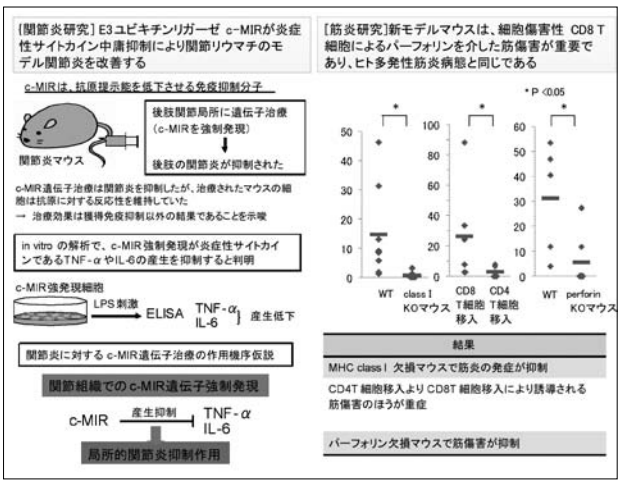
1. 関節リウマチ新規治療法の開発



2. 関節リウマチの線維芽細胞様滑膜細胞に対するchemerinの作用



3. リゾフォスファチジン酸を標的とした関節リウマチの新規治療法開発



3) 研究内容についての英文要約

1. Arthritis Research

c-MIR is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates MHC class II and CD86. The ubiquitination results in their endocytosis and down modulation of their expression. We transferred the c-MIR gene to synovial tissues of collagen-induced arthritis（CIA）, an animal model of rheumatoid arthritis, and found that it exerted therapeutic effects. It did not interfered with immune responses against collagen protein, but suppressed inflammatory cytokine production. The c-MIR induction in the synovial tissues may provide a new approach to the safe and effective treatment of RA.

2. Myositis Research

C-protein-induced myositis（CIM）is an animal model of polymyositis. To substantiate a pathogenic role of cytotoxic CD8 T cells on its development, β 2-microgloburin null mutant, perforin null mutant mice were immunized for CIM induction, but developed myositis with significantly lower incidence than wild type mice. Regional lymph node CD8, but not CD4 T cells transferred myositis adoptively to naïve mice. Thus, in analogy with human PM, perforin-mediated cytotoxicity by CD8 T cells is definitively responsible for muscle injury in CIM.

3. Stimulatory Effects of Chemerin on Fibroblast-like Synoviocytes in Patients with Rheumatoid Arthritis.

Chemerin is a chemotactic agonist identified as a ligand for ChemR23, expressed on macrophages and dendritic cells（DC）. In this study, we analyzed the expression of chemerin and ChemR23 in the synovium of rheumatoid arthritis（RA）, and the stimulatory effects of chemerin on fibroblast-like synoviocytes（FLS）from RA. Chemerin was expressed on endothelial cells and synovial lining and sublining cells, and ChemR23 on macrophages, plasmacytoid and myeloid DC and FLS in the RA synovium. Chemerin and ChemR23 were expressed on unstimulated FLS in vitro.

Tumor necrosis factor- α and interferon- γ upregulated the chemerin production. Chemerin enhanced the production of interleukin-6 (IL-6), CCL2 and matrix metalloproteinase-3 by FLS, and FLS motility. Stimulation with chemerin induced phospholyration of ERK1/2, p38 MAPK and Akt on FLS. Inhibition of the ERK1/2, p38 MAPK, and Akt signaling pathways significantly suppressed chemerin-induced IL-6 production. Moreover, blockade of p38 MAPK and Akt pathways, but not ERK1/2, inhibited the chemerin-enhanced cell motility. These results indicated that chemerin and ChemR23 interaction may play an important role in the pathogenesis of RA, through the activation of FLS.

4. Pathogenic Role of Lysophosphatidic Acid on Rheumatoid Arthritis

Lysophosphatidic acid (LPA) is a bioactive lipid and binds to cell surface G coupled-protein receptors (LPAR1-5), which is generated by autotaxin (ATX). In this study, we analyzed expression of ATX and LPA receptors (LPAR1-5) in rheumatoid arthritis (RA), and examined the pathogenic role in RA. ATX and LPAR1-5 were expressed in the RA synovium. Stimulation with LPA upregulated expression of IL-6, MCP-1, and MMP-3 by fibroblast-like synoviocytes (FLS) from RA. LPA also induced migration and proliferation on FLS from RA. We induced murine collagen-induced arthritis (CIA) by immunization with bovine type II collagen at days 1 and 22. Treatment with BrP-LPA (antagonist for ATX and LPAR) from day 22 significantly reduced clinical arthritis score and radiographic bone destruction of the CIA. Moreover, IFN-γ and IL-17 production by collagen-stimulated splenocytes from BrP-LPA-treated mice were lower than that from vehicle-treated mice. Treatment with BrP-LPA after onset of arthritis also ameliorated clinical arthritis score. These results indicate that LPA plays an important role for activation of FLS, and could be a new target for RA therapy.

4) 本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

D（人材育成）

有望な大学院生数名が研究を開始した。

5) 英文原著論文

1. Seki I, Suzuki M, Miyasaka, N, Kohsaka H. Expression of CD45 isoforms correlates with differential proliferative responses of peripheral CD4+ and CD8+ T cells. Immunol Lett 129（1）, 39-46, 2010
◎2. Sugihara T, Okiyama N, Suzuki M, Kohyama K, Matsumoto Y, Miyasaka M, Kohsaka H. Definitive engagement of cytotoxic CD8 T cells in C-protein induced myositis, a murine model of polymyositis. Arthritis Rheum 62（10）, 3088-3092, 2010
◎3. Nakashioya H, Nakano K, Watanabe N, Miyasaka N, Matsushita S, Kohsaka H. Therapeutic effect of D1-like dopamine receptor antagonist on collagen- induced arthritis of mice. Mod Rheumatol（in press）
◎4. Toyomoto M, Ishido S, Miyasaka M, Sugimoto H, Kohsaka H. Anti-arthritic effect of E3 ubiquitin ligase, c-MIR, expression in the joints. Int Immunol（in press）.
5. Okiyama N, Kitajima T, Ito Y, Yokozeki H, Miyasaka N, Kohsaka H. Addition of the collagen binding domain of fibronectin potentiates the biochemical availability of hepatocyte growth factor for cutaneous wound healing J Dermatol Sci（in press）
6. Yamazaki H, Nanki T, Miyasaka N, Harigai M. Methotrexate and trimethoprim-sulfamethoxazole use for PCP prophylaxis. J Rheumatol（inpress）
7. Nonomura Y, Miyabe Y, Tanaka M, Tsubata R, Nanki T, Harigai M, Miyasaka N. Prominent splenic microcalcifications in a patient with systemic lupus erythematosus complicated with antiphospholipid syndrome. J Clin Rheumatol（inpress）
8. Kaneko K, Nanki T, Hosoya T, Mizoguchi F, Miyasaka N. Etanercept-induced necrotizing crescentic glomerulonephritis in two patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 20（6）:632, 2010
9.◎ Watanabe K, Penfold MET, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 62（11）:3211, 2010
10. ◎Sato A, Watanabe K, Kaneko K, Murakami Y, Ishido M, Miyasaka N, Nanki T. The effect of synthetic retinoid, Am80, on T helper cell development and antibody production in murine collagen-induced arthritis. Mod Rheumatol 20（3）:244, 2010
11. Hashimoto J, Garnero P, van der Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Yoshikawa H, Nishimoto N. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody（tocilizumab）monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. Mod Rheumatol（in press）
12. Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, Saito K, Nawata M, Kameda H, Nojima T, Miyasaka N, Koike T; RRR Study investigators. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR（remission induction by Remicade in RA）study. Ann Rheum Dis 69（7）:1286-1291, 2010
13. ◎Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima

K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. J Cell Biochem 109（5）:866-875, 2010

6）総説ならびに著書

英文総説

1. Kohsaka H. Current insights in polymyositis and dermatomyositis Clin Exp Neuroimmnol 1（1）, 22-32, 2010

和文総説

1. 上阪 等 多発性筋炎・皮膚筋炎 Clinical Neuroscience 28（2）,199-202, 2010
2. 村上洋介、上阪 等 自己免疫疾患の発症とTREM-1 臨床免疫・アレルギー科 53（5）: 447-454, 2010
3. 上阪 等 関節リウマチ遺伝子治療 日本臨床 68（増刊号5）,627-632, 2010
4. 上阪 等 多発性筋炎・皮膚筋炎の分子標的と制御 最新医学65（5）987-991, 2010
5. 上阪 等 内科疾患の診断基準・病型分類・重傷度 内科105（6）, 1272-1275, 2010
6. 上阪 等 関節リウマチ治療における抗TNF療法の功罪と細胞周期制御療法の未来 実験医学増刊 28（12）:2021-1025, 2010
7. 上阪 等 Journal Club 分子リウマチ治療 3（3）, 160, 2010
8. 溝口史高、上阪 等 関節リウマチにおける骨形成・骨吸収 腎と骨代謝 23（4）:253-258, 2010
9. 上阪 等 炎症性筋疾患の画像診断 44（2）:141-145, 2010
10. 村上洋介、上阪 等 サイトカインとは Clinical Calcium 20（10）, 1459-1466, 2010
11. 上阪 等 多発性筋炎/皮膚筋炎 臨床と研究87（9）:1214-1218, 2011
12. 上阪 等 膠原病 最新医学 65（11）:2346-2351, 2010
13. 上阪 等 内科治療ピットフォール 多発性筋炎/皮膚筋炎 106（6）:1195-1197, 2010
14. 上阪 等 これだけは知っておきたい検査のポイント 抗Sm抗体 medicina 47（11）:442-443, 2010
15. 上阪 等 これだけは知っておきたい検査のポイント 抗Scl-70抗体 medicina 47（11）:444-445, 2010
16. 南木敏宏。関節リウマチにおけるマクロファージの役割。リウマチ科。44（1）: 100-104、2010。科学評論社。
17. 松島綱治、横地祥司、上羽悟史、南木敏宏.関節リウマチ（第2版）-寛解を目指す治療の新時代-、関節リウマチの成因と病態生理、炎症メディエーター、主なサイトカイン、インターロイキン8ファミリー、ケモカイン。日本臨牀 増刊号p123-132、2010。日本臨牀社。
18. 南木敏宏。製剤ごとの感染症とその頻度について教えて下さい。ファーマナビゲーターリウマチ～生物学的製剤編～。竹内勤編。p128-131、2010。メディカル・レビュー社。
19. 宮坂信之 アダリムマブをどう使うか?－我が国のエビデンス.リウマチ科 42（3）:273-277, 2010
20. 宮坂信之 関節リウマチ—寛解を目指す治療の新時代—序文.日本臨床2010増刊号 68:1-6, 2010
21. 宮坂信之 新しいリウマチ治療薬の使用上の問題点.綜合臨床 59（1）:127-128, 2010
22. 宮坂信之 現在治療中の有望な新しい抗リウマチ薬の紹介.リウマチクリニック 11:4-6, 2010
23. 宮坂信之 日常診療に使えるガイドライン特集 関節リウマチ.綜合臨床増刊号 pp.391-395, 2010
24. 宮坂信之 シェーグレン症候群 Sjogren syndrome（SS）.今日の治療指針 2010年版 医学書院
25. 宮坂信之 アダリムマブ. Pharma Medica3月号 28（3）:25-28, 2010
26. 宮坂信之 全身性エリテマトーデス（SLE）.カレントテラピー 28（10）:21-25,2010
27. 宮坂信之 関節リウマチの新診断基準.日本内科学会誌 99（8）:173-177, 2010
28. 宮坂信之 抗サイトカイン療法の現状.医学のあゆみ 234（5）:587-592,2010
29. 宮坂信之 関節リウマチの新しい診断基準. Modern Physician 30（8）:1005-1008, 2010
30. 宮坂信之 関節炎の鑑別診断.日本内科学会雑誌「関節炎の鑑別:診断と治療の進歩 99（10）:1-3,2010
31. 鎌谷直之、宮坂信之 関節リウマチにおけるMTXの有効性と安全性—エタネルセプト（エンブレル）の製造販売後調査より.リウマチ科 44（5）: 2010
32. 高村聡人、宮坂信之 ステロイド療法の実際—関節リウマチ—.「臨床と研究」 88（1）:6-10,2011

和文著書

1. 上阪 等 多発性筋炎・皮膚筋炎 今日の治療指針

2010　山口　徹、北原光夫、福井次矢総編集　674-675頁　医学書院 2010年1月1日
2. 松尾祐介、上阪　等　高安病（高安動脈炎）　リウマチ・膠原病内科　クリニカルスタンダード　三森経世編集　154-165頁　文光堂　2010年8月26日
3. 宮坂信之　免疫グロブリン製剤の適応疾患と治療.「静注免疫グロブリン製剤ハンドブック」正岡　徹監修

7）平成22年度までの自己評価

関節リウマチ及び多発性筋炎/皮膚筋炎の病態形成における分子機構とそれを逆手にとった新規治療法の開発研究を、動物モデル及びヒト患者検体を用いて多角的に進めてきたが、これまでに外部資金の導入、impact factorの高い原著論文の作成などの面において十分な成果が上がっていると自己評価している。

8）学会発表（英文）

1. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka, Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice.（Poster）Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado, February 27-March 4, 2010
2. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Effector T cells and Local Innate Immunity Need to Act in Concert for Development of Autoimmune Myositis.（Oral）70th Annual Meeting of Society for Investigative Dearmatology, Atlanta, May 5-8, 2010.
3. Fumitaka Mizoguchi, Yousuke Murakami, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. miR-31 contributes to the optimal bone resorption by osteoclasts 3rd International Conference on Osteoimmunology,（Poster）Santorini, June 20-25, 2010
4. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice. International Congress of Immunology Osaka（Poster）, August 22-27, 2010
5. Ayaka Maeda, Shinya Hirata, Naoko Okiyama, Takahiko Sugihara, Eri Yoshimoto, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka Inflammatory chemokines expressed by differentiating myofibroblasts and the muscles affected by mouse model of polymyositis.International.（Poster）Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010
6. Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka　TNFa and IL-1 blockade for treatment of a murine model of polymyositis.（Poster）International Congress of Immunology Osaka, August 22-27, 2010
7. Hitoshi Kohsaka, Yousuke Murakami, Fumitaka Mizoguchi, Nobuyuki Miyasaka p16INK4a exerts　anti-inflammatory effects through acceleration of IRAK1 degradation in macrophages.（Oral）International Congress of Immunology Osaka（Workshop）, August 22-27, 2010
8. Takahiko Sugihara, Naoko Okiyama, Naoto Watanabe, Nobuyuki Miyasaka and Hitoshi Kohsaka. Blockade of TNFá or IL-1 ameliorates ongoing C-protein induced myositis of mice.（Oral）American College of Rheumatology 74th National Meeting, Atlanta, Georgia, November 6-11, 2010
9. Naoko Okiyama, Takehiko Sugihara, Takahiro Satoh, Hiroo Yokozeki, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. Identification of CD8 T cell epitopes in skeletal muscle C-protein that induces experimental myositis of mice.35th Annual Meeting of Japanese Society of Investigative Dermatology.（Oral）Wakayama, December 3-5, 2010.
10. Kaneko K, Watanabe K, Miyasaka N, Nanki T. Chemerin and ChemR23 Expression in Rheumatoid Arthritis: The Therapeutic Implication of the Pathway. 第14回国際免疫学会。神戸、2010年8月。
11. Morio T, Terada N, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Matsumoto K, Azuma M, Mizutani S. Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T-cell Populations in ICOS-deficient Patients. 第14回国際免疫学会。神戸、2010年8月。
12. Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nonomura Y, Nanki T, Koike R, Miyasaka N, Harigai M. Incidence and risk factors of serious infections in the long-term in patients with rheumatoid arthritis（RA）receiving tumor necrosis factor（TNF）antagonists using the REAL database in Japan. ヨーロッパリウマチ学会。Roma, Italy, 2010年6月。
13. Tanaka Y, Abe T, Takeuchi T, Yamamoto A, Miyasaka N. ABATACEPT demonstrated long-term safety and efficacy in active RA patients who showed inadequate response or intolerance to long-term extension trial. APLAR2010 Hong-Kong, July 11-15, 2010
14. Tohma S, Abe T, Takeuchi T, Yamamoto A, Miyasaka N. Abatacept provides clinical efficacy in Japanese patients with active RA: a multi-center, randomized, double-blinded, controlled bridging trial in Japan. APLAR2010 Hong-Kong, July 11-15, 2010
15. Amano K, Abe T, Takeuchi T, Yamamoto A, Miyasaka N. A phase I study to evaluate the safety, tolerability and efficacy of Abatacept in Japanese rheumatoid arthritis patients. APLAR2010 Hong-Kong, July 11-15, 2010
16. Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Miyasaka N. Post-

marketing surveillance of the safety and effectiveness of TACROLIMUS in 3267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. EULAR2010 Rome, Italy, June 16-19, 2010

17. Matsubara T, Abe T, Takeuchi T, Yamamoto A, Miyasaka N and Japan Abatacept Clinical Study Group. EULAR2010 Rome, Italy, June 16-19, 2010
18. Takeuchi T, Yano T, Tatsuki Y, Miyasaka N, Abe T, Koike T. The correlation between trough serum infliximab (IFN) level and "True Remission" in RA patients: results from rising study. EULAR2010 Rome, Italy, June 16-19, 2010
19. Sakai R, Komona Y, Nanki T, Tanaka M, Nonomura Y, Koike R, Miyasaka N, Harigai M and REAL Study Group. EULAR2010 Rome, Italy, June 16-19, 2010
20. Tanaka Y, Yamanaka H, Koike T, Miyasaka N, Mimori T, Takeuchi T, Sumida T, Yamamoto K, Hirata S, Nawata M, Fukuyo S, Tanaka E, Murakami K, Kaneko Y, Saito K. The Inhibitors redeced structural changes to "ZERO" in patients with early rheumatoid arthritis, an interim report of ERO-J study. EULAR2010 Rome, Italy, June 16-19, 2010
21. Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Oba T, Rahman M.U, Yoshinari T, Miyasaka N, Koike T. Golimumab, a human anti-TNF α monoclonal antibody administered subcutaneously every four weeks in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: 24-week results of clinical and radiographic assessments. ACR2010 Atlanta, Georgia, November 6-11, 2010
22. Takeuchi T, Harigai M, Tanaka Y, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Oba T, Rahman M.U, Yoshinari T, Miyasaka N, Koike T. Golimumab, a human anti-TNF α monoclonal antibody administered subcutaneously every four weeks as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis despite DMARD therapy: 24-week results of clinical and radiographic assessments. ACR2010 Atlanta, Georgia, November 6-11, 2010
23. Miyasaka N. Transition in the treatment of Japanese RA patients using biologics. 2nd CRCRA International Symposium Seoul, Korea, October 1, 2010

9）学会発表（和文）

1. 杉原　毅彦、沖山　奈緒子、宮坂　信之、上阪　等　多発性筋炎モデルマウスを用いた新治療法の開発第54回　日本リウマチ学会総会・学術集会（ワークショップ）　神戸　2010年4月22-25日
2. 中里　洋子、上阪　等、溝口　史高、宮坂　信之　気道・関節病変のみを呈した再発性多発性軟骨炎の一例　第577回日本内科学会関東地方会　2010年12月11日
3. 酒井良子、駒野有希子、田中みち、野々村美紀、南木敏宏、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。REALを用いた関節リウマチ患者における生物学的製剤の長期安全性に関する検討。第31回日本炎症・再生医学会。東京、2010年8月。
4. 横山和佳、野々村美紀、河野宏、溝口史高、南木敏宏、針谷正祥、宮坂信之、濱田啓一、中久木康一、天笠光雄。結節性紅斑を合併した下顎骨原発の無菌性骨髄炎の一例。関東リウマチ。東京、2010年6月。
5. 針谷正祥、南木敏宏、田中みち、酒井良子、野々村美紀、駒野有希子、小池竜司、宮坂信之。生物学的製剤使用日本人関節リウマチ患者における発癌リスクの検討-SECURE研究。第54回日本リウマチ学会総会。神戸、2010年4月。
6. 酒井良子、駒野有希子、田中みち、野々村美紀、南木敏宏、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。REALを用いた関節リウマチ患者における生物学的製剤の長期完全性に関する検討。第54回日本リウマチ学会総会。神戸、2010年4月。
7. 野々村美紀、酒井良子、田中みち、南木敏宏、小池竜司、宮坂信之、針谷正祥。REALデータベースからみた2009ACR/EULAR RA分類基準（2009ACR/EULAR）の検証。第54回日本リウマチ学会総会。神戸、2010年4月。
8. 小林茂人、針谷正祥、宮坂信之、ADA-AS治験グループ　日本人強直性脊椎炎（AS）患者を対象としたアダリムマブ（ADA）の長期投与時の有効性及び安全性の検討（多施設共同試験）.日本臨床リウマチ学会　東京　2010年11月27日～28日

10）外部資金の獲得状況

1. 文部科学省科学研究費補助金　基盤A
   研究題目:　新しいメカニズムによる次世代抗リウマチ療法の開発
   代表:上阪　等
   期間:　平成21年－平成23年
   研究費総額:3,540万円
2. 文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽
   研究題目:　難治疾患理解のための筋免疫学創成への挑戦
   代表:上阪　等
   期間:　平成22年
   研究費総額:300万円

3. 二国間交流事業　韓国との共同研究
研究題目:新規治療法開発に向けた多発性筋炎にかかわるサイトカインの研究
代表:上阪　等
期間:平成21年－平成23年
研究費総額:240万円

4. 厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究題目:新たな診断・治療法開発のための免疫学的手法の開発に関する研究
代表:小池隆夫]
期間:　平成20年－平成22年
研究費総額:900万円

5. 厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
研究題目:免疫疾患の病因・病態解析とその制御戦略へのアプローチ
代表:住田孝之
期間:平成20年－平成22年
研究費総額:600万円

6. 共同研究:
研究題目:多発性筋炎・皮膚筋炎などの難病に対する人免疫グロブリン療法の作用機序の解明
代表:上阪　等
期間:平成22年
研究費総額:100万円

7. 共同研究:
研究題目:関節リウマチおよび糖尿病を対象とした評価・アッセイ技術および化合物の合成展開技術の融合による治療薬の開発
代表:上阪　等
期間:平成22年
研究費総額:42万円

9. 共同研究:
研究題目:滑膜細胞増殖に関する研究
代表:上阪　等
期間:平成22年
研究費総額:142万円

10. 共同研究:
研究題目:TREM1リガンドの創薬可能性評価
代表:上阪　等
期間:平成22年
研究費総額:0万円（双方で自己負担）

11. 共同研究:
抗ARS抗体検出試薬の臨床的有用性の確認に関する臨床研究
代表:上阪　等
期間:平成22年
研究費総額:60万円

12. 科学研究費補助金、基盤研究C
研究題目:フラクタルカイン阻害による血管炎症候群に対する新規治療法の開発
代表:南木敏宏
期間:平成20年-平成22年度
研究費総額:468万円

13. 科学研究費補助金、基盤研究B
研究題目:関節リウマチにおける生物学的製剤の長期安全性と副作用リスク因子に関する疫学研究
分担:南木敏宏（代表:針谷正祥）
期間:平成21年-平成22年度
研究費総額:65万円

14.（財）武田科学振興財団、医学系研究奨励
研究題目:脂質メディエーターを標的とした関節リウマチの新規治療の開発
代表:南木敏宏
期間:平成22年度
研究費総額:300万円

15. エーザイ（株）との共同研究
研究題目:ケモカイン・接着分子等の関節リウマチなどの自己免疫疾患における役割の研究
代表:南木敏宏
期間:平成17年-平成22年度
研究費総額:600万円

16.厚生労働科学研究費補助金　難治性疾患克服研究事業
研究題目:難治性疾患克服研究の評価ならびに研究の方向性に関する研究
分担:宮坂信之（代表:千葉勉）
期間:平成21～22年度
研究費総額:350万円

17.厚生労働科学研究費補助金　免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業
研究題目:関節リウマチの関節破壊ゼロを目指す治療指針の確立、及び根治・修復療法の開発に関する研究
分担:宮坂信之（代表:田中良哉）
期間:平成20～22年度
研究費総額:750万円

18.厚生労働科学研究費補助金　治験推進事業
研究題目:「多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対するタクロリムスの臨床試験」の調整・管

理に関する研究/CCT-B-1801
代表:宮坂信之
期間:平成20～22年度
研究費総額:19,887.7万円

19.厚生労働科学研究費補助金　治験推進事業
研究題目:「治験の実施に関する研究【タクロリムス水和物】」/CCT-C-1857
代表:宮坂信之
期間:平成20～22年度
研究費総額:232.5万円

11）特別講演、招待講演、シンポジウム

・上阪　等　膠原病の最新医療を求めて　第4回お茶の水眼科先進医療セミナー　東京　平成22年5月14日
・上阪　等　自己免疫疾患治療の将来展望　Renal Transplantation Forum 2010　東京　平成22年5月15日
・上阪　等　リウマチ内科医のMTXへのこだわりと使い方　文京区薬剤師会学術講演会　東京　平成22年6月15日
・上阪　等　多発性筋炎・皮膚筋炎研究　－静から動へ－　順天堂大学膠原病内科講演会　東京　平成22年6月30日
・Hitoshi Kohsaka Autoagressive T cells and inflammatory cytokines in autoimmune myositis. The 6th Annual Symposium at Rheumatism Research Institute, Seoul National University Seoul June 2, 2010
・上阪　等　筋炎における自己反応性T細胞と炎症性サイトカイン　第6回自己免疫疾患研究会　東京　平成22年7月3日
・上阪　等　リウマチ性疾患から腎を守る　第2回慢性腎臓病研究会　東京　平成22年7月15日
・上阪　等　多発性筋炎と皮膚筋炎－膠原病内科医の診ため－2010北海道末梢神経・筋研究会　札幌　平成22年7月31日
・上阪　等、村上洋介、宮坂信之　サイクリン依存性キナーゼ阻害薬　　第31回日本炎症・再生医学会（シンポジウム）　東京、2010年8月5-6日
・上阪　等　関節リウマチ治療新次元－生物学的製剤によるT細胞制御療法－　第31回日本炎症・再生医学会　平成22年8月5日-6日　東京
・上阪　等　抗T細胞生物学的製剤が拓くリウマチ治療の新境地　BMKK関節リウマチ薬剤師セミナー　平成22年10月1日　東京
・Hitoshi Kohsaka Overlap of Oncology Targets with Rheumatoid Arthritis Eighth International Workshop on Pharmacodynamics of Anticancer Agents 10.17-21,2010 Hakone
・上阪　等　関節リウマチ治療－現在から未来へ－　第43回　高知リウマチ研究会　平成22年10月28日　高知
・上阪　等　抗T細胞生物学的製剤が拓くリウマチ治療の新境地　BMKK関節リウマチセミナー　平成22年11月5日　熊本
・上阪　等　関節リウマチ治療の王道を歩む　大島郡医師会学術講演会　平成22年11月19日　奄美
・上阪　等　膠原病内科医から見た炎症性筋疾患の基礎と臨床　第17回熊本神経カンファレンス学術講演会　平成22年12月1日　熊本
・宮坂信之　RAにおける生物学的製剤の役割　2010年Kick-off meeting社内講演会　平成22年1月12日　千葉
・宮坂信之　免疫難病に対するIL-6阻害療法　トシリズマブ学術講演会　平成22年1月15日　東京
・宮坂信之　関節リウマチ治療薬がもたらしたパラダイムシフトとは?　平成21年度先端技術研修　平成22年2月1日　東京
・宮坂信之　関節リウマチ治療におけるパラダイムシフトと今後の展望　第13回Gold Conference　平成22年2月6日　京都
・宮坂信之　RA治療に生物学的製剤のもたらしたもの　長崎生物学的製剤研究会　平成22年2月10日　長崎
・宮坂信之　関節破壊を止めるくすり:生物学的製剤　平成21年度リウマチ・アレルギーシンポジウム　平成22年2月20日　東京
・宮坂信之　IL-6阻害療法を介した関節リウマチの関節破壊阻止戦略とその問題点　第22回日本神経免疫学会招待講演　平成22年3月18日　東京
・宮坂信之　関節リウマチの早期診断・早期治療の重要性　第3回群馬県リウマチ登録医・実地医家の会　平成22年4月10日　高崎
・宮坂信之　関節リウマチの早期診断と早期治療の重要性　第54回日本リウマチ学会総会・学術集会凌霜特別講演　平成22年4月23日　神戸
・宮坂信之　国内エビデンスから見るエタネルセプトの最適な使用法　第54回日本リウマチ学会総会・学術

集会イブニングセミナー　平成22年4月23日　神戸
・宮坂信之　関節リウマチはここまでよくなる!—早期診断・早期治療のインパクト　第54回草加市立病院臨床研修会　平成22年5月15日　草加
・宮坂信之　リウマチ治療の現在未来　日本リウマチ友の会創立50周年記念大会　平成22年5月22日　東京
・宮坂信之　RA治療に生物学的製剤のもたらしたもの　徳島リウマチセミナー　平成22年5月26日　徳島
・宮坂信之　関節リウマチの薬物療法MTXと生物学的製剤の適切な使い方とは?　第83回日本整形外科学会学術総会　平成22年5月28日　東京
・宮坂信之　関節リウマチの病態と治療　リウマチフロンティア市民公開講座　平成22年6月6日　新潟
・宮坂信之　RAの早期診断・治療の意義　広島RAフォーラム　平成22年6月10日　広島
・宮坂信之　アダリムマブの有効性と安全性を最大限に引き出すためには?—ベストユース　ヒュミラユーザーズミーティング　平成22年6月23日　大阪
・宮坂信之　RAの新しい診断基準（ACR/EULARクライテリア2009）　エンブレル発売5周年記念講演会　平成22年7月10日　東京
・宮坂信之　RAにおけるテーラーメイド治療の時代を迎えて　リウマチアカデミー2010　平成22年7月31日　東京
・宮坂信之　アダリムマブの有効性と安全性を最大限に引き出すためには?—ベストユース　神奈川エリアヒュミラ発売2周年記念講演会　平成22年9月2日　横浜
・宮坂信之　関節リウマチ—早期診断と早期治療の意義は?　第20回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会教育講演　平成22年9月18日　札幌
・宮坂信之　膠原病の鑑別診断　ハートライフ病院講演会　平成22年9月28日　沖縄
・宮坂信之　Transition in the treatment of Japanese RA patients using biologics.　第2回CRCRA国際シンポジウム　平成22年10月1日　ソウル
・宮坂信之　多発性筋炎・皮膚筋炎に合併する間質性肺炎に対する新たな治療法の展開　第2回呼吸器・膠原病フォーラム　平成22年10月28日　米子
・宮坂信之　リウマチ・アレルギー疾患について　平成22年度リウマチ・アレルギー相談員養成研修会　平成+22年11月2日　東京
・宮坂信之　目標達成に向けた関節リウマチ治療　トシリズマブ学術講演会　平成22年11月24日　東京
・宮坂信之　関節破壊を止めるくすり:生物学的製剤平成22年度リウマチ・アレルギーシンポジウム　平成22年12月5日　広島
・宮坂信之　膠原病—関節リウマチなどをめぐって—膠原病とは何か　第64回信毎健康フォーラム＜長野＞　平成22年12月18日　長野
・宮坂信之　関節リウマチ—早期診断と早期治療の意義は?　第8回大分RAフォーラム　平成23年1月27日　大分
・宮坂信之　開業医のための関節リウマチ診療ABC　第91回小県医師会講演会　平成23年2月14日　上田
・宮坂信之　高容量MTXの時代に向けて　社内キックオフミーティング Expert Session　平成23年2月24日　東京
・宮坂信之　内科学・リウマチ学の歴史と現在の課題　札幌国際内科学・リウマチ学シンポジウム　平成23年2月26日　札幌
・宮坂信之　Actemra 日本における臨床経験 その有効性と安全性について　Taiwan Actemra Advisory Board　平成23年3月5日　台北（台湾）

12）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

教　授	宮坂信之
准教授	上阪　等
助　教	平田真哉
助　教	高村聡人
薬害監視学講座教授（併任）	針谷正祥
薬害監視学講座准教授（併任）	南木敏宏
薬害監視学講座助教	田中みち
薬害監視学講座助教	渡部香織
保健衛生学研究科准教授（併任）	窪田哲朗
臨床教育研修センター准教授（併任）	高田和生
GCOE特任講師	岩井秀之
臨床試験管理センター准教授（併任）	小池竜司
大学院生	金子佳代子
	宮部斉重
	長谷川久紀
	細矢　匡
	木村直樹
	福田　真
	山崎隼人
	河野　弘

女性の病気SOS
名医に聞く最善の医療

協力◎読売新聞 医療情報部
イラスト◎こいけゆか
撮影◎本社写真部

file 3

リウマチ

ゆっくり症状が進むため、治療の開始が遅れがちな病気ですが、治療法に劇的な変化が起きています

取材・文◎読売新聞 医療情報部 **渡辺勝敏**

原因 遺伝的な要因もありますが、ストレスも影響します

関節は、骨と骨のつなぎ目でクッションの役割を果たす軟骨や、関節を包む薄い膜である滑膜などでできています。リウマチでは、関節に免疫細胞が集まり、滑膜を攻撃して炎症が起こります。なぜこうした免疫の異常が起こるのかは、わかっていません。遺伝的な要因がまったくないわけではありませんが、それ以外の要因のほうが重要とされています。はっきりしているのは、ストレスで悪化すること。夫の浮気、家庭の不和……ストレスの種はそれぞれです。

リウマチは滑膜から始まる

症状 主に30代から発症します。症状があれば専門医へ

朝、手がこわばる。指がはれて、押されたり、曲げたりすると痛い。こんな症状があったら、どんな病気を疑いますか。手がむくんだ状態とも似ていますが、昼や夕方になるとこわばりや痛みが軽くなるのが、リウマチの特徴です。

リウマチは、外敵から体を守る免疫の仕組みに異常が起こって関節などに炎症が生じる、膠原病と言われる病気の一つ。患者数は30～60歳代を中心に70万人以上、女性が約7割を占めています。病気が進むと、関節の軟骨や骨が壊れて変形し、歩くのが困難になることもあります。

手の症状で気づくことが多いのですが、通常、採血して炎症があるかどうかを調べる血沈やCRP検査、それにリウマチ反応、そして2008年からは抗CCP抗体という血液検査が行われるようになり、早期でもリウマチが診断できるようになってきました。また、エックス線写真に骨の異常が写るのは病気が進んでからです。

疑われる症状があれば、専門医の診断を受けてください。日本リウマチ学会の専門医・指導医が、学会のホームページ（http://www.ryumachi-jp.com/）に掲載されています。

講師 宮坂信之
東京医科歯科大学 大学院膠原病・リウマチ内科学 教授／日本リウマチ学会理事長
みやさか のぶゆき 1947年長野県生まれ。73年東京医科歯科大学医学部卒。同第二内科入局。79年カナダ・ミニア大学医学部サンフランシスコ校留学。95年東京医科歯科大学第一内科教授。日本炎症・再生医学会理事長

治療 対症療法だけでは不十分。寛解が期待できる新薬も

リウマチの治療は、一般の開業医と専門医では薬の選択が異なる傾向があります。一般の医師は、症状を緩和するだけの治療に傾きがちで、専門医はリウマチの進行を抑える治療をします。

症状を和らげる目的で使われるのが、痛み止めや炎症を抑えるステロイド薬（副腎皮質ホルモン）です。ステロイドには、免疫の低下や骨粗しょう症などの副作用もあります。治療の基本は抗リウマチ薬です。抗リウマチ薬にもいくつかの種類がありますが、いずれも効果が表れるまで1ヵ月ほどかかります。1つの薬を3ヵ月使って、効果が薄ければ切り替えていきます。なかでもメトトレキサート（MTX）という薬は関節の破壊を止める作用が強く、治療の基本薬ですが、間質性肺炎などの副作用があり、専門医以外はあまり積極的には使っていません。

そうした薬でも十分な効果がない場合、遺伝子工学で作る最新の薬（生物学的製剤）に切り替えていきます。新しい薬は、治療革命と言えるほど顕著な効果が表れます。ただし、免疫低下による感染症には注意が必要です。また、自己負担が月5～6万円と高額なことも、使用をためらう理由になるかもしれません。

生物学的製剤の特徴

	ヒュミラ®	レミケード®	エンブレル®	アクテムラ®
投与間隔	2週間に1回	初回投与後、2週、6週後に投与し、以後8週ごとに投与	1週間に2回	4週間に1回
投与ルート	皮下投与	静脈内投与（点滴静注）	皮下投与	静脈内投与（点滴静注）
MTX併用の有無	どちらでもよい	必須	どちらでもよい	どちらでもよい

予防 発症1年で最も関節の破壊が進みます。早期治療を

リウマチにならないようにする予防法は今のところありません。ただ、発病から1年間における関節破壊が、それ以降より激しいため、早期に治療を始めれば骨の破壊をくい止めることができます。かつてはリウマチ患者と言えば車いすか松葉づえ、という印象でしたが、今は、きちんと治療をすれば社会復帰できるようになりました。

リウマチにおける関節破壊の経時変化

van der Heijde DM. J Rheumatol 1995;22:1250-1256より作図

次回掲載は2月22日号で「膠原病」を取り上げます

患者会

役に立つ情報を得るために、患者団体も助けになります。「社団法人・日本リウマチ友の会」
〒101-0047 東京都千代田区内神田2-7-7 新内神田ビル3階（平日午前9時半～午後4時半。土・日・祝日休）☎03・3258・6565

皆さんの体の悩みや、知りたい治療法などを募集します

メール▶sos-fkoron@chuka.co.jp ファックス▶03・3561・5926 ハガキ・手紙▶〒104-8320 東京都中央区京橋2-8-7 中央公論新社『婦人公論』編集部宛。いずれも「女性の病気SOS」係まで。匿名でも結構です。いただいた個人情報は、当連載の目的以外には使用いたしません

お知らせ

読売新聞社の医療・介護・健康情報サイト「ヨミドクター」（http://yomidr.jp）の「病院の実力」（閲覧有料）には、全国のリウマチの主要病院一覧が掲載されています。使用する薬の種類など病院による違いがはっきりと数字に表れています。ご参照ください

167

166

朝日新聞 2011年(平成23年)1月20日 木曜日 13版 生活 30

医療

関節リウマチ すぐ診断

欧米の分類基準で早期治療

関節に腫れや痛みが続く関節リウマチ。より早く治療を始めるために、診断（分類）基準が2009年に欧米で変わった。国内の臨床現場でも新しい基準を使う医師が増えており、日本リウマチ学会も近く基準を変更する。治療薬の開発が進み、早期に治療すれば症状を無くすことさえできるようになってきた。（大岩ゆり）

東京都内に住む会社員の男性(32)は昨年初め、左手の親指の腫れと痛みに悩まされるようになった。関節は倍近くに腫れ赤紫色になって熱を帯びた。仕事は装飾品の手作りのため、当初は「手を酷使しすぎたのかな」と思った。

2週間以上たっても親指の関節の腫れと痛みは治まらず、人さし指も腫れ、他の指の関節や手首も痛くなった。水道の蛇口をひねるのも一苦労。朝は手をついて起きると手首に激痛が走り、ひじを使わざるを得なくなった。

近所の外科を皮切りに、3カ所の診療所を受診。痛み止めや湿布、電気刺激によるリハビリも受けたが、症状は治まらなかった。親指の関節が腫れ始めてから半年以上たっていた。

男性は中学時代にけがで入院したことがある慶応大学病院の整形外科を受診。リウマチ内科に行くよう言われた。

リウマチ内科の竹内勤教授は手などの関節を診ながら、男性が腫れを自覚していた関節以外についても次々と腫れがあると指摘。男性は関節リウマチと診断され、抗リウマチ薬のリウマトレックス（一般名メトトレキサート）の服用を始めた。

これ以前に診療所で受けた血液検査でリウマチの疑いは否定されたことなどから、男性は当初、診断に半信半疑だった。が、薬を飲み始めて2週間もしないうちに親指の腫れがひき始め、診断に納得した。薬の服用から2カ月ほどすると、たまに痛みを感じるほかは症状は無くなった。

男性は慶応大学病院を受診する際、原因が何であれ重症に違いないと覚悟していた。しかし竹内さんから「まだ軽いうちに診断がついて良かったですね」と言われ驚いた。

「2009年に欧米のリウマチ学会が作った新しい診断基準を使ったので、この男性の診断が早くつきました。従来の基準では、まだ診断できなかったと思います」と竹内さんは言う。

日本版 年内にも制定

1987年にできた従来の基準は、朝の関節のこわばりが1時間以上続くことや、3カ所以上の関節の腫れなど7項目のうち4項目以上が当てはまれば関節リウマチと診断する、としている。

会社員の男性の場合、当てはまるのは3項目だけで従来なら診断されなかった恐れがあった。

竹内さんが使った欧米の新基準＝チャート＝は、エックス線検査で滑膜炎（骨びらん）などの有無などを確かめる。そのうえで、腫れている関節の数や、リウマチの場合に血中に増えることが多い物質「抗CCP抗体」「CRP」などを調べ、該当する点数を合算する。

日本リウマチ学会理事長の宮坂信之・東京医科歯科大学教授によると、従来の基準は患者約260人の症状を基に作られたが、リウマチを患う平均罹患期間は7・7年で症状は早期のものではなかった。このため早期診断にくいという問題点があった。

リウマチ学会は昨春、「新基準検証小委員会」を作り、国内向けに新基準をどう導入するか検討中だ。委員長の竹内さらが早期リウマチ患者の初診時データを従来基準と新基準で診断したところ、従来基準で診断できたのは半数程度だったのが、新基準では75％が診断できた。

ただ、竹内さんは「国内では、リウマチの専門医以外が最初に診察することが多い。このため、関節リウマチ以外の病気ではないかどうか鑑別する基準の最初のステップが一番の関門」となると予想される」と指摘する。

小委ではリウマチと鑑別が難しい病気をリストアップするなど進めており、欧米の新基準に追加情報を加える形で、年内にも国内向けの新基準を発表する予定だ。

早期発見が強調されるようになったのは最近10年ほど。治療薬の選択肢が増え、早く治療を始めれば症状がほとんど無い「寛解」と呼ばれる状態になる患者も出ている。

「以前はいい薬が少なく、早期診断のメリットがあまりなかった。今は効くスピードも効果も格段に良くなった薬がそろい、早く治療を始めるメリットは大きい。少しでもリウマチを疑ったら専門医を受診して欲しい」と宮坂さんは強調する。リウマチを疑う最初の症状は「痛みを伴う関節の腫れ」という点は新基準も同じだという。

関節リウマチ

自分の免疫の仕組みに異常が生じて起きる病気だが、詳しい原因はわかっていない。全身の関節に炎症が起こり、とくに手足の関節に起きやすい。患者は推計で約70万人。30～59歳が多く、女性の患者は男性の約3倍とされる。主な治療は抗リウマチ薬などによる薬物療法。より効果が高い生物学的製剤も次々と出ている。運動などリハビリテーションも大切。重症化して関節が変形した場合、人工関節を入れるなどの手術をすることも。

アピタル 検索 医療サイト・アピタルに、意見交換や交流ができる「読者ひろば」を開設しています。

「68歳は閑である。淋しい？ 冗談ではない。」
役にたたない日々
佐野洋子
朝日文庫
追悼 佐野洋子さん
この先長くないと思うと天衣無縫に生きたい。思ってはならぬことを思いたい——
余命2年と宣告された婦り道に外車のジャガー1を購入したエピソードのほか、堂々と孤独に生きる美魂の豪快な日々を綴った超痛快エッセイ！
特望の文庫化！
お求めは書店、ASA(朝日新聞販売所)でどうぞ。
http://publications.asahi.com/
ASAHI 朝日新聞出版

関節リウマチ

患者数約70万人、うち女性が7割も

早期発見が最も重要

関節リウマチは、外敵から体を守る免疫の仕組みに異常が起こって関節に炎症が生じる病気だ。朝の指のこわばり、関節の腫れや強い痛みなどの症状が出る。進行すると、関節が傷んで変形し、歩くのが困難になることもある。患者数は30～60歳代を中心に約70万人とされ、女性が約7割を占める。

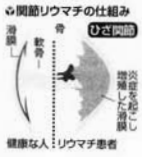
関節は、骨と骨の間のクッションの役割を果たす軟骨、関節を包む薄い膜である滑膜などから成る。

関節リウマチは、関節に免疫細胞が集まり、滑膜を攻撃し、炎症が起こる。滑膜が厚く増殖し、骨が破壊され、関節が変形する。

最近の研究では、発病から1年間における関節破壊が、それ以降より激しいことが分かってきた。東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科教授の宮坂信之さんは「病気をできるだけ早く発見し、患者に合った最適な治療を行うことが、関節破壊や寝たきりを防ぐことにつながる。やはり、治療実績が豊富な病院で、最初に診てもらうことが大切だ」と話す。

治療の基本は薬物治療だ。免疫の働きを抑えるメトトレキサート（MTX）などの「抗リウマチ薬」の飲み薬を最初に使う。しかし、効果には個人差があり、効果があっても数年後には効かなくなることもある。

抗リウマチ薬で病気の進行が抑えられない場合には、炎症を起こす物質の働きを妨げる薬「生物学的製剤」による治療を行う。従来の薬では不可能だった、関節破壊を止める効果もある。



生物学的製剤は現在、4種類ある。投与方法、投与間隔が異なり、患者が自分の生活に合わせて選ぶことができる。読売新聞が日本リウマチ学会の教育施設に対して行った調査では、生物学的製剤の治療を受けた患者数は施設により、850～0人と差があった。

生物学的製剤の特徴を説明する。

①レミケード（一般名インフリキシマブ）承認は2003年で、最も治療実績がある。MTXと併用する必要がある。点滴薬で治療時間は2時間ほど。2回目の治療は、初回の2週間後。3回目は2回目の4週間後。4回目以降は8週間に1度の治療となる。09年7月から、効果が不十分な場合、投与量の増量や投与間隔の短縮ができるようになった。

②エンブレル（一般名エタネルセプト）承認は05年。1週間に2回、皮下注射をする。医師の許可を受けると、自宅で、自分で注射することもできる。

③ヒュミラ（一般名アダリブマブ）承認は08年。2週間に1回、皮下注射する。医師の許可を受けると、自宅で、自分で注射することもできる。

④アクテムラ（一般名トシリズマブ）承認は08年。日本で開発された薬だ。点滴治療だが、レミケードのようにMTXを併用する必要がない。4週間に1回点滴し、1回の点滴に約1時間かかる。

「病気をできるだけ早く発見し、最適な治療を」
宮坂信之さん

内科、外科、リハビリの連携で

生物学的製剤は、免疫反応を抑えてしまうため、肺炎や結核などの感染症にも注意が必要だ。承認から数年たつレミケードとエンブレルによる肺炎の発病率は、投与者の1～2％ほどだ。感染の兆候を見逃さずに対応するには、治療経験が必要で、実績のある病院のほうが信頼が置ける。

生物学的製剤は高額で、3割の自己負担だと、年40万～60万円ほどかかり、ずっと使い続けなければならない。ただし、身体障害者手帳を持っていると、医療費の助成が受けられる。

症状が進んだ場合には手術が行われる。そのうちの一つが、「滑膜切除術」だ。関節に小さな穴を開け、炎症が起きている滑膜を専用の内視鏡でのぞきながら取り除く。痛みを和らげ、症状の進行を抑える効果はあるが、関節の変形を治すことはできない。

関節破壊が進んだ場合には、「人工関節手術」を行う。破壊された骨や軟骨を削り、金属やポリエチレンなどでできた人工関節に置き換える手術だ。関節がなめらかに動くようになり、痛みも減る。今回の調査では、ひざ関節が56％で最も多く、股関節が25％、指や肩などそのほかの関節が19％だった。医療機関によって、得意な手術が異なることがある。

関節リウマチの治療は、①薬物治療を担当する内科医（若年性関節リウマチを治療する小児科医を含む）、②人工関節手術などを行う整形外科医、③曲がったり、破壊されたりした関節を動きやすくするリハビリテーション医――が連携して行うのが理想だ。

日本リウマチ学会では、学会が認定した教育施設などで通算5年以上のリウマチの臨床研修を行ったことなどの条件をクリアした医師を、専門医に認定している。内科医、整形外科医、リハビリ医ともに認定が受けられる。

一方、日本整形外科学会も独自にリウマチ認定医を認めている。専門医が多い医療機関は一般的には重症患者などの治療も上手に行うことができるので、病院の実力を知るための一つの指標となる。

患者の役に立つ情報を得たいなら、最も頼りになるのは患者団体で、「社団法人 日本リウマチ友の会」がある。〒101-0047 東京都千代田区内神田2の7の7 新内神田ビル3階。（平日午前9時半～午後4時半。土・日・祝日休 ☎03-3258-6565）

（坂上 博）

大人の悠遊

からだチェック!

㉕関節リウマチ 手の指がこわばる

じっと手を見る。朝方、手がこわばって動かしにくい、指の関節が腫れていて痛みもあるというのであれば、関節リウマチの可能性がある。その場合、症状は左右対称で、同時に複数の個所に出ることが多い。

リウマチとは、関節が痛んだり壊れたりする病気だ。本来は、外部からの異物に対し自己を防御する免疫機能が、自分の臓器を攻撃してしまう病気（膠原病）の一種でもある。日本人の有病者は人口の約1%。男女比は3対7と、男性患者も少なからずおり、40～50代で発症することが多い。画家のルノワールは、関節が変形したために、晩年を車いすで送り、絵筆を手に包帯でくくりつけて創作を続けたという。

また、関節に起こる火事にもたとえられる。燃え広がるにつれて、関節を構成している軟骨や骨が徐々に破壊され、全身に及ぶこともある。関節は一度壊れてしまうと変形が進み、もはや元通りに治すことはできない。最初の"出火"の原因は明らかではないが、環境要因と遺伝要因が関係しているとされる。いったん発症すると、ストレスやけが、女性では妊娠がきっかけとなって悪化したり、低気圧など気象の影響を受ける人もいる。

こんな症状はありませんか

- 朝、少なくとも1時間は持続する手のこわばりがある
- 手足の3カ所以上の関節が腫れている
- 手首の関節、指の付け根や第2関節が腫れている
- 左右対称に関節が腫れている
- ひじなどの皮膚の下にしこりがある

↓ 関節リウマチかもしれません

医療機関を受診

血液検査（抗CCP抗体検査ほか）・X線・MRIなど

治療は、早期発見・治療に勝るものはない。骨は絶えず破壊と再生を繰り返しているが、リウマチ患者では破壊する細胞（破骨細胞）の働きが勝ってくる。発症して最初の1年が、関節が破壊されるスピードが最も速いので、早めにその働きを止めれば、関節破壊は食い止められる。手のこわばりに加えて、関節の腫れや痛みがあれば、早めに医療機関を受診したほうがいい。リウマチは慢性疾患なので、症状は出たり消えたりしながらゆっくり進行する。見つけにくく、治まっている時にはついそのままにしてしまいがちだ。

2007年から新たな血液検査が保険で受けられるようになっており、血中の抗CCP抗体というマーカーの量を測れば、ごく初期の段階から診断できるようになった。併せて、X線やMRIを撮れば、関節の異常も突き止められる。

抗リウマチ薬はここ10年で画期的な進歩を遂げており、基本は、早期から積極的に薬物療法を行うことだ。服薬して3カ月しても十分な効果が見られなければ、破骨細胞の働きを促しているたんぱく質をターゲットとした生物学的製剤の注射を追加したり、切り替えることになる。さらに難治な場合には、手術も考慮される。

日本では4種類の生物学的製剤が承認されており、いずれも抗炎症効果は高く、かなりの率で症状が治まるだけでなく関節破壊の進行を阻止し、最終的に薬が不要になる人さえいる。遺伝子工学で作り出した薬であることから、高価であることが難点だが、将来の介護などの費用を考えても、トータルで見れば決して高い薬とは言い切れない。

かつて十分な治療法がなかった時代には、リウマチ患者は高齢になるにつれ、脳梗や心筋梗塞などを起こしやすくなるので、一般の人より寿命が10年短いと言われた。日常動作が正常にできる人が3割で、残りの7割は何らかの手助けが必要だったが、この割合はどんどん逆転して、寿命も正常に近づいている。

（塚崎朝子・ジャーナリスト）

ワンポイント

東京医科歯科大学附属病院
膠原病・リウマチ内科 宮坂信之教授

「リウマチによる関節の破壊は最初の1年で最も早く進行するので症状が出始めたら、できるだけ早く見つけることが大切です。予防はできませんが、早期に治療を始めれば薬も効きやすく関節の破壊も進みませんから、決して恐れる病気ではありません」

リウマチ

「リウマチ体操」で関節をほぐして機能を保つ

一般にリウマチと呼ばれる病気は、正確には「関節リウマチ」のことで、関節に炎症が起こる病気のこと。骨と骨のつなぎ目である関節には、骨同士がこすり合わないように軟骨があり、これがクッションの役割を果たしている。

さらに関節には、関節液という潤滑油があって、骨と骨とがぶつからないようになっている。この関節液を作っているのが、その外側にある滑膜。滑りをよくしている膜なので、滑膜と呼ばれている。

リウマチは、この滑膜に炎症が起こる病気で、その炎症が軟骨や骨にまで広がって、関節が壊れてしまい、機能が落ちてしまう。炎症が進むと、軟骨がなくなってしまうこともあり、骨と骨とが直接ぶつかってしまうこともある。こうなると大変激しい痛みを感じ、関節を曲げることもできなくなってしまうのだ。

患者数は70～100万人といわれているリウマチ。男女比は3：7と圧倒的に女性に多く、特に、産後か閉経後に増える傾向にある。

なぜ女性に多いのか？ 理由はまったくわかっていない。それだけではなく、なぜ起こるのか、その原因すら解明されていない。わかっていないことが多い病気なのだ。

この病気の予防法を紹介してくれるのは、東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科の宮坂信之教授。宮坂教授は、同大学附属病院リウマチ内科外来で、多くの患者さんたちに、**自宅でも簡単にできる「リウマチ体操」を指導している。**

「リウマチ体操」はリウマチの悪化を防止する2次予防法で、症状が初期の段階で行うと大変に効果があると宮坂教授は言う。

「リウマチの炎症が起こると関節が曲がってしまうので、リウマチ体操ではこれをしっかり伸ばす練習をしたり、逆に握る練習をしたりします」

関節が固まらないよう、十分に行うことがポイントだ。

実態が知られていないリウマチだが、次のことだけは知っておいてほしいと宮坂教授。

「リウマチは関節が炎症を起こす病気で、炎症が進むと関節が壊れてしまいます。そうなると言葉にできないような痛みを経験することになってしまいます。ですから関節が壊れる前に治療することが何より大切です」

簡単、時間・場所を選ばずできる

東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科
宮坂信之教授

1 体全体をほぐす体操
首をゆっくり左右に回す。ひじを直角に保ち、肩と水平にして開いたり閉じたりを繰り返す

2 親指と残りの各指の先を順番にくっつける。両手同時に行う

3 指先、ひじ、手首の体操
（イラスト右・上）両手の甲を上にしてひじから前に突き出す。手のひらを上になるように手を回す。（イラスト右・中）グーパーを繰り返す

4 座って足踏みをする。体重のかかる股関節の動きを維持できる

5 下半身の体操
座ったまま、左右のひざを交互に真っすぐ伸ばす。体重のかかる関節は十分に動かし、固まらないようにする

6 かかとを支点にして、足先を持ち上げて回す。右回し左回しを繰り返す

7 棒を使って背骨の関節を伸ばす
肩幅よりやや広い位置で棒をつかむ。水平に突き出し、ゆっくりと左右にひねる。

手のひらを内側にして手首を90度曲げる→伸ばすを繰り返す

（120）

3 総合 15版 平成22年(2010年)6月17日 木曜日 産経新聞

医薬最前線

2010年の壁

第2部 《4》

抗体医薬に〝金脈〟の期待

「薬を変えてから関節の痛みはウソのようになくなりました。今は月2回の絵画教室が楽しみ」

7年前から関節リウマチに悩んでいたという田島佐知子さん(56)＝仮名＝は笑顔でそう話すと、手首をくるくるとひねってみせた。

以前は手首を動かすだけで、針で刺されたような激痛が走り、指先には力が入らず、洗濯ばさみすらつまめなかった。それが、昨年1月に薬を変えてからは、スポーツジムにも通えるほど回復したという。

田島さんが使い始めた薬は中外製薬の「アクテムラ」。2005(平成17)年に日本で初めて作られた「抗体医薬」と呼ばれる、新しいタイプの薬だ。

抗体医薬の点滴を受けるリウマチ患者。投与1カ月後に痛みが引いたという＝東京都文京区の東京医科歯科大医学部付属病院

「抗体医薬などの登場でリウマチの治療はこの10年で飛躍的に進歩した」。日本リウマチ学会理事長で、東京医科歯科大の宮坂信之教授はそう語る。

宮坂教授によると、リウマチはこれまで「不治の病」とされ、治療は痛みを緩和するなどの対症療法がほとんどだった。症状を抑えられる患者は1割程度。

しかし新薬の登場で、発症後1年以内に治療を始めれば4～5割は症状を抑えられるようになったのだという。

■■

特許切れが相次ぐ「2010年問題」。製薬各社は、経営を支える新たな新薬の開発を急ぐ。しかし、従来のような「化学合成」の手法による新薬は、すでに開発し尽くされている。そこで、多くの製薬会社が注目するのがアクテムラのような「抗体医薬」だ。

抗体とは体の免疫反応により作られるタンパク質で、体内に入った異物を攻撃したり動きを封じる働きがある。抗体を人工的に培養して作られる薬の総称が「抗体医薬」だ。

中外製薬の松崎淳一・政策グループマネージャーは「抗体はそれぞれ決まった標的(抗原)にしか作用しない特性があり、大量に投与しても副作用が出にくい。薬の量が増やせるので高い効果が期待できる」と話す。

例えば抗がん剤。化学合成の薬ではがん細胞を攻撃しながら、健康な細胞も同時に攻撃してしまうことがある。毛髪が抜けるなどの副作用はそのためだ。それが抗体医薬なら、がん細胞をピンポイントで狙い撃ちできるとされる。

すでに医療現場では多くの抗体医薬が使われ始めており、世界市場の売り上げは上位15品目のうち5品目が抗体医薬だ。

国内では中外製薬や協和発酵キリンなどが長年取り組んできた。最近では創薬に苦しむ大手も参入。アステラス製薬が07年に米バイオベンチャーのアジェンシスを、武田薬品工業も08年に抗体医薬を多く持つアムジェン(米国)の日本法人を買収した。

■■

次世代の医薬品業界を担う医薬品として期待が高まる抗体医薬だが、欠点もある。「高額」である点だ。

製造経費は化学合成薬の10～20倍といわれている。アクテムラも自己負担は月約4万円。同薬を利用した田島さんも「薬の使用が長期間続くと思うと…」と胸の内を語る。

開発された薬の多くがリウマチなど特定の疾病に集中しているため、「抗体の金脈は意外と小さい」との指摘も出始めている。

だが、2010年問題に直面する製薬業界は、可能性を秘めた新たな領域として、抗体医薬に期待せざるを得ない事情がある。

協和発酵キリンは強気だ。同社独自の「ポテリジェント」という技術があるからだ。抗体内の糖を取り除くことで、抗体の濃度が従来の100～1000分の1でも、同等の効果が得られるという技術で、抗体医薬の薬価を下げる可能性を秘めている。

同社抗体研究所の佐藤光男所長は断言する。「これまで『効かない』と商品化されなかった試作品も、濃度を千倍にするなど工夫すれば薬になるかもしれない。この技術で抗体医薬の可能性はさらに広がった」

特集 婦人公論クリニック 40代からの女の病気 こう防ぐ、こう治す

専門医の誌上診察室

膠原病・関節リウマチ

最も大切なのは早期発見。専門医を受診して

どんな病気? 女性が圧倒的に多いのが特徴

膠原病とは、本来は自分を守ってくれるはずの免疫が自身の体を攻撃し、血管や結合組織と呼ばれる場所に炎症が起こる病気の総称です。しかも、ひとたび発症すると慢性化する傾向が強く、これまでは一生つきあう覚悟が必要な難病とも言われてきました。

具体的な病名としては、全国に70万～100万人の患者がいる関節リウマチを筆頭に、全身性エリテマトーデス、強皮症（P27表を参照）、胃潰瘍や肺炎など、普通の病気はひとつの臓器に不調が起こるのに対し、血管や結合組織は体のいたるところにありますから、膠原病の場合は**あちこちの臓器で、「同時多発的」に炎症が起こる**という現象が見られます。

では、いったいなぜ、それらの炎症を起こす免疫の異常が起こるのか。生まれつきかかりやすい体質と、なんらかの環境要因が影響しているとされていますが、その決定的な原因はいまだにわかっていません。

性別で見ると、女性の患者さんが圧倒的に多いのが、この病気の大きな特徴です。たとえば関節リウマチでは、女性と男性の比率が約7対3、全身性エリテマトーデスでは約9対1。こんなにも性差がはっきりしている病気は、ほかに例がありません。発症には女性ホルモンが影響しているという疑いもありますが、女性ホルモンとの関係もまだはっきりと解明されていないのが現状です。

最新治療法 「一生、治らない病気」が、薬で「寛解」するように

原因が特定できないので、決定的な治療ができない。治らないままにどんどん症状が進み、やがて死に至ることもある――ひと昔前、膠原病と言えば、そんな恐ろしいイメージもありました。

ですが、今では膠原病の治療は格段に進んでいます。特に、代表格とも言える関節リウマチに関しては、この数年の間に飛躍的な進歩を遂げたと言ってもいいでしょう。

この関節リウマチは、関節内にある滑膜と呼ばれる部分に炎症が起こり、症状が進むと**関節の骨が壊れてしまい、手や足が満足に動かせない状態**になってしまう病気です。

以前は、ステロイド剤や金剤による治療が中心でしたが、これらの薬では痛みや炎症を抑えることはできても、病気の進行を抑えることは困難でした。それが、1999年に関節の破壊を止めるメトトレキサートという薬が認可され、2003年にはさらに画期的な効果が期待できる生物学的製剤が開発されました。この2つの新薬の登場で、今では関節リウマチ患者さんの約半数が寛解（症状がまったく消失する状態）まで快復できるようになり、元気に日常生活を送れるまでになりました。

それ以外の膠原病でも早期発見・早期治療で治療成績は向上しており、今後さらに新薬が開発されることが期待されています。

セルフチェック 2週間以上続く「微熱」に注意

膠原病は、比較的軽度のものから重度のものまで、あらわれる症状もそれぞれに違う、すそ野の広い病気です。ただ、どの病気にも共通する症状は、**原因不明の微熱が2週間以上続くこと**。風邪などの病気と間違うこともありますが、一般的な風邪の場合は通常1週間以内に熱などの諸症状が治まるのが普通です。それを過ぎてもまだ微熱が続く場合には、必ず病院で診察を受けるようにしてください。

関節リウマチの患者さんに限らず、関節痛や筋肉痛を訴えるケースも目立ちます。関節リウマチの場合は、単なる関節痛では終わらずに、関節が必ず腫れるのが特徴です。

関節リウマチの場合、まず整形外科を訪ねる方が多いようですが、一般に膠原病は全身疾患ですから、内科の範疇にある病気です。特に、関節リウマチは**発症してから最初の1年間に関節の破壊が驚くほど進んでしまう**ケースもあります。3ヵ月間、治療を受けてもよくならないと感じたら、「膠原病内科」や「リウマチ科」を標榜する大学病院などの専門医を速やかに受診したほうがいいでしょう。

予防 「早期発見」が最大の防御

確実な治療法が見つかっていない膠原病は、予防をすることもできません。**最も大切なのは早期発見です。**認知されてからまだ60年程度の歴史しかない病気なので、以前は「膠原病」という診断がなかなかつかず、そのために病状が悪化して亡くなる方も少なくありませんでした。しかし、昨今では医学知識の普及、血液検査やMRIなどの新たな検査法の開発などによって、ごく初期の段階での診断が可能になりました。症状が軽いうちに発症がわかれば、いち早く治療を開始して病気の進行をくい止めることができるのです。

また、**精神的・肉体的ストレスが膠原病を悪化させる**こともわかっています。ストレスのまったくない生活を送ることは無理ですが、膠原病と上手につきあっていくためには、心身ともにゆったりとした毎日を過ごすことが大切です。また、適度の睡眠と休息、それにバランスのよい食事をとることも忘れないようにしましょう。

構成○内山瑞子

おもな膠原病の患者数・性差・好発年齢・症状

疾患名	日本における推定患者数 性差	日本における推定患者数 好発年齢	症状
関節リウマチ（RA）	70万～100万人		関節が痛み、赤く腫れる。朝起きたときに、体のこわばりを感じる。微熱、体重減少、貧血など
	女 70%	30～60歳代	
全身性エリテマトーデス（SLE）	5万人		体がだるい（全身の倦怠感）、疲れやすい、微熱、頬の両側に赤い発疹ができる。前頭部から頭頂部にかけての脱毛、腎臓障害など
	女 95%	20～40歳代	
強皮症（SSc）	9300人		皮膚がむくみ、やがて硬くなる。指が白くなったり、紫色になったりする（レイノー現象）。皮膚に潰瘍ができやすくなる、など
	女 86%	30～40歳代	
多発性筋炎／皮膚筋炎（PM／DM）	4000人		体がだるい、疲れやすい。重いものが持ち上げられない。階段の昇降や、しゃがむのが不自由。食べ物が飲み込みにくい、など
	女 86%	10～70歳代	
シェーグレン症候群（SS）	1万7000人		口や喉が渇く、涙液が減る。耳下腺、顎下腺が腫れる
	女 90%	40～50歳代	
混合性結合組織病（MCTD）	6840人		手指がソーセージのように腫れる。レイノー現象。SLE、SSc、PM／DMのうち、2つの病気の症状が同時に見られる
	女 90%	20～40歳代	
結節性多発動脈炎（PN）	1400人		38度以上の発熱が数週間以上続く。食欲不振、体重減少、全身の倦怠感、筋肉痛、関節痛など
	男女差なし	30～60歳代	

話してくださった先生
宮坂信之 みやさか のぶゆき
（東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科教授、日本リウマチ学会理事長）
1947年長野県生まれ。73年東京医科歯科大学医学部卒業。同第一内科入局。79年カリフォルニア大学医学部サンフランシスコ校留学。95年東京医科歯科大学第一内科教授。日本炎症・再生医学会副理事長。著書に『新版 膠原病がわかる本』など

カラダ健康塾

関節リウマチ

かつて、関節リウマチは治らない病気でしたが、ここ10年ほどの間に革命的ともいえるほど治療薬と治療法が進歩しました。発症しても早期発見・早期治療によって、普通の人と変わらない生活を送ることも夢ではありません。

東京医科歯科大学
膠原病・リウマチ内科教授
宮坂信之 先生
みやさか・のぶゆき◎1947年、長野県生まれ。東京医科歯科大学医学部卒業。米国留学などをへて、95年東京医科歯科大学第一内科教授、2001年より現職。日本リウマチ学会理事長。

関節リウマチの初期症状

- 朝起きたときに手指がこわばる（30分以上）
- 手指、手首、ひじ、肩、足指、足首、ひざなどあちこちの関節が腫れて痛む
- 関節の腫れが左右対称にみられる
- あちこちの関節に腫れが移り変わる

関節の構造

発症は主に30～60歳代

ここ10年の関節リウマチ（以下、「リウマチ」と省略します）の治療の進歩はめざましいものです。長い間、治療といえば対症療法しかなかったのが、病気そのものの治療に一歩踏み出したという意味で、まさしく革命的進歩といえます。

リウマチは誰でもかかりうる病気であり、しかも原因がわからないため予防ができません。だからこそ、ひとりでも多くの方に最前線の治療について知っておいてはしいと思います。ご自分が、あるいは親しい方がリウマチと診断されたとき、適切な治療を選択してほしいからです。

治療については追って説明することにして、まずリウマチという病気についてお話ししましょう。

リウマチは、外敵から体を守る免疫システムに異常がおこって自分の体を攻撃してしまう、膠原病（こうげんびょう）という病気の一種です。手がこわばる、手足の指関節に腫れと痛みが生じるなどの症状から始まり、放っておくと関節が変形して軟骨や骨が破壊されます。やがて日常生活に支障が出て、杖や車椅子が必要になります。また関節だけでなく、肺をはじめとする内臓にも障害をおこす全身の病気です。

日本の患者数は約100万人（人口の約1％）と推定されていて、男女比は3対7と、女性に多いことが知られています。発症年齢は30～60歳代が多いのですが、20歳代や高齢で発症する人もいますから、誰にとっても無縁とはいえないわけですね。出産直後、そして閉経期に発症する女性が多いこともひとつの特徴です。

はじめは関節を包む滑膜の炎症から始まる

リウマチを発症すると、関節で何がおこるのでしょうか。

骨と骨のつなぎ目である関節には、クッションの役目を果たす軟骨や、関節を包む薄い膜である滑膜があります。滑膜は関節液をつくって関節の動きをなめらかにしたり、関節液を通じて軟骨へ栄養を供給したりしています。リウマチを発症すると、この滑膜を免疫細胞が異物と認識して攻撃するため、滑膜に炎症がおきます。リウマチは滑膜炎から始まるのです。

私たちの体は60兆個ともいわれる細胞から成り立っていて、日々古い細胞を壊し新しい細胞をつくるということをくり返しています。骨も同様に、骨を壊す破骨細胞と骨をつくる骨芽細胞があり、両者の働きのバランスがとれていれば骨が健康でいられるわけです。

しかしリウマチを発症して滑膜に炎症がおきると、破骨細胞を元気にするTNFαという物質が大量につくられるために、破骨細胞が骨をどんどん破壊していくことになります。

関節破壊がもっとも早く進むのは発症から最初の1年間

リウマチはいわば、関節における火事だと考えてください。火付

テルミーでプラスα

本文で先生が「体の不調にいち早く気づくことができるのは、あなた自身です」と述べておられます。関節リウマチの初期症状に当てはまるようであれば、早期に専門医の診察を受けて、診断を確定し、的確な治療を早期に開始してもらうことが優先です。

【全身テルミー】

1日1～2回、10～20分を目安にします。症状は諸関節に現れますが、全身が消耗する疾患です。テルミーの継続は自然治癒力を高め、合併症を予防し、リハビリテーションへの意欲を高めることができます。第一～第二様式の気持ちのよい全身テルミーで心身を癒してください。ストレスによる心身の消耗が激しいときには、他働テルミーや家族の愛情あるテルミーで癒してください。

【局所テルミー】

1日複数回、3～5分を目安に増減します。関節部の腫脹、痛み、熱感などが強く激しいときには、病変部に空間法（テルミースコープ、吹きつけ法、爆蒸法）をほんのわずかな時間（秒単位）サラリと適用します（図1）。病変部を冷温器で触れて違和感がなければ、第一様式の軽摩擦法でひと撫でします。

炎症がおさまったら、病変部やその周囲を空間法、摩擦法、点擦法（押して気持ちよく感じる部位）で温めて関節の動きをよくするようにします（図2）。

こわばりを感じる初発症状のときこそ、特に朝の起床時の局所テルミーは、皮膚や筋肉のこわばりを軽減して、気分的にも大変軽やかにさせることができると思います。

図1　指先から手首へ

図2　点擦法

テルミー製品の使い方については指導資格者に気軽にご相談ください。支部の講習会でもお教えしています。

家庭でできるリウマチ体操（上肢の運動）

● 肩をねじる運動
小さく前にならえをした状態で、前腕を外へ開き3～5秒間保持する。

● 腕を上げる運動
前にならえをした状態で、5～10秒間保持する。この位置より上方・側方へも運動を行う。

● 手首の運動
手首を左右同時に起こしたり下げたりした状態で、それぞれ3～5秒間保持する。

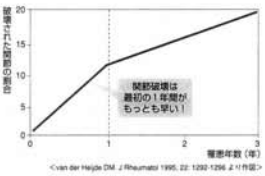
● 前腕を回す運動
小さく前にならえをした状態で、手のひらを上に向けたり下に向けたりするように手首を回し、それぞれ5～10秒間保持する。

● ひじの屈伸
ひちを手首にかけ、左右交互に前後方向へ動かした状態で、それぞれ5～10秒間保持する。

● 手指の運動
指を大きく開いたり握ったりした状態で、それぞれ3～5秒間保持する。

※運動の時期・種類・回数は医師や理学療法士に相談した上で行いましょう。
＜宮坂信之著「新版 膠原病がわかる本」（法研）より作図＞

関節リウマチにおける関節破壊の経時変化



<van der Heijde DM. J Rheumatol 1995, 22: 1292-1296 より作図>

関節リウマチに侵されやすい手の関節

日は関節リウマチに侵されやすい関節

早期治療につなげるために大切なこと

体の不調にいち早く気づくことができるのは、あなた自身です。おかしいなと判断する目安を覚えておきましょう。

朝、起きたときに手がこわばってものが握りにくい状態が30分以上続くことはありませんか。患者さんのなかには、そのときの手の感じを「はばったい」と表現する人もいます。あわせて、手足の指の小さな関節が腫れて痛みます。それも1か所だけでなく、何か所かが左右対称に腫れることが多いのです。この2つの症状があったらリウマチが疑われますので、できるだけ早く病院へ行きます。

今は検査法が進歩して、リウマトイド因子（いわゆるリウマチ反応）以外に血沈やCRP、抗CCP抗体、超音波やMRIなどの検査も行われています。また診断基準も変わり、より早い診断が可能になっています。自分で発見し、病院で診断を確定し、的確な治療を開始する、この流れをスムーズに進めるために、ぜひリウマチ専門医の診断を受けてください。慢性疾患であるリウマチと根気よく付き合うためにも専門医は欠かせません。

早期からの積極的な治療により寛解に達する人も

従来の治療は、まず痛み止めと炎症を止めるステロイドの投与から始めていました。この2つの薬は、症状を和らげるための対症療法の薬です。これらを使って症状がおさまらないときに抗リウマチ薬が使われていたのです。

新しい治療は、リウマチの進行を抑える抗リウマチ薬の投与から始めます。抗リウマチ薬は効果が出るまで1か月はどかかるので、その間、症状がつらければ痛み止めやステロイドを併用します。抗リウマチ薬のなかでも、メトトレキサートと呼ばれる薬が治療の中心になっています。

抗リウマチ薬で効果が出にくい場合に、従来は手術を行っていましたが、今は新たな薬を使えるようになりました。この薬がリウマチ治療に革命をもたらした生物学的製剤（バイオ医薬品）です。

生物学的製剤は遺伝子組み換え技術を用いて生物からつくった薬であり、破骨細胞を元気にする腫瘍壊死因子（TNF-2）やインターロイキン6（IL-6）をピンポイントで攻撃します。現在4種類の薬があり、それぞれ約8割の人に有効という結果が出ています。ひとつの薬が効かなくても別な薬に切り替えて効果が出る人もいて、しかも即効性があります。

この製剤はすでにめざましい成績をあげており、発症後6年ほどの人で寛解（薬を使いながら症状が出なくなる状態）に入る人が40%もいます。オランダのデータでは、発症1年以内に生物学的製剤を使い始めた人の約半数が薬剤を中止し、寛解に入っています。早期から積極的に治療することで、リウマチが治療する可能性が出てきたのです。

問題は薬の副作用です。もちろん、痛み止め、ステロイド、抗リウマチ薬も例外ではありません。そして生物学的製剤の副作用でもっとも注意を必要とするのが、免疫力が低下して肺炎や結核などの感染症にかかりやすくなることです（感染症の予防ワクチンを接種するなどの対策により、副作用を最小限にとどめることができます）。この製剤が攻撃するTNFαやIL-6は、感染を防御する良い働きもしているからです。

また、生物学的製剤は保険診療でも月に5～6万円の治療費がかかるために使用を躊躇する方がいます。しかし、この薬を使うことで社会復帰の道が開ければ、トータルの医療費はむしろ安くなるかもしれません。

リウマチ体操は毎日根気よく

患者さんにとって治療とともに大切なのがリハビリテーションで

日本リウマチ学会のホームページ

リウマチ専門医・指導医を検索できます。
http://www.ryumachi-jp.com/

日本リウマチ友の会

患者を支えるための組織。
東京都千代田区内神田3-7-7
新内神田ビル3階
TEL.03-3258-6565
http://www.nrat.or.jp/

週刊朝日MOOK

本誌は収益の一部を、日本の対がん活動のために寄付します。

女性のための「いい病院」

おんなの気になる病気と医療の新常識

気になる症状からチェックするおんなの病気

頭痛／めまい／月経血過多／頻尿・尿もれ
ひくみ／冷え／産後うつ／イライラ
眠れない／性交痛／セックスレス…

気になる病気と頼れる病院の選び方

乳がん／子宮頸がん／子宮体がん
卵巣がん／子宮筋腫／子宮内膜症
子宮腺筋症／月経トラブル／性感染症
更年期障害／尿のトラブル／骨粗鬆症
膠原病／甲状腺の病気／大腸がん

おんななら「生」と「性」のプロになろう!

part 1 ギモンだらけのおんなの医療「目からウロコ」の真実とは?
20代や30代の「乳がん検診」、ほとんど意味がない!?
「子宮頸がん予防ワクチン」はセックス経験者にはムダ?
メディアにあふれる医療情報の半分は「科学的根拠」なし!?

part 2 おんなの「生」と「性」は脳とホルモンに支配されている

part 3 おんななら知っておきたい「産むこと」の最新医療

安心して受診したい美しくなるための医療

<美容医療>
美容外科医を選ぶための三つの条件…
<歯科医療>
予防歯科／矯正歯科
審美歯科／インプラント治療

婦人科以外の女性に多い疾患編［膠原病］

関節リウマチ

新薬が相次いで承認 治癒も夢ではない

朝起きたときの、体や関節周囲のこわばりが特徴です。関節の腫れ（炎症）もあります。症状は全身に多発し、左右対称に現れることが多いようです。

病気が進行すると、関節の破壊、筋の萎縮、腱の断裂などにより、特有の関節変形が起こります。ひざの場合は人工関節置換術を行いますが、最悪のケースでは関節を固める手術をすることも。疑いがあれば、早めに専門医を受診しましょう。

「診断は、問診、診察、血液検査、X線検査などで総合的に行いますが、現在では、関節炎があり、しかも血液検査で抗CCP抗体が出たら、まずまちがいなく関節リウマチと診断します」（宮坂科長）

治療は薬物療法が中心。高い効果が期待できる新薬の登場により、ここ数年で関節リウマチは治癒が可能な病気になってきました。抗リウマチ薬「メトトレキサート」と、生物学的製剤を併用することで、50％以上の患者が寛解（症状がなくなること）します。2010年7月に承認された「オレンシア」を含め、現在日本で使える生物学的製剤は5種類。治癒の可能性が高まっています。

主な膠原病の推定患者数と女性患者の割合、発症年齢

疾患名	推定患者数（日本）	女性患者の割合	発症しやすい年齢
関節リウマチ	70万～100万人	女性70%	30～60歳代
全身性エリテマトーデス	5万人	女性95%	20～40歳代
シェーグレン症候群	1万7000人	女性90%	40～50歳代
強皮症	9300人	女性66%	30～40歳代
多発性筋炎／皮膚筋炎	4000人	女性66%	10～70歳代
結節性多発動脈炎	1400人	男女差なし	30～60歳代

※その他の膠原病についての情報は、「膠病情報センター」（http://www.nanbyou.or.jp/）を参照してください。

「膠原病」の病院・医師探し 6の条件

1. 病気や治療の説明に時間をかける
2. いきなり検査をしない
3. きちんと診察をする
4. 日本リウマチ学会の専門医である
5. 新薬の情報に詳しい
6. 整形外科などとの連携ができている

全身性エリテマトーデス（SLE）

ステロイド薬が第一選択 恐れずしっかり服用を

SLEは、圧倒的に女性に多い病気です。患者さんの中心年齢は20歳代と若く、約40％を占めます。病気が活動期にあるときは、蝶の形をした発疹が、ほおにできるのが特徴。日光に当たると悪化するので注意が必要です。

病気が進行すると、腎炎になって体がむくんできます。さらに重症になると、けいれんやうつ状態といった、中枢神経症状が現れます。診断は、専門医がアメリカリウマチ学会の作成した分類基準を用いるなどして、総合的に判断します。

治療の中心は、抗炎症効果と免疫抑制効果のあるステロイド薬です。症状が皮膚や粘膜に限られる場合は、皮膚にステロイド外用薬を用います。本格的な治療には、ステロイド薬を一定量飲み、効果が不十分な場合には免疫抑制療法を行います。

「皮膚症状だけの初期に診断されれば、薬の量は少なくてすみます。また、ステロイドを恐れるあまり、途中で飲まなくなる人がいますが、救急車で運び込まれることになりかねないので、自己判断は厳禁。腰を据えてきちんと飲むことが大切です」（宮坂科長）

157

早期発見、早期治療すれば普通の生活も可能

膠原病

●膠原病の三つの顔

女性に多い病気で他の病気との判別が困難

膠原病とは、一つの病気の名前ではなく、複数の共通の特徴を持つ病気の総称。関節リウマチや、全身性エリテマトーデス（SLE）などがその代表です。関節リウマチを除く、多くの膠原病が難病指定を受けています。

「膠原病の共通点を簡単にいうと、『体の中の結合組織（血管や骨や軟骨など）に炎症が起こる』病気と表現できます」

東京医科歯科大学膠原病・リウマチ内科診療科の宮坂信之科長は、こう説明します。

また膠原病は、全身の臓器に症状が現れることも特徴で、体のあちこちで、同時に炎症が起こります。共通する初期の症状も、発熱、食欲低下、体重減少、関節痛、筋肉痛など、ほかの病気と見分けがつきにくいものばかり。炎症が起こるのは、自己を異物から守る免疫のしくみがエラーを起こし、自己を攻撃してしまうからですが、その原因はまだわかっていません。

圧倒的に女性の患者さんが多いため、女性ホルモンが関与していると考えられていますが、はっきりしたことはわかっていないのが現状です。

またこれまでの研究から、発症には遺伝が関係していると推測されていますが、同じ遺伝子を持つ一卵性の双子でも、一方がSLEになった場合のもう一方の発症する確率は25％程度。そのため、遺伝要因を持っている人の発症には、感染症、ストレス、薬物、妊娠・出産といった、環境要因が大きく影響していると考えられています。

10年以上前までは、原因のわからない膠原病には有効な治療法がなく、効果も思わしくありませんでした。しかし、宮坂科長は力強くこう話します。

「早期発見、早期治療ができれば、膠原病でも普通に生活できます。関節リウマチなら治癒も夢ではない。やみくもに恐れる病気ではなくなったのです」

多種多様な膠原病

膠原病には、さまざまな種類がありますが、共通して上記のような三つの疾患的特徴があります。病気によって、症状が現れる場所が違ったり、症状そのものが違ったりします。縦じて、複数の臓器に不具合が出ることが多く、そのため、治療期間も長期にわたることになりがちです。

156

STEP1◈正しい理解が治療のはじめの一歩

関節リウマチという病気を知る

発症の原因が未だ解明されていない関節リウマチとは、どのような病気なのか。そして、どのような対処が必要になってくるのか。まずは、リウマチという病気の正しい知識を学ぶことが基本となります

監修・東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学教授
宮坂信之

リウマチは、関節の中の火事

関節リウマチ（以下、リウマチ）とは、原因不明の多発性、対称性の関節炎です。中年の女性に多く、関節の軟骨や骨の破壊が起きます。ときには内臓にまで症状が伴います。

簡単にいうと、関節の中で起こっている火事です。関節に火事が起きると炎症が起こり、痛みが起きます。さらにこの炎症を放っておくと、関節にある滑膜から、軟骨、さらに骨の破壊へと進んでいきます。

こうした症状は、徐々にゆっくりと進むため、早期では見つけにくい病気なのです。また、症状がよくなったり、悪くなったりを繰り返すため医者に行くのが遅れるのも特徴です。

リウマチによる関節炎が進行し、変形を起こす、関節が壊れる、それによって機能障害が起こるといったことで、日常生活の動作が障害されてしまうというのが一番問題となります。

リウマチが発症後、関節の破壊の進行は最初の1年間がもっとも速く進みます。

そのため早期から積極的に治療を始めることで、日常生活に障害を残すことなく寛解（症状のない状態）も期待できるようになりました。

日本リウマチ友の会の2000年のリウマチ白書によると、リウマチ患者さんのうち、日常生活がほぼ普通に生活できる人が3割ぐらいしかいませんでした。残りの7割の患者さんは、日常生活が不便だと感じているようです。

これまでリウマチはとても「てごわい」相手だったといえるでしょう。

関節炎から骨が壊れる

リウマチの発症のメカニズムは、まだ十分にわかっていません。

発症早期では、まだ自覚症状が十分に感じられないこともあります。そのため、じわじわと症状が進み、気がついたときには、炎症が拡がって滑膜から軟骨まで破壊が進んでいることもあるのです。

リウマチでは、最初から軟骨や骨がいきなり壊れるわけではありません。滑膜に炎症が発生し、そこに集まった免疫細胞から、TNF-αなどのサイトカイン（炎症性サイトカイン）が分泌されることにより、少しずつ軟骨や骨が破壊されていきます。

では、なぜ骨の破壊が進むかというと、破骨細胞がTNF-αなどの炎症性サイトカインによって活性化されるからです。

通常は、骨の中では、骨を形成する骨芽細胞と骨を溶かし破壊する破骨細胞のバランスが取れています。

しかし、リウマチでは、炎症性サイトカインの作用により破骨細胞が優位になることで関節破壊は進みます。

こうした破骨細胞の働きを阻害するのが、リウマチの治療薬として使われる生物学的製剤です。

リウマチの問題点は関節破壊だけでなく、人間の寿命を縮める病気でもあることです。欧米では、リウマチ患者の死亡リスクは、一般人の約2～3倍高いといわれています。

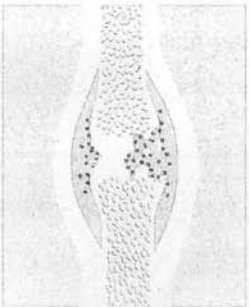
これまでは、リウマチはただ単に関節が動かなくなる病気に過ぎないと考えられてきたために、痛み止め（消炎鎮痛薬）などを使いながらゆっくり時間をかけて治療する方針が一般的でした。

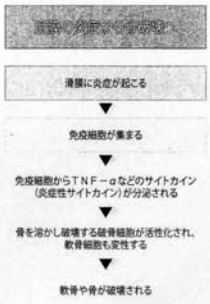
しかし、実際には関節機能だけではなく、寿命にまで影響を与える病気であることから、最近ではリウマチを早くから積極的に治療する方針に変わってきています。

しかも、早期から治療することで寛解になりやすいこともわかっており、早期診断・早期治療が大切であることは言うまでもありません。

リウマチの診断も、診察、血液検査、X線検査などを組み合わせることで、きわめて早期から診断ができるようになっています。

リウマチという病気の正しい知識を身につけ、正しい治療法や正しい対処をすることがなにより大切だということです。





関節リウマチにおける関節破壊の経時変化

van der Heijde DM, J Rheumatol 1995; 22: 1293-1296 より

長11 特集 2010年（平成22年）12月27日 月曜日 信濃毎日新聞 第三種郵便物認可

第64回 信毎健康フォーラム

長野市

第64回信毎健康フォーラム（信濃毎日新聞、信毎文化事業財団主催、キッセイ薬品工業協賛）は、「膠原病―関節リウマチなどをめぐって」をテーマに、18日、長野市の若里市民文化ホールで開いた。

膠原病は、体と体をつなぎ合わせている結合組織や血管に起きる多くの疾患の総称だ。専門医が少なく難しい病気との印象があるが、一部を除いて早期発見、早期治療によって著しく改善する時代を迎えている。600人が参加したフォーラムでは、「どんな病気か」「診断と治療」「日常生活での注意点」などをめぐって解説報告とパネルディスカッションを行った。

宮坂信之・東京医科歯科大教授、松田正之・信大医学部准教授の講演とパネルディスカッションの要旨を報告する。

（司会は編集委員・飯島裕一）

膠原病 症状改善の鍵は

どんな病気か

東京医科歯科大教授 宮坂 信之さん

膠原病は血管と結合組織に炎症が起きる「結合組織疾患」です。関節痛を起こす「リウマチ性疾患」でもあり、本来は体内に侵入した病原体を攻撃するはずの免疫が、自分の体に反応してしまう「自己免疫疾患」でもあります。このように、膠原病には三つの顔があります＝図参照。

膠原病患者の免疫が、なぜ自分の体に反応するのか原因は分かっていません。予防できないので、早く見つけて治療を始めることが大切です。

膠原病になりやすくなる遺伝子が存在することが分かっています。しかし、遺伝性は極めて低い。一卵性双生児の一人が膠原病（全身性エリテマトーデス）になった場合、もう一人が発病する確率はおよそ25%。同一家系に複数の患者が発生するのは極めてまれです。特定の遺伝子を持つ人に、病原体など何かしら悪い環境が加わることで膠原病が引き起こされると考えられています。

患者の多くは女性です。では、女性ホルモンが病気と関係しているのでしょうか。膠原病の一種、関節リウマチの患者は、性ホルモンの分泌が減少傾向にある30～50代が多い。つまり、性ホルモンだけが原因とは言えず、なぜ女性患者が多いのかは謎のままです。

三つの顔 早く見つけ、治療を

膠原病の代表的な症状は発熱と関節炎です。インフルエンザと似ていますが、インフルエンザの場合、こうした症状は続いても1～2週間。膠原病の場合は何カ月も続きます。また、かゆくない発疹が出ることもあります。

膠原病による発熱には、悪寒はあってもガタガタ震える「戦慄」は起こりません。また、発熱の割に全身の状態が良い。熱が出ていても本人は意外とけろっとしています。午前中から発熱する特徴もあり、こうした症状が出ている場合に膠原病を疑います。

関節が腫れます。痛風は足指の付け根などに尿酸がたまって起こり、大抵は体のどこか1カ所が痛くなり、赤く腫れ上がります。一方、膠原病は複数箇所が痛くなるという違いがあります。痛む部位は、腫れてうずきますが、痛風のように赤く腫れて熱を持つことはありません。

また、血管平滑筋がけいれん状に収縮する「レイノー現象」が起きます。動脈の平滑筋が縮むと手の色が白くなり、静脈の方が縮むと紫色になります。

膠原病はどうやって診断するのか。医師は患者の話をよく聞いて、発疹の有無や関節を見ます。その上で膠原病が疑われれば、血液や尿を調べ、エックス線検査やCT検査などを行います。

代表的な症例を紹介します。1例目は関節リウマチ（RA）。まず関節炎が起こり、症状が悪化すると関節が破壊されます。骨を破壊する細胞を活性化する物質が大量に作られてしまうためです。

症状が始まってから1年ほどで急速に悪化するため、早期に診療を始めることが大切です。今は簡単に診断できるようになったので、気になる症状があれば早めに診察を受けましょう。

2例目は全身性エリテマトーデスです。赤い発疹ができ、日光にあたると症状がひどく悪化します。脳や腎臓にも炎症を引き起こします。

治療薬の一つはステロイドです。ただ、免疫が落ちることで感染症にかかったり、骨粗しょう症、糖尿病になったりする副作用があります。しかし、医師の指示なく服用を止めると、熱が出たり、血圧が下がったりする恐れがあり、注意が必要です。

膠原病に含まれる病気

- 関節リウマチ
- 全身性エリテマトーデス
- 多発性筋炎／皮膚筋炎
- 結節性多発動脈炎
- 強皮症
- 混合性結合組織病
- シェーグレン症候群
- ベーチェット病
- ウェゲナー肉芽腫症
- 高安病
- リウマチ性多発筋痛症
- 再発性多発性軟骨炎

膠原病3つの顔

（宮坂信之教授による）

みやさか・のぶゆき 東京医科歯科大教授、副学長。日本リウマチ学会理事長。専門は膠原病内科学。1947年生まれ上田市出身。東京医科歯科大医学部卒。

診断と治療

信大医学部准教授 松田 正之さん

膠原病の代表例、関節リウマチ（RA）の治療はこれまで、症状の出始めは安静にし、痛みが増してきたら痛み止め、それでも耐えられなければステロイド、抗リウマチ薬を服用するという方法をとっていました。リウマチはゆっくりと症状が悪化すると考えられてきたからです。

しかし近年の研究で、RAは最初の数年で急速に症状が悪化することが明らかになりました。早期の治療が大切なのです。

治療薬のうち、抗リウマチ薬には、RAが悪化すると起こる関節の破壊を抑制する効果がありますが、痛み止めやステロイドにはこうした効果は少ないといわれています。このため、長期的には抗リウマチ薬を中心に使用することが重要です。

抗リウマチ薬の中で最も強力なのがメソトレキセートです。約1カ月で効果が出てきますが、注意すべき副作用に、口内炎や肝機能の悪化、白血球の減少、間質性肺炎などがあります。妊婦が服用すると、肢体の不自由な子どもが生まれる可能性が高くなります。

抗リウマチ薬は、長期間使用すると効き目が低下することがあります。また、患者さんがリウマチの悪化を抑えられたように感じても、エックス線写真では関節破壊が進んでいることもあります。

医師の指示 きちんと理解して

服用方法が薬によってまちまちなので、医師の指示をきちんと理解することが大切です。

近年はRA治療の切り札として、最先端の医療技術を用いた「生物学的製剤」が出始めました。国内では現在、5種類の生物学的製剤が使用できます。皮下注射や点滴で使用します。

生物学的製剤の注意点に、投与時反応があります。体内に異物であるタンパク質を入れるため、アレルギー反応が起きやすく、発疹やかゆみ、悪寒、血圧低下などが起こることがあります。

また、使用により免疫力が落ちるため、感染症を起こす恐れが高まります。このため、冬季はインフルエンザワクチンを接種します。結核にも注意が必要です。

一方、シェーグレン症候群（SS）では、口の中や目が乾きやすくなり、虫歯や眼精疲労につながります。人工唾液や唾液分泌促進剤、目薬が有効です。

唾液分泌促進薬は高い有効性が期待できる半面、唾液や涙だけでなく汗がたくさん出たり、腹痛や下痢などが起きたりすることもあります。少量から少しずつ増やしていく必要があります。また、虫歯予防にはうがいが有効です。室内の加湿や、まばたきを意識して行うことで症状を軽減することができます。

まつだ・まさゆき 信大医学部准教授。専門は膠原病内科学、神経内科学。1959年生まれ諏訪市出身。信大医学部卒。

パネル討論

多い女性患者 ホルモンも関係

―膠原病ではないかと疑いを持った場合、どのような診療科を受診したらよいのでしょうか。

宮坂 関節リウマチの場合は、内科と整形外科のいずれかです。全身性エリテマトーデスや筋炎などほかの膠原病は内科です。

―県内で膠原病の専門医がいる医療機関は。

松田 県厚生連篠ノ井総合病院（長野市）や信大病院（松本市）に専門科があります。膠原病科とは掲げていませんが、県厚生連佐久総合病院（佐久市）、飯田病院（飯田市）、飯田市立病院（同）にも専門医はいます。

―膠原病の患者の男女比は。

宮坂 関節リウマチでは女性が7、8割。全身性エリテマトーデスになると9割が女性です。詳しい理由は分かっていませんが、病気の勢いに、ホルモンが関係しているのは事実のようです。

―遺伝を心配する質問が多く寄せられています。

宮坂 遺伝することはありますが、親子そろってリウマチという患者は極めて少ない。複数の遺伝子の組み合わせが関係していることが分かっており、過度に神経質になる必要はありません。

―「寛解」や「完全寛解」とはどういうことなのですか。

松田 寛解は症状が全くなく安定した状態のことです。関節リウマチでは、炎症が完全に抑えられて、痛みがなく、骨の破壊が進んでない状態で、生活の活動性がほとんど損なわれていないと完全寛解ということになります。

「膠原病」をテーマに、具体的な症例や治療法などを挙げたパネルディスカッション

うまく付き合う方法を探して

―悪性関節リウマチに対しては誤解も多いようですが。

松田 関節リウマチの進行が早いものと勘違いしている人もいますが、血管炎を伴うのが悪性関節リウマチです。神経がまひして、うまく動かなくなったり、しびれが出たりします。足の潰瘍もよく見られます。

―治療薬ステロイドには副作用があり、もろ刃の剣という話がありましたが、使用上の注意点は。

宮坂 副腎から出る副腎皮質ホルモンを薬にしたのがステロイドです。免疫や炎症を抑えます。中年以降の人には骨粗しょう症が起こりやすいため骨粗しょう症の予防薬を一緒に処方しています。

―抗リウマチ薬のリウマトレックスに対してどれくらい使い続けていいかという質問がきています。

松田 必要があれば、できる限り続けたほうがいいと思います。服用を完全に止めて、リウマチが再発した場合、再び服用し始めても、効くとは限りません。少量であっても続けるのがいいと思います。

―生物学的製剤は高価なため、患者にとって負担も大きいようです。

宮坂 医療費が3割負担の人でも、生物学的製剤を使うと月に4、5万円ぐらいかかります。短期的に見ると、月4万円は大変。しかし、この薬を必要な人にきちんと使うと、関節が壊れるのを防げるだけでなく、関節の機能が正常に戻ることが分かっています。短期的な視点でなく総合的に考えて、どんな薬がいいのか決める必要があると思います。

―新薬への期待は大きいです。今後どういった薬が登場するのでしょうか。

宮坂 生物学的製剤の登場で関節リウマチの治療は180度変わり、治せる病気になりつつあります。問題は、お金が高いことと、感染症などの副作用です。臨床試験中の生物学的製剤が何種類かあり、これが数年の間に出てくると思います。

―膠原病と診断された場合、日常生活の注意点や、家族や周囲が気を付けることは。

宮坂 病気とうまく付き合う方法を探すことです。膠原病は強い敵ですから、やっつけて倒すことは難しい。友達として相手を怒らせないよう付き合うことが大切です。

―膠原病の民間療法は問題も多いですね。

宮坂 正しい治療があるのだから、きちんと受けることが非常に大切です。

松田 悪質なものが多いので気を付けてほしいです。

―特に強調しておきたいことを一言ずつお願いします。

宮坂 病気を敵にしないことと家族や友人のサポートを受けることが膠原病とうまく付き合うこつだと思います。

松田 膠原病には良い薬がいろいろ出ていますが、患者さんそれぞれの事情で治療は変わってきます。一度専門の先生を受診してもらい、どんな治療法がいいか検討されるのがよろしいと思います。

パネリスト2人の説明を熱心に聞く参加者

長野市内 パート・アルバイト募集 大久保西の茶屋 ☎026-254-2266
長野駅近隣 パート・アルバイト募集 (株)NTTソルコ ☎0120-181-832
長野駅前 タイ式セラピスト募集 ほかぽっかタイマッサージ ☎026-228-8987
広告料金 1回掲載＋Web3週間 21,000円（税抜20,000円） 2回連続掲載＋Web4週間 31,500円（税抜30,000円）
パート アルバイト情報 月曜・木曜 掲載 http://job.shinmai.co.jp/
ブールデルが，ジャコメッティが，藤田嗣治がいた。1920年代のパリで育まれた愛と友情と制作の日々
青春のモンパルナス 1923-1928 清水多嘉示滞仏記 井上由理 著 好評発売中！ B5判・100頁 図版240点 定価1680円（税込み）
お求めは書店・信毎販売店へ 信濃毎日新聞社出版部 〒380-8546 長野市南県町657 TEL.026-236-3377 FAX.026-236-3096

【第三種郵便物認可】 【全面広告】 日本経済新聞 2010年（平成22年）12月27日（月曜日） 22

広 告

進歩した関節リウマチ治療を、結核でストップさせない。

――まずは事前の対策。次いで早期発見と専門家の対応――

話し手 森　亨 氏
財団法人結核予防会結核研究所 名誉所長、ストップ結核パートナーシップ日本 代表理事

宮坂 信之 氏
東京医科歯科大学大学院 膠原病・リウマチ内科学 教授
日本リウマチ学会理事長

司会 後藤　眞 氏
桐蔭横浜大学医用工学部生命・医工学科 不老科学・加齢制御学部門 教授
日本リウマチ財団ニュース 編集委員長

後藤 眞 氏　　森　亨 氏　　宮坂 信之 氏

関節リウマチの治療が現在、著しく進歩している。かつては関節の腫れや痛みを抑えることすら難しかった難病だったが、「生物学的製剤」と呼ばれる新しい治療薬の登場により、自覚症状のほとんどない状態を達成し、関節が壊れてしまうことを抑制することもできるようになった。
しかし、この新薬「生物学的製剤」には、結核を新たに発症する危険性があることも分かっている。そこで、財団法人結核予防会結核研究所・森 亨 氏、東京医科歯科大学・宮坂信之 氏に、最新の関節リウマチ治療と適切な結核対策の連携についてわかりやすく語っていただいた。

関節リウマチ治療を大きく変えた新しい治療薬

—近年、関節リウマチの治療は著しく進歩しましたね。

宮坂：関節リウマチの治療が大きく変化した最大の理由は、関節破壊の進行を抑制することができる有効な治療薬が次々に登場したことです。その代表例が関節リウマチ治療において中心的な存在となっている薬「メトトレキサート」です。そして、メトトレキサートで十分な効果が得られない場合には、「生物学的製剤」という、より新しい治療薬を併用することで、関節破壊が進行するのをかなりの確率で止めることができるようになりました。従来は関節リウマチの治療といえば、痛みや腫れを抑える「対症療法」が中心でしたから、本当に大きな変化が起こったことになります。これからは、メトトレキサートと生物学的製剤を適切に使用することで、5年、10年と経過しても、関節は破壊されず、日常生活にも支障を来さないで過ごせる患者さんが増えていくと思います。

—メトトレキサートと生物学的製剤以外の一般的な薬（抗リウマチ薬）を用いた薬物治療を始める時期も早まりましたね。

宮坂：その通りです。これまでは関節リウマチが発症してから5年、10年が経過し、かなり病状が進んでしまった患者さんに、抗リウマチ薬や生物学的製剤を使用していました。しかし今では、リウマチと判明した早期から積極的な治療、つまり関節破壊が出現する前からこれらの治療薬を使用することで、病気の進行を抑制するだけでなく、関節が全く壊れていない状態のままで、炎症のあった関節の働きを回復させる可能性があることも分かってきました。

—関節は一度壊れてしまうと、もう治らない、修復できないと考えられていました。しかし、破壊の程度が軽度であれば修復が可能だということでしょうか。

宮坂：膝や股関節のような大きな関節は、一度壊れてしまうと、もう元には戻らないと思いますが、手指の小さな関節であれば、しっかりと治療することで、修復が可能となる場合もあり、関節の働きが回復する可能性は十分にあると考えられます。

生物学的製剤を使用する際には事前の結核対策が大切

—生物学的製剤は新しい治療法ですから、有効性が高い半面、どのような副作用があるのか気になります。一説には「結核にかかりやすくなる」と言われていますね。

宮坂：もともと関節リウマチの患者さんは、発症してからの期間が長くなると、リウマチに関連した病態が肺に生じやすくなる上に、治療の一環として経口ステロイド（副腎皮質ホルモン）やメトトレキサートのような免疫を抑制する薬を使うことも多いため、一般の健康な方に比べて感染症には約2倍かかりやすいと言われていました。そのかかりやすいという感染症のなかでも、注意が必要なのが呼吸器感染症、特に肺炎と結核です。肺炎に関しては、最近はかかりやすい方にはインフルエンザワクチンや肺炎球菌ワクチンを接種する、口腔内ケアを行うといった事前対策を行うことで、かなり発生数を減らすことができました。しかし問題は結核です。結核の発生頻度はなかなか減らず、問題になっています。

—関節リウマチの治療で結核が問題になるのはなぜでしょうか。

宮坂：すでにお話ししたように、関節リウマチの患者さんはもともと結核にかかりやすいのです。さらに生物学的製剤の中でもTNF阻害薬は結核の再燃をひき起こすことが知られています。そのため、生物学的製剤を使用するときには、事前に結核にかかっているかどうか、結核にかかったことがあるかどうかを十分調べます。具体的には、問診時に患者さんやご家族に以前に結核にかかったことがないかを尋ね、現在咳や痰が出ていないかを確認します。そして、胸のレントゲンを撮り、結核を疑うような影があればCT検査も行って、以前にかかった結核の跡がないかどうかを確認します。さらにツベルクリン反応を実施して、以前にかかった結核が再び目を覚ます可能性がないかどうかも調べます。その上で、結核が再び発症する可能性の高い患者さんに対しては、結核の予防薬を投与してから生物学的製剤などを使用することになっています。

結核は感染してから何十年も体内に潜んでいる

—結核とはどのような病気なのでしょうか。

森：結核は結核菌という細菌に感染することで生じる病気です。麻疹（はしか）やインフルエンザのような感染症では、ウイルスを吸い込んでから数週間や数日後に熱や発疹が出て発病するという経過をたどります。結核の経過は単純ではありません。結核菌を吸い込むと、1、2年という比較的短い間に約10～15％の方が結核を発症します。しかし、残りの85～90％の方は発病を免れ、その後も発病せずに生活を送ることができます。そして20年、30年、40年という長い経過の中で、10～15％の方が後から結核を発症します。いま問題になっている関節リウマチ患者さんの結核は、大部分がこのタイプの発症なのです。結核の感染を受けてから何十年も経って、関節リウマチの治療を受け、病状が変化していくなかで、結核菌を抑制していた免疫が弱まり、結核を発症してしまうというわけです。

—結核を起こしやすい人には、どのような特徴がありますか。

森：関節リウマチの他にも糖尿病にかかっている方、煙草を吸われる方、ステロイド薬を服用している方、透析を受けている方、ヒト免疫不全ウイルスに感染している方などです。日本人全体では、結核菌の感染を受けたことがある方は推定約20％と言われています。若い方はほとんどいませんが、60歳代では約30％、70歳代では約50％の方が結核菌の感染を受けたことがあると言われています。高齢者では結核は生活習慣病と同じように、多くの方が発症する危険性があると考えていただく必要があると思っています。

「長引く咳は赤信号」適切な対応が結核対策には肝要

—高齢者では、かなりの方が結核にかかる可能性が高いというお話でしたが、厳重な対策をとる必要はないのでしょうか。

森：今では結核には良い治療薬がありますから、注意を怠らなければ、心配する必要はないと思います。しかし、今でも結核は決して油断できない病気ですから、医療者も患者さんも、最低限のルールを守っていただく必要があります。私どもは「長引く咳は赤信号」という標語を作成しました。一般の方には、「咳や痰が続いたら決してそのままにしないで下さい。その咳や痰の原因は煙草の吸いすぎや風邪かもしれない。もしかすると肺炎、肺癌かもしれない。しかし、ひょっとすると結核かもしれないので、かかりつけの先生になるべく早く相談して下さいね」というメッセージになりますし、医療者には「結核を思い出して下さい。結核はまだまだある病気ですよ」というメッセージになります。医師が結核を念頭に置かずに診察して、結核の発見が遅れたりすると、万が一手遅れになる可能性もありますから。

—関節リウマチ治療と結核対策の兼ね合いについて、どのようにお考えですか。

宮坂：事前に結核再発の可能性の有無を調べて、必要な方には結核治療薬を予防的に内服してもらうことで、結核の発症は最小限度に抑えることができると思います。私は、医師と患者さんがきちんと注意事項を守れば、結核は予防可能な合併症だと考えています。

日本リウマチ学会では、関節リウマチを診る医師にきちんとした結核の啓発活動をして行きたいと思っていますし、患者会さんでも関節リウマチ患者さんに対する啓発活動に努め、お互いの意識を高めていければと思っています。

森：宮坂さんがおっしゃるように患者さんと医師が手を携え、さらに行政と医療機関、結核専門医が手を携えて対策を講じれば、日本から結核がなくなる日も近いと思います。そのために私たちは「ストップ結核パートナーシップ日本」というNPO法人を立ち上げて活動しています。

—医師も患者さんも結核を忘れないことに尽きると思います。適切な結核対策が実施され、関節リウマチ患者さんが安心して生物学的製剤を用いた治療を受けられるようになることを願っています。

【関節リウマチとは】
人口の0.4～0.5％、30歳以上の人口の1％にあたる人がこの病気にかかるといわれています。どの年齢の人にも起こりますが、30歳代から50歳代で発病する人が多く認められます。また男性より女性に多く認められます（約3倍）。
（「リウマチ情報センター」より抜粋。）

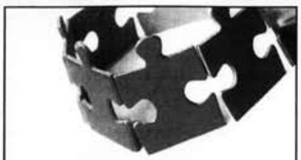
国内の結核の現状

結核新登録患者数（新たに結核と診断された患者、平成21年実績）	24,170人	罹患率	19.04
結核死亡数（平成21年概数）	2,155人	死亡率	1.7

※率はすべて人口10万人対（公益財団法人結核予防会「結核の統計2010」より）

関節リウマチの新薬「生物学的製剤」一覧

●インフリキシマブ ●アダリムマブ ●アバタセプト
●エタネルセプト ●トシリズマブ（発売順 平成22年12月現在）



ストップ結核パートナーシップ日本の目標

❶2050年、結核のない世界へ
❷世界の結核患者を10％削減する
❸世界結核計画2006-2015の推進
❹日本を低蔓延国へ

Stop TB Partnership

ストップ結核パートナーシップ日本は、外務省、厚労省、結核予防会、JICA、製薬産業をはじめとする、官民の様々なパートナー組織と連携して国内外の結核対策を推進し、結核制圧の重要性を啓発する国際連携組織です。

詳細はウェブをご覧ください　ストップ結核　検索
www.stoptb.jp

財団法人 日本リウマチ財団　www.rheuma-net.or.jp
ストップ結核パートナーシップ日本　www.stoptb.jp

協賛　エーザイ株式会社・科研製薬株式会社・キッセイ薬品工業株式会社・参天製薬株式会社・大正富山医薬品株式会社・田辺三菱製薬株式会社・中外製薬株式会社・ブリストル・マイヤーズ株式会社・ヤンセンファーマ株式会社（50音順）

ARTHRITIS & RHEUMATISM
Vol. 62, No. 11, November 2010, pp 3211–3220
DOI 10.1002/art.27650
© 2010, American College of Rheumatology

Pathogenic Role of CXCR7 in Rheumatoid Arthritis

Kaori Watanabe,[1] Mark E. T. Penfold,[2] Akio Matsuda,[3] Naho Ohyanagi,[1] Kayoko Kaneko,[1] Yoshishige Miyabe,[1] Kenji Matsumoto,[3] Thomas J. Schall,[2] Nobuyuki Miyasaka,[1] and Toshihiro Nanki[1]

Objective. **The interaction between CXCL12 and its receptor, CXCR4, in the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA) is important for local inflammatory cell recruitment, angiogenesis, and cytokine production. CXCR7 was recently identified as an alternative receptor for CXCL12. We undertook this study to analyze the expression of CXCR7 in RA synovium and the pathogenic role of the CXCL12/CXCR7 pathway in RA.**

Methods. **CXCR7 expression in RA synovial tissue was analyzed using immunohistochemistry, while expression of CXCR4 and CXCR7 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was examined using quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction, and CXCR7 expression was also analyzed by flow cytometry. Tube formation and rat aortic ring angiogenesis assays were used to assess the effects of CCX733 (a CXCR7 antagonist) and AMD3100 (a CXCR4 antagonist) on CXCL12-induced angiogenesis. The effect of anti-CXCR4 monoclonal antibody (mAb) was also analyzed using a tube formation assay. The effects of CCX733 in a murine model of collagen-induced arthritis (CIA) were also evaluated.**

Results. **CXCR7 was expressed on endothelial cells in RA synovium and also on unstimulated HUVECs. The expression of CXCR7 on HUVECs was markedly up-regulated by interleukin-1β (IL-1β) stimulation, and this overexpression was further enhanced by CXCL12 treatment. Incubation with CXCL12 also promoted angiogenic activity, with addition of IL-1β again augmenting the effect. CXCL12-induced angiogenesis was inhibited by both CXCR4 and CXCR7 antagonists and by anti-CXCR4 mAb. Furthermore, treatment with CCX733 significantly reduced the clinical arthritis scores and the numbers of vessels in the inflamed synovial tissue in mice with CIA.**

Conclusion. **CXCR7 and CXCR4 are both important for angiogenesis in RA synovium, making CXCR7 another potential target molecule for novel RA angiogenesis-blocking therapies.**

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by chronic inflammation of multiple joints. The RA synovium contains high levels of inflammatory cytokines and abundant inflammatory cells, including infiltrating lymphocytes and monocytes (1,2). It also shows prominent neovascularization (3,4), especially in the early stage of the disease (5). This perpetuation of neovascularization might facilitate the ingress of inflammatory cells into the synovium (3), implicating angiogenesis as an important pathogenic process in RA (3,4).

Chemokines are also highly expressed in the synovium and play important roles in local inflammatory cell recruitment, angiogenesis, and the production of inflammatory cytokines (6–8). For instance, the expression of CXCL12/stromal cell–derived factor 1 is up-regulated in the synovial tissue of RA patients compared with that of patients with osteoarthritis (OA) (9–12). CXCL12 might act to induce T cell and monocyte accumulation in the synovium (11,13,14), support the

Supported in part by grants-in-aid for scientific research from the Ministry of Health, Labor and Welfare, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan, and the Japanese Ministry of Education, Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at Tokyo Medical and Dental University.

[1]Kaori Watanabe, MD, Naho Ohyanagi, MSc, Kayoko Kaneko, MD, Yoshishige Miyabe, MD, Nobuyuki Miyasaka, MD, Toshihiro Nanki, MD: Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; [2]Mark E. T. Penfold, PhD, Thomas J. Schall, PhD: ChemoCentryx, Inc., Mountain View, California; [3]Akio Matsuda, PhD, Kenji Matsumoto, MD: National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

Drs. Penfold and Schall own stock or stock options in ChemoCentryx, Inc.

Address correspondence and reprint requests to Toshihiro Nanki, MD, Department of Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: nanki.rheu@tmd.ac.jp.

Submitted for publication May 26, 2009; accepted in revised form July 1, 2010.

migration of B and T cells beneath fibroblast-like synoviocytes (a process called pseudoemperipolesis) (13,15), and stimulate chondrocytes to release matrix metalloproteinase 9, which is involved in cartilage destruction (16). Moreover, CXCL12 enhances angiogenesis in the synovium (8,12,17).

Previously, CXCL12 was thought to bind only one chemokine receptor, CXCR4 (18), with overexpression of CXCR4 found on CD4+ memory T cells, endothelial cells, and osteoclasts in the RA synovium (10–12,16). Furthermore, CXCR4 antagonists ameliorated arthritis in the murine collagen-induced arthritis (CIA) model (19–21). Recently, however, CXCR7 was identified as an alternative receptor for CXCL12 (22,23). CXCR7 expression has been reported on several tumor cells and activated endothelial cells (23,24), and interaction between CXCL12 and CXCR7 promotes the growth of breast, lung, and prostate cancer cells, as well as tumor vascular formation (23–25). CXCR7 is also found on renal progenitor cells (26) and contributes to homing these cells into injured kidney in response to CXCL12 stimulation during acute renal failure. However, the effects of CXCR7 on the RA synovium remain unknown.

The present study analyzed the expression of CXCR7 in the RA synovium and examined the pathogenic role of the CXCL12/CXCR7 pathway in RA. The results suggest an important role for CXCR7 in angiogenesis and also suggest that this chemokine receptor is a potentially useful target molecule in new therapies for RA designed to block angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Specimens. Synovial tissue samples were obtained from 7 RA patients who fulfilled the 1987 revised criteria of the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) (27) and from 4 patients with OA undergoing total knee joint replacement. All subjects provided informed consent. The experimental protocol was approved in advance by the ethics committee of Tokyo Medical and Dental University.

Immunohistochemistry. Immunohistochemical analysis was conducted on OCT compound–embedded sections of frozen synovial tissue. Briefly, 8 μm–thick cryostat sections were fixed in cold acetone (stored at –20°C) for 1 minute, and then the samples were rehydrated 3 times in phosphate buffered saline (PBS) for 3 minutes each. The endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 5% H_2O_2 in PBS for 15 minutes, followed by rinsing with PBS. Nonspecific binding was blocked with 10% normal goat serum in PBS for 45 minutes. Sections were then incubated for 1 hour at room temperature with 10 μg/ml mouse anti-human CXCR7 monoclonal antibody (mAb) (11G8; provided by ChemoCentryx, Inc. [23]) or mouse normal IgG1 (Beckman Coulter) as an isotype control. Following another 3 washes in PBS, antibody binding was detected using the EnVision kit (DakoCytomation). The sections were finally washed in PBS, counterstained with hematoxylin for 10 seconds, and then washed in tap water for 5 minutes.

To analyze angiogenesis in the inflamed joints of mice with CIA, sections were also stained with 4 μg/ml of rabbit anti-mouse CD31 antibody (Abcam) or rabbit normal IgG, followed by detection using the EnVision kit. The number of CD31+ blood vessels in synovial tissue between the tibiotalar and tarsometatarsal joints was determined by microscopy.

Real-time polymerase chain reaction (PCR). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Cambrex) (3×10^5/dish) were incubated in 60-mm dishes with 250 ng/ml CXCL12 (Peprotech), 10 ng/ml tumor necrosis factor α (TNFα; R&D Systems), or 10 ng/ml interleukin-1β (IL-1β; R&D Systems) at 37°C for 5 hours. Total RNA was prepared from the HUVECs using an RNeasy Micro Kit (Qiagen) and then treated with DNase I (Qiagen). First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized using oligo(dT) primers (Invitrogen) and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). The quantitative real-time PCR was performed using the SYBR Green expression assay (Qiagen) and an ABI PRISM 7000 system (Applied Biosystems) according to the instructions provided by the manufacturers. The cDNA was amplified with primers for CXCR4 (5′-ATC-CCT-GCC-CTC-CTG-CTG-ACT-ATT-C-3′ [sense] and 5′-GAG-GGC-CTT-GCG-CTT-CTG-GTG-3′ [antisense]), CXCR7 (5′-GCT-GCT-GGC-CTT-CTG-CGT-GTC-TCT-3′ [sense] and 5′-CTT-CCG-GCT-GCT-GTG-CTT-CTC-CTG-3′ [antisense]), β-actin (5′-GTC-CTC-TCC-CAA-GTC-CAC-ACA-3′ [sense] and 5′-CTG-GTC-TCA-AGT-CAG-TGT-ACA-GGT-AA-3′ [antisense]), GAPDH (5′-GCG-GGG-CTC-TCC-AGA-ACA-TCA-TCC-3′ [sense] and 5′-CGA-CGC-CTG-CTT-CAC-CAC-CTT-CTT-3′ [antisense]), and 18S ribosomal RNA (rRNA) (5′-AAC-CAG-ACA-AAT-CGC-TCC-AC-3′ [sense] and 5′-ACT-CAA-CAC-GGG-AAA-CCT-CA-3′ [antisense]).

GAPDH, β-actin, and 18S rRNA were used as an internal control to standardize the amount of sample messenger RNA (mRNA). The relative expression of real-time PCR products was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method to compare mRNA expression levels of the target gene with those of the housekeeping gene. The C_t value was determined, and the relative gene expression was calculated as follows (following the protocol supplied by the manufacturer): fold difference $= -2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta C_t = C_{t\ target} - C_{t\ \beta\text{-actin}}$ and $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\ unstimulated} - \Delta C_{t\ stimulated}$.

Flow cytometry. For analysis of cell surface CXCR7 expression, HUVECs were cultured in 60-mm dishes incubated with CXCL12 (250 ng/ml) or IL-1β (10 ng/ml) at 37°C for 5 hours. Cells (1×10^5) were then incubated with 1 μg human IgG for Fc receptor blocking for 15 minutes and then stained with phycoerythrin (PE)–conjugated anti-CXCR7 mAb (11G8; R&D Systems) or PE-conjugated mouse IgG1 as an isotype control for 30 minutes. The cells were rinsed with 2% fetal calf serum/PBS and analyzed with an Accuri C6 Flow Cytometer (Accuri Cytometers).

In vitro tube formation assay. The tube formation assay was conducted as described previously (28). Briefly, HUVECs were cultured for 4 days in endothelial basal me-

dium 2 (EBM-2; Cambrex) containing epidermal growth factor, insulin-like growth factor 1, fibroblast growth factor B (FGF-B), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Since these growth factors, particularly FGF-B and VEGF, possess a potent tube-forming activity in addition to growth activity, the medium was then changed to growth factor–free EBM-2 to remove angiogenesis-inducing activities. Twenty-four hours later, the cells were pretreated with IL-1β (10 ng/ml) for 5 hours. Growth factor–reduced Matrigel (BD Biosciences) was thawed at 4°C, and then 150 μl of the Matrigel was added to each well of a 48-well plate and incubated for 30 minutes at 37°C to polymerize. The HUVECs (6×10^4/500 μl) in growth factor–deprived EBM-2 medium were incubated with or without blocking for 15 minutes with CCX733 (100 n*M*, 300 n*M*, 1,000 n*M*; provided by ChemoCentryx, Inc.), an antagonist for CXCR7; AMD3100 (0.1 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml; Sigma-Aldrich), a CXCR4 antagonist; anti-CXCR4 mAb (12G5, 20 μg/ml; R&D Systems); or isotype-matched control mAb; and then cultured further on the Matrigel layer, with recombinant human CXCL12 (250 ng/ml) added to the wells for 18 hours.

Following the CXCL12 incubation, each well was scanned over an equal area and number of fields (5 fields; 1 center field and 4 around-the-center fields per well), which covered ~80% of the whole well, under a light microscope (TE2000-U; Nikon) equipped with a digital camera (DXM1200; Nikon). The length of tube-like structures in the images was measured in a blinded manner. A relative tube length was calculated as follows: total length of the tubes per field with stimulation and/or inhibitor divided by the total length of the tubes without stimulation in each experiment.

Rat aortic ring angiogenesis assay. Angiogenic activity was also evaluated by culturing aortic explants in 3-dimensional matrix gels according to the protocol described by Bauer et al (29). Thoracic aorta was excised from 7-week-old male Sprague-Dawley rats, and the fibroadipose tissue was removed. The aorta was sectioned into 1 mm–long cross-sections, rinsed with growth factor–free EBM-2 medium, placed on the Matrigel-coated wells, covered with an additional 50 μl of Matrigel, and allowed to gel for >30 minutes at 37°C in 5% CO_2. AMD3100 (10 μg/ml) or CCX733 (1,000 n*M*) in growth factor–free EBM-2 medium was added to each well for 20 minutes before CXCL12 (250 ng/ml) was added to the wells. All assays were performed by using 3 aortic rings per sample. Aortic rings were photographed on day 12. The area of angiogenic sprouting was calculated using the Image-Pro Plus software program (Media Cybernetics).

Induction of CIA. Eight-week-old male DBA/1J mice were purchased from Oriental Yeast. Bovine type II collagen (CII; Collagen Research Center) was dissolved in 0.05*M* acetic acid at 4 mg/ml and emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant (Difco). Mice were immunized intracutaneously with 100 μl (2 mg/ml) of the emulsion (day –20). After 21 days (day 1), the same emulsion was injected as a booster immunization. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Treatment of CIA with CXCR7 inhibitor. Mice with CIA were injected subcutaneously with CCX733 (10 mg/kg or 1 mg/kg in 1% hydroxyprophyl methylcellulose vehicle) or vehicle alone twice daily from day –5 to day 14. To determine the therapeutic effects of CCX733, we also treated mice with 10 mg/kg CCX733 from day 4 to day 14 and observed the mice for signs of arthritis. Disease severity for each limb was recorded as follows: 0 = normal; 1 = erythema and swelling of one digit; 2 = erythema and swelling of two digits or erythema and swelling of ankle joint; 3 = erythema and swelling of more than three digits or swelling of two digits and ankle joint; and 4 = erythema and severe swelling of the ankle, foot, and digits with deformity. The clinical arthritis score was defined as the sum of the scores for all 4 paws of each mouse.

On days –5, 2, 7, and 14, the thickness of each paw was measured using a pair of digital slide calipers. On day 15, the ankle joints were harvested and examined radiographically and histologically. The bilateral second-to-fourth metatarsophalangeal (MTP) joints were assessed radiographically according to a previously reported classification for bone erosion (30 as follows): 0 = not obvious, 1 = erosion <0.3 mm in diameter, and 2 = erosion >0.3 mm in diameter. This system yields a possible score between 0 and 12 per animal for each item. The hind paw of each mouse was dissected and examined histologically after hematoxylin and eosin staining. The severity of arthritis was evaluated according to synovial inflammation, as follows: 0 = no inflammation, 1 = focal inflammatory infiltration, and 2 = severe and diffuse inflammatory infiltration.

Measurement of serum anti-CII antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum samples were obtained on day 15 for measurements of IgG1, IgG2a, and IgG2b anti-CII antibodies by ELISA (vehicle, n = 12; 1 mg/kg CCX733, n = 12; 10 mg/kg CCX733, n = 12). Pooled sera from mice with CIA were used as the standard. Purified CII (2 μg/ml in PBS) was coated onto 96-well plates overnight at 4°C. The plates were washed twice with PBS containing 0.05% Tween 20, then blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS overnight at 4°C. The plates were then washed, and 50 μl of a 1:1,250 dilution of each serum sample in 0.05% Tween 20 and 2% BSA in PBS was added to wells and incubated overnight at 4°C. After washing the plates 4 times in PBS, 50 μl of horseradish peroxidase–conjugated rabbit anti-mouse IgG1, IgG2a, or IgG2b subclass-specific antibodies (Zymed Laboratories) was added for 30 minutes at room temperature. After washing, tetramethylbenzidine single solution (Invitrogen) was added, and absorbance at 450 nm was measured for each well, using a microplate reader (Molecular Devices). The standard serum from mice with CIA was added to each plate as serial dilutions, and a standard curve was constructed. The standard serum was arbitrarily defined as 81,920 units/ml (for IgG1, IgG2a, and IgG2b measurement), and the antibody titers of the test serum samples were determined from the standard curves.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean ± SEM. To compare ≥3 groups, including results of real-time PCR, tube formation assay, arthritis score by prophylactic treatment, and radiographic and histologic scores, we used an analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's multiple comparison test. We also used Student's *t*-test to compare radiographic and histologic scores, and also arthritis scores by therapeutic treatment. *P* values less than 0.05 were considered significant.

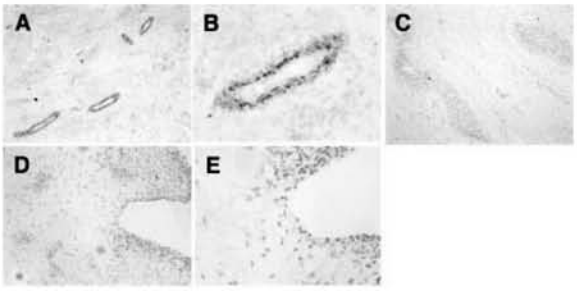


Figure 1. Expression of CXCR7 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA). **A–C,** Synovial tissue samples obtained from 6 RA patients were stained with mouse anti-CXCR7 monoclonal antibody (mAb) (**A** and **B**) or normal mouse IgG1 as a control (**C**). **D** and **E,** Synovial tissue samples were obtained from 3 patients with osteoarthritis and stained with anti-CXCR7 mAb. All sections were counterstained with hematoxylin. Representative photomicrographs are shown (original magnification × 100 in **A** and **C**; × 400 in **B** and **E**; × 200 in **D**).

RESULTS

Expression of CXCR7 in RA synovium. Immunohistochemical analysis of CXCR7 expression in RA patients showed intense expression on endothelial cells in the RA synovium (Figures 1A–C). No expression was detected in the synovial lining, sublining, or perivascular cells of the RA synovium. Expression of CXCR7 was minimal in OA synovium (Figures 1D and E).

Expression of CXCR7 mRNA on HUVECs. HUVECs were stimulated with CXCL12, TNFα, or IL-1β for 5 hours, and the expression of CXCR4 and CXCR7 mRNA was analyzed by quantitative real-time reverse transcription–PCR, using β-actin as an internal control. CXCR7 mRNA was detected on unstimulated HUVECs, and its expression was markedly up-regulated by IL-1β stimulation (Figure 2A). CXCL12 treatment further enhanced CXCR7 expression on IL-1β–stimulated HUVECs, although stimulation with CXCL12 or TNFα alone did not change the expression. The CXCR7 mRNA expression patterns were similar, even when GAPDH and 18S rRNA were used as internal controls (data not shown). Stimulation with interferon-γ, IL-6, IL-17, IL-18, or VEGF also did not alter the CXCR7 expression above that of unstimulated cells. In contrast, CXCR4 mRNA expression on HUVECs was down-regulated by stimulation with IL-1β (Figure 2A).

Cell surface CXCR7 expression on HUVECs. HUVECs were incubated with CXCL12 or IL-1β for 5 hours, and cell surface CXCR7 expression was assessed by flow cytometry. CXCR7 was expressed on unstimulated HUVECs, and the expression was up-regulated by IL-1β stimulation (Figure 2B). Stimulation with IL-1β and CXCL12 further enhanced CXCR7 expression, although stimulation with CXCL12 alone did not change the expression.

Effect of CXCR7 or CXCR4 inhibition on CXCL12-induced angiogenesis. HUVECs in growth factor–deprived EBM-2 medium containing 10 ng/ml,

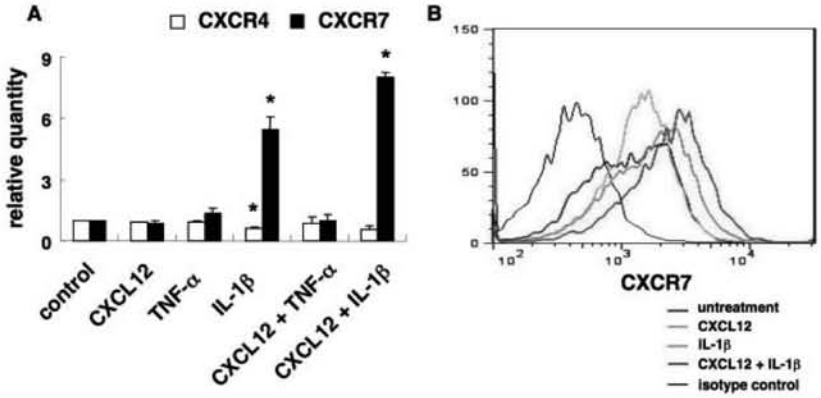


Figure 2. Expression of CXCR7 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs were stimulated with 10 ng/ml tumor necrosis factor α (TNFα), 10 ng/ml interleukin-1β (IL-1β), or 250 ng/ml CXCL12 for 5 hours. **A,** Expression of CXCR4 and CXCR7 mRNA on the HUVECs was analyzed using real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. Values are the mean and SEM of triplicates from 2–5 independent experiments. * = $P < 0.05$ versus control. **B,** Cell surface CXCR7 expression on the HUVECs was analyzed by flow cytometry.

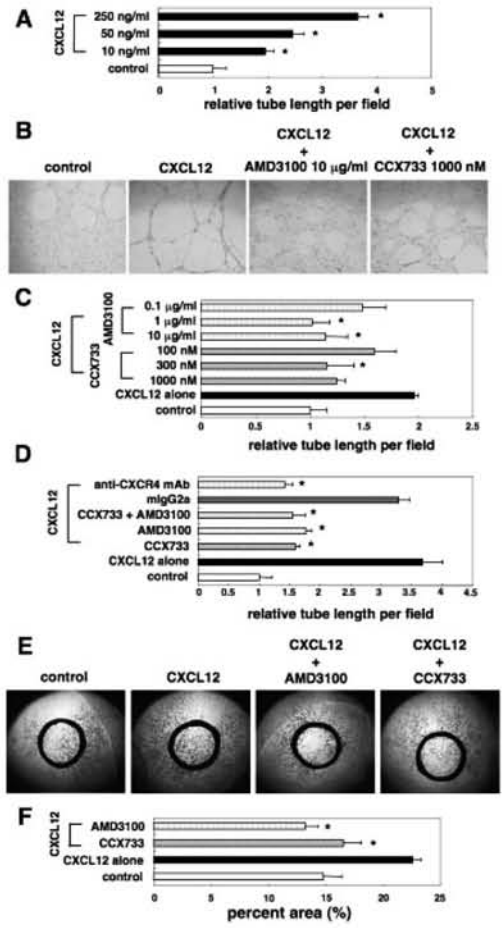


Figure 3. Effect of CXCR7 or CXCR4 inhibition on in vitro CXCL12-induced angiogenesis. **A,** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were plated on Matrigel in the presence of CXCL12 at the indicated concentrations for 18 hours (or without CXCL12 stimulation [control]), and the relative tube length per field from each well was calculated. **B** and **C,** HUVECs were incubated with or without the CXCR7 inhibitor CCX733 or the CXCR4 inhibitor AMD3100 at the indicated concentrations for 15 minutes and then plated on Matrigel in the presence of 250 ng/ml of CXCL12 for 18 hours (**B**), after which the relative tube length per field from each well was calculated (**C**). **D,** HUVECs were incubated with CCX733 (1,000 n*M*) and/or AMD3100 (10 μg/ml), anti-CXCR4 monoclonal antibody (mAb) (20 μg/ml), or isotype control mAb (mIgG2a) and then plated on Matrigel in the presence of CXCL12. The relative tube length per field from each well was calculated. **E** and **F,** The effects of CCX733 and AMD3100 were analyzed by rat aortic ring angiogenesis assay (see Materials and Methods). **E,** Representative results are shown. **F,** The area of microvessel outgrowth from aorta was calculated. Values are the mean and SEM of triplicate wells and are representative of at least 3 independent experiments. $* = P < 0.05$ versus control in **A**; $* = P < 0.05$ versus CXCL12 alone in **C**, **D**, and **F**. (Original magnification × 40 in **B**; × 12.5 in **E**.)

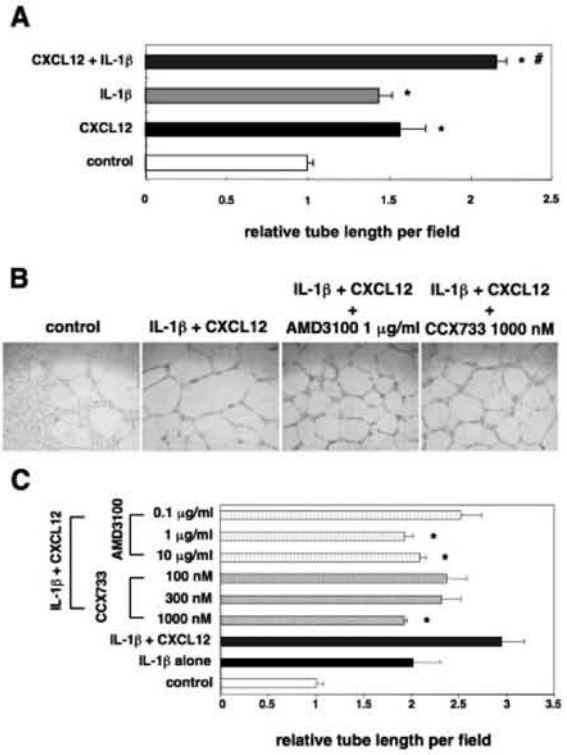


Figure 4. Effect of CXCR7 or CXCR4 inhibition on in vitro CXCL12-induced angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) pretreated with interleukin-1β (IL-1β). **A,** HUVECs were pretreated with or without 10 ng/ml of IL-1β for 5 hours and then incubated with or without CXCL12 for 18 hours. Control = not treated with either IL-1β or CXCL12. $* = P < 0.05$ versus control; $\# = P < 0.05$ versus CXCL12 or IL-1β. **B** and **C,** HUVECs were pretreated with 10 ng/ml of IL-1β for 5 hours and then incubated with CCX733 or AMD3100 at the indicated concentrations. **B,** The cells were again incubated on Matrigel with or without CXCL12 for 18 hours (original magnification × 40). **C,** The relative tube length per field in 5 fields from each well was calculated. Values are the mean and SEM of triplicate wells and are representative of at least 3 independent experiments. $* = P < 0.05$ versus IL-1β plus CXCL12.

50 ng/ml, or 250 ng/ml CXCL12 were plated on Matrigel, and the length of tube-like structures was measured. CXCL12 induced tube formation in a dose-dependent manner, and 250 ng/ml CXCL12 was most effective for angiogenesis (Figure 3A). To evaluate the roles of CXCR4 and CXCR7 in CXCL12-induced angiogenesis, we treated CXCL12-stimulated HUVECs with CXCR4 or CXCR7 antagonists and then analyzed their tube-forming activity. Stimulation with CXCL12 significantly enhanced tube formation by the HUVECs, and this

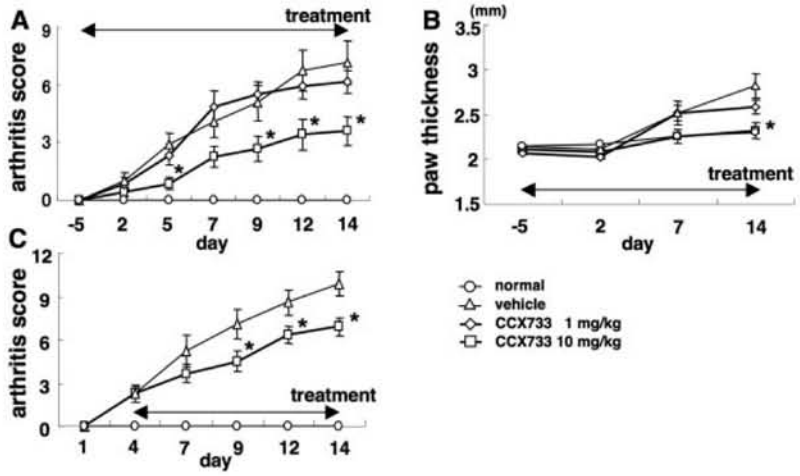


Figure 5. Effect of CXCR7 inhibition on mice with collagen-induced arthritis. **A** and **B,** CCX733 (10 mg/kg or 1 mg/kg in 1% hydroxyprophyl methylcellulose vehicle) or vehicle alone (all n = 12) was injected subcutaneously twice daily from day –5 to day 14. **A,** Disease severity was recorded as the arthritis score until day 14. The score was defined as the sum of the scores for all 4 paws of each mouse. **B,** Paw thickness was also measured. **C,** CCX733 (10 mg/kg) (n = 12) or vehicle (n = 12) was injected subcutaneously twice daily from day 4 to day 14. Disease severity was recorded as the arthritis score until day 14. Values are the mean ± SEM. * = $P < 0.05$ versus vehicle.

effect was inhibited by both antagonists (CCX733 and AMD3100) and by anti-CXCR4 mAb (Figures 3B–D). Blocking both CXCR4 and CXCR7 by CCX733 and AMD3100 inhibited the tube formation activity to a similar degree as blocking either CCX733 or AMD3100 (Figure 3D). The effects of CCX733 and AMD3100 were confirmed by another assay of angiogenesis, rat aortic ring angiogenesis assay. Compared with control, CXCL12 induced microvessel outgrowth from aorta. CCX733 and AMD3100 significantly inhibited the CXCL12-induced angiogenesis (Figures 3E and F).

Pretreatment with IL-1β also induced tube formation, which was further enhanced by subsequent CXCL12 treatment (Figure 4A). The tube formation induced by IL-1β and CXCL12 was also enhanced compared with that induced by CXCL12 alone (Figure 4A). The enhanced tube formation induced by CXCL12 in IL-1β–stimulated HUVECs was also significantly inhibited by CCX733 or AMD3100 (Figures 4B and C).

The values of "relative tube length per field" observed in response to CXCL12 alone (Figures 3A, C, and D and Figure 4A) were variable, probably because of the condition of Matrigel used in each experiment (lot number, freshness, etc.). Therefore, we could not directly compare the values of "relative tube length per field" between independent experiments.

Effect of CXCR7 inhibitor on CIA. Next, we analyzed the effect of CXCR7 inhibition on mice with CIA. CCX733 (10 mg/kg or 1 mg/kg in 1% hydroxyprophyl methylcellulose vehicle) or vehicle alone was injected subcutaneously twice daily from day –5 to day 14. Treatment with CCX733 at 10 mg/kg significantly reduced the arthritis score and paw thickness compared with treatment with vehicle alone (Figures 5A and B). To analyze the therapeutic effect of CCX733, we also treated the mice with CIA with 10 mg/kg CCX733 twice daily from day 4 to day 14. As shown in Figure 5C, CCX733 significantly inhibited the arthritis.

Radiographic examination of the mice with CIA showed varying degrees of bone destruction. Representative radiographs of the left MTP joints of a normal mouse and a mouse with CIA treated with vehicle or CCX733 are shown in Figure 6A. Treatment with CCX733 (10 mg/kg) inhibited the bone erosive changes observed in the mice with CIA, and the bone destruction scores tended to be lower in mice treated with CCX733 (10 mg/kg) compared with those treated with vehicle (although the differences were not statistically significant by ANOVA, the P value was 0.035 by Student's t-test) (Figures 6A and B). Histopathologic examination revealed marked infiltration of mononuclear cells into the synovium of mice with CIA, and pannus was fre-

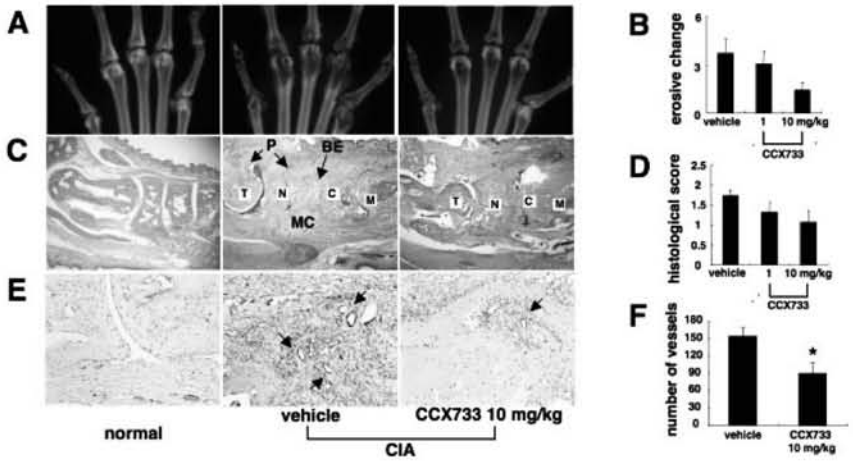


Figure 6. Effect of CXCR7 inhibition on radiographic and histologic findings in mice with collagen-induced arthritis (CIA). **A,** Representative radiographs of metatarsophalangeal (MTP) joints of normal mice on day 15 and of MTP joints of mice with CIA treated with vehicle or CCX733 (10 mg/kg) from the experiment depicted in Figure 5A. **B,** Bone erosion in the bilateral second, third, and fourth MTP joints scored from radiographs (CCX733 treatment, n = 12; vehicle treatment, n = 12). **C,** Representative photomicrographs showing hematoxylin and eosin staining of ankle joints from normal mice and from mice with CIA treated with vehicle or CCX733 from the experiment depicted in Figure 5A. Mice treated with vehicle showed pannus formation (**P**), bone erosion (**BE**), and mononuclear cell (**MC**) infiltration. **T** = talus; **N** = navicular; **C** = cuneiform; **M** = metatarsal (original magnification × 40). **D,** Scoring of synovial inflammation (CCX733 treatment, n = 12; vehicle treatment, n = 12). **E,** Staining of ankle joints for CD31. Shown are representative photomicrographs of ankle joints from normal mice and from mice with CIA treated with vehicle or CCX733 from the experiment depicted in Figure 5A. **Arrows** indicate CD31+ cells (original magnification × 200). **F,** Numbers of blood vessels in the synovial tissue between the tibiotalar and tarsometatarsal joints (CCX733 treatment, n = 10; vehicle treatment, n = 9). Values in **B**, **D**, and **F** are the mean and SEM. * = $P < 0.05$ versus vehicle.

quently observed to penetrate into the bone marrow space (Figure 6C). Treatment with CCX733 (10 mg/kg) significantly reversed these findings and tended to lower the scores of the observed histologic changes (although the differences were not statistically significant by ANOVA, the P value was 0.046 by Student's t-test) (Figures 6C and D). Finally, the synovial tissue was stained with the endothelial cell marker, CD31, to determine angiogenic activity by counting the CD31+ vessels. Compared with that of vehicle-treated mice, the synovial tissue of mice with CIA treated with CCX733 showed significantly fewer vessels (Figures 6E and F).

To examine the effects of CCX733 on humoral immunity against CII immunization, the levels of serum IgG1, IgG2a, and IgG2b anti-CII antibodies on day 15 were measured by ELISA. Although serum anti-CII antibodies were not detected in normal mice, production of all 3 subclasses of serum anti-CII antibodies was observed in mice with CIA. Treatment with CCX733 did not alter the anti-CII antibody levels (data not shown).

DISCUSSION

The current study demonstrates that CXCR7, a receptor for CXCL12, is expressed on endothelial cells in the synovium of RA patients. It also shows that a CXCR7 inhibitor prophylactically and therapeutically ameliorates signs and symptoms in an animal model of arthritis.

The expression of CXCR7 was up-regulated by stimulation with IL-1β in cultured HUVECs, and this effect was augmented by CXCL12 treatment. IL-1β and CXCL12 are highly expressed in RA synovium (9–12,31) and thus might up-regulate CXCR7 expression on endothelial cells in the synovium. CXCR4 is also expressed on endothelial cells in RA synovium (12), and CXCL12 might therefore up-regulate angiogenesis via both CXCR4 and CXCR7. Although AMD3100 is widely known as a CXCR4 antagonist (32), it was recently shown that AMD3100 (10–100 μM) also binds CXCR7 and increases both CXCL12 binding to CXCR7 and the

potency of CXCL12-induced arrestin recruitment via CXCR7 (33). However, since a lower concentration of AMD3100 (1 μg/ml [1.25 μM]) blocked the tube formation, the effect of AMD3100 on CXCR7 might have been minimal in the current study. The present study showed that CXCL12-induced angiogenesis was inhibited by AMD3100, anti-CXCR4 mAb, or CCX733, a CXCR7 inhibitor. Moreover, blocking with both CCX733 and AMD3100 inhibited the CXCL12-induced angiogenesis to a similar degree as blocking with either CCX733 or AMD3100. Furthermore, another angiogenesis assay, rat aortic ring assay, which is considered to be the closest to the situation in vivo, confirmed the results. These results suggest that signaling from both CXCR4 and CXCR7 is necessary for angiogenesis in synovium.

CCX733 treatment not only reduced clinical arthritis scores but also prevented joint destruction in mice with CIA. CCX733 is a potent and specific inhibitor of CXCR7 that inhibits binding of CXCL12 to CXCR7 (50% inhibition concentration ~5 nM in radioligand binding assays) without interfering with binding of CXCL12 to CXCR4 (23,34). This CXCR7 inhibitor also significantly decreased the number of CD31+ vessels in the inflamed synovial tissue compared with the synovium of untreated mice. Taken together, the present results indicate that CXCR7 inhibition ameliorates arthritis, probably by inhibition of angiogenesis, an important process in the pathogenesis of RA (3,4). Indeed, VEGF, one of the most powerful angiogenic molecules, is strongly expressed on synovial macrophages, fibroblasts, and vascular smooth muscle cells in the RA synovium (35), and an anti–VEGF receptor 1 antibody suppressed the severity of arthritis in mice with CIA (36). Thus, down-regulation of angiogenesis might be a beneficial treatment of RA, and, in turn, CXCR7 and CXCR4 antagonists could be used in such therapies. It was also reported that CXCR4 antagonists inhibited CIA (19–21).

CXCR7 was reported to form functional heterodimers with CXCR4 on CXCR4- and CXCR7-transfected HEK 293 cells, with enhanced CXCL12-induced signaling, although CXCL12 did not induce signaling through CXCR7 alone (37). However, CXCR7-mediated chemotaxis of T cells and carcinoma cells toward CXCL12 was also reported (22,38). The function of CXCR7 may therefore differ among cell types. For HUVECs, both CXCR4 and CXCR7 are necessary for CXCL12-induced angiogenesis. It was also reported that CXCR7 is involved in cell survival and cell adhesion to endothelium, and that CXCR4 is involved in chemotaxis for CXCL12-dependent homing of renal progenitor cells (26). CXCR4 expression on T cells was up-regulated with stimulation with IL-15 (11), which is expressed in RA synovium (39), and most of the T cells in the synovium expressed CXCR4 (11). Furthermore, B cells and macrophages in RA synovial tissue also expressed CXCR4 (14,40). Therefore, blocking of CXCR4 might contribute to reducing accumulation and stimulation of inflammatory cells in the synovium (7,11,26,41) and to reducing angiogenesis in CIA. In contrast, inhibition of CXCR7 may block cell survival, cell adhesion to endothelium, and angiogenesis. Moreover, since IL-1β enhanced the expression of CXCR7 but not that of CXCR4, CXCR7 antagonist may be predominantly effective at the site of inflammation. Consequently, both CXCR4 and CXCR7 could be targets in the treatment of RA.

Recently, Sierro et al (37) reported that mice lacking CXCR7 died perinatally with ventricular septal defects and semilunar heart valve malformation. These findings contrasted with the demonstrated phenotype of CXCR4- or CXCL12-deficient mice, which have defects in hematopoietic, neural, and gastrointestinal vasculature development, as well as cardiac ventricular septal defects (42–44). Therefore, although both CXCR4 and CXCR7 are necessary for angiogenesis, they might act via separate mechanisms.

Investigators in our group demonstrated CXCR7 expression on several tumor cell lines, tumor tissues, and activated endothelial cells but not on peripheral blood lymphocytes or monocytes (23,24). However, other groups reported CXCR7 expression on human peripheral blood T cells, B cells, monocytes, and dendritic cells (22,45), as well as CXCL12 binding to CXCR7 causing human peripheral blood T cell chemotaxis (22). Clearly, expression of CXCR7 on lymphocytes and monocytes remains controversial. The present study demonstrated CXCR7 expression on endothelial cells in the RA synovium but not on the synovial lining cells and perivascular aggregates, by immunohistochemistry. In addition, flow cytometric analysis could not detect CXCR7 on T cells, B cells, or monocyte/macrophages from the peripheral blood and synovial fluid of RA patients (data not shown). In addition, treatment with CCX733 did not alter serum anti-CII antibody levels. Therefore, the reduced cellular infiltration into CIA synovium following CXCR7 inhibition appears to be due to inhibition of angiogenesis and not to a direct effect on inflammatory cells.

In summary, CXCR7 and CXCR4 play an important role in angiogenesis in RA synovium. CXCR7 could

be a target molecule in new therapies for RA that function by inhibiting angiogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Aya Sato and Noriko Tamura for excellent technical support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Nanki had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Watanabe, Penfold, Schall, Nanki.
Acquisition of data. Watanabe, Matsuda, Ohyanagi, Kaneko, Miyabe, Matsumoto, Nanki.
Analysis and interpretation of data. Watanabe, Ohyanagi, Miyabe, Miyasaka, Nanki.

REFERENCES

1. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. Arthritis Res 2000;2:189–202.
2. Ritchlin C. Fibroblast biology: effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. Arthritis Res 2000;2:356–60.
3. Szekanecz Z, Koch AE. Mechanisms of disease: angiogenesis in inflammatory diseases. Nat Clin Pract Rheumatol 2007;3:635–43.
4. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology.' Arthritis Res Ther 2008;10:224.
5. Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2005;17:293–8.
6. Szekanecz Z, Strieter RM, Kunkel SL, Koch AE. Chemokines in rheumatoid arthritis. Springer Semin Immunopathol 1998;20: 115–32.
7. Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4$^+$ T cell activation. J Immunol 2000;164: 5010–4.
8. Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. J Cell Mol Med 2002;6:357–76.
9. Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell–derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. Arthritis Rheum 2002;46:130–7.
10. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-β1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. J Immunol 2000; 165:3423–9.
11. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4$^+$ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. J Immunol 2000;165:6590–8.
12. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synoviocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. J Immunol 2003;170:2147–52.
13. Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, et al. Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell–derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue. Arthritis Rheum 2003;48: 2472–82.
14. Blades MC, Ingegnoli F, Wheller SK, Manzo A, Wahid S, Panayi GS, et al. Stromal cell–derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID mice. Arthritis Rheum 2002;46:824–36.
15. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. J Clin Invest 2001;107:305–15.
16. Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. J Cell Physiol 2004;199:244–51.
17. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. Microcirculation 2003;10:359–70.
18. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature 1996;382:829–33.
19. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, et al. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-γ receptor-deficient mice. J Immunol 2001;167:4686–92.
20. Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, et al. Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. FEBS Lett 2004;569:99–104.
21. De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, et al. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2005;7:R1208–20.
22. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. J Biol Chem 2005;280:35760–6.
23. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 2006;203:2201–13.
24. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:15735–40.
25. Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. J Biol Chem 2008;283:4283–94.
26. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. J Exp Med 2008;205:479–90.
27. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315–24.
28. Matsuda A, Fukuda S, Matsumoto K, Saito H. Th1/Th2 cytokines reciprocally regulate in vitro pulmonary angiogenesis via CXC chemokine synthesis. Am J Respir Cell Mol Biol 2008;38:168–75.
29. Bauer KS, Cude KJ, Dixon SC, Kruger EA, Figg WD. Carboxyamido-triazole inhibits angiogenesis by blocking the calcium-mediated nitric-oxide synthase-vascular endothelial growth factor pathway. J Pharmacol Exp Ther 2000;292:31–7.
30. Wakamatsu K, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K, Kubota T. Effect of a small molecule inhibitor of nuclear factor-κB nuclear

translocation in a murine model of arthritis and cultured human synovial cells. Arthritis Res Ther 2005;7:R1348–59.
31. Wood NC, Dickens E, Symons JA, Duff GW. In situ hybridization of interleukin-1 in CD14-positive cells in rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol 1992;62:295–300.
32. De Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. Mini Rev Med Chem 2005;5:805–24.
33. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. Mol Pharmacol 2009;75:1240–7.
34. Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and $CD34^+$ cells. J Leukoc Biol 2008;84:1130–40.
35. Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marme D, Feldmann M, Maini RN, et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. Arthritis Rheum 2001;44:2055–64.
36. Choi ST, Kim JH, Seok JY, Park YB, Lee SK. Therapeutic effect of anti-vascular endothelial growth factor receptor I antibody in the established collagen-induced arthritis mouse model. Clin Rheumatol 2009;28:333–7.
37. Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:14759–64.
38. Meijer J, Ogink J, Roos E. Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells in vitro and in vivo. Br J Cancer 2008;99:1493–501.
39. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med 1996;2:175–82.
40. Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, et al. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2009;11:R149.
41. Nanki T, Lipsky PE. Stimulation of T-Cell activation by CXCL12/stromal cell derived factor-1 involves a G-protein mediated signaling pathway. Cell Immunol 2001;214:145–54.
42. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature 1996;382:635–8.
43. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature 1998;393:591–4.
44. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature 1998;393:595–9.
45. Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. J Immunol 2006;176:2197–207.

運動器外科学分野
軟骨再生学分野

宗田　大

医歯学総合研究科・生体支持組織学系専攻
運動機能再建学・教授

1）研究の課題名

（1）前十字靱帯（ACL）損傷膝の問題の解決

Solution of ACL injured knee related problems

スポーツ傷害の代表である前十字靱帯（ACL）損傷とその治療法の発展を長年のテーマとして取り組んでいる。内側ハムストリング腱を移植腱として用いる2重束再建術を開発し、臨床的に取り組んできた（1）。再再建術式（2），正常解剖と術式の検討などが手術治療に直結する研究である。ACL損傷を放置すると外傷性関節症を発症する。その発症素因について患者の検体を用いたマイクロアレイ解析により、重要な遺伝子を明らかにし関節症治療に結びつける取り組みを行っている。またACL損傷後の関節液の分析から、治癒傾向や関節症素因の割り出しを目指して検討している。ACL損傷患者は遺伝子的な背景を持つ。マイクロアレイ解析、患者の形態評価（3）、動作解析（8）を行うことにより損傷の予防に効果的な目指している。

1. Yamazaki J, Muneta T, et al. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010 Aug 24.
2. Muneta T, et al. Arthroscopy. 2010 26（6）:769-81.
3. Yamazaki J, Muneta T, et al. Am J Sports Med. 2010 Nov 3.

（2）そのほかの関節疾患についての臨床的取組み

Solution of Problems in Orthopaedic Surgery besides ACL injury related surgery

運動器外科学では主に下肢関節疾患の治療を扱っているが、膝関節手術として確立している人工膝関節や人工股関節の成績向上の臨床的意義は大きい。人工股関節手術において臼蓋コンポーネントの設置をより正確に実施するためにnavigation systemを用いた検討を行い、CT based navigationにおいてCTのスライス幅を減少させても正確性は劣らないことを報告した（4）。また人工股関節は関節面のポリエチレン摩耗粉が骨融解によるコンポーンネントの不安定性を引き起こすことが知られているが、そのメカニズムについて十分に理解されているわけではない。骨融解におけるオステオポンチンの関与をノックアウトマウスを用いた研究で明らかにした（5）。また人工関節手術の合併症として血栓塞栓症がよく知られている。そのメカニズムや実態、予防法について十分に解明されているわけではない。血管外科との共同研究により人工膝関節術中および術後の臨床検査からそれらを解明している（6,7）。

また膝蓋骨脱臼の治療法について内側膝蓋大腿靱帯（MPFL）の重要性が認識され、日本ではMPFL再建術が第一選択の術式として確立しつつある。本術式においては大腿骨骨孔の作成部位が成績を左右する大切なポイントとして認識されているが、私たちは術中にその靱帯の長さ変化と大腿骨骨孔の位置を評価し、術中の放射線像から望ましい骨孔部位の目安を明らかにした（8）.Nimuraは肘頭骨骨折に対する新しい術式を報告した（9）。

4. Hirasawa N, Matsubara M, Muneta T, et al. Comput Aided Surg. 2010;15（4-6）:83-9.
5. Shimizu S, Noda M, Muneta T, Asou Y, et al: Arthritis Rheum 2010 62: 1329-1337.
6. Kume H, Inoue M, Muneta T, et al. Eur J Vasc Endovasc Surg 2010 40:664-668.
7. Mitsuoka A, Inoue M, Muneta T, et al. Ann Vasc Surg 2010 24:721-727.
8. Tateishi T, Tsuchiya M, Muneta T, et al. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2010 Sep 1.[Epub ahead of print]
9. Nimura A, Nakagawa T, Muneta T, et al. J Orthop Surg Res. 2010 Oct12;5:73.

(3) 骨、軟骨の形成、ホメオスタシスおよび造血微小環境の制御における骨形成因子BMPの生理機能の解析

Roles of BMPs 2, 4, and 7 during skeletal development, in postnatal bone homeostasis, and in intramedullary hematopoiesis

骨形成因子（BMP）ファミリーの中でBMP2, 4, 7は、胎生期の骨格ならびに生後の骨組織にオーバーラップして発現が観察される分子である。これまでの研究から、これらBMP分子は、軟骨、骨分化に深く関与することが示されている。私たちは、コンディショナルノックアウトマウスの解析から、BMP2は生後の骨のホメオスタシスにおいて必須の分子であり、その欠損により、骨折後の骨修復の過程が完全に阻害されることを明らかとしてきた（Tsuji et al., Nature Genetics, 2006）。これに対して、BMP4及びBMP7のコンディショナルノックアウトマウスでは、X線による解析では、明らかな骨折は確認できず、骨折後の組織修復過程も明らかな遅延は観察されなかった。これらの結果は、BMP2, 4, 7の中で生後の骨のホメオスタシスに必須であるのはBMP2のみであることを示唆しているが、生後の骨組織で発現しているBMPの中でBMP2のみが重要な生理機能を持っている理由は未だ不明である。一方、BMP4、BMP7を同時に欠損したマウスにおいては、胎生期の骨形成は生じるが、生後の骨形成に重篤な障害が生じることが明らかとなった。このことは、BMP4、BMP7の分子機能は互いに補完しあう関係にあることを示唆している。本研究では、BMP2, 4, 7の機能的分担をより詳細に検討することで、それぞれの骨、軟骨のホメオスタシスにおける生理機能を明らかとしていくことを目的としている。

近年、骨芽細胞が造血微小環境の主要なコンポーネントである事が示され、その維持にBMPシグナルが関与する可能性が示唆されている。造血系のホメオスタシスにおけるBMP分子の生理機能を検討するため、骨髄におけるBMPコンディショナルノックアウトマウスの作成を行い、その表現型の解析をおこなった。骨髄でBMP4を欠損したマウスでは、赤芽球、T細胞、B細胞、単球のポピュレーションに変化はなかったが、造血幹細胞を含む未分化細胞のポピュレーションであるLSK（Lin-ScaI+c-kit+）細胞分画は、有為に減少していた。この事は、BMP4の活性が、骨髄微小環境の維持に必要である可能性を示唆している。

またin vivoの動物実験で関節症モデル（11）やザイモザン誘発関節症モデルに対しBMP7の関節内注射がその軟骨変性の進行を抑制することに役立つことを明らかにした。

11. Hayashi M, Muneta T, Sekiya I, et al.: J Orthop Res 2010 28:1502-1506.

(4) 関節症発症及び病態の進行の分子メカニズムの解析および非侵襲性のマウス関節症モデルの確立

Identification and characterization of the genes in the pathogenesis of osteoarthritis and a new model of osteoarthritis by forced running in mice

本研究は、変形性関節症の発症及び進行に関与する遺伝子の同定及び生理機能の解析を通じて病態の分子メカニズムを明らかとすることを目的としている。ヒト変形性関節症において、人工膝関節置換術を行った患者の了承のもと、滑膜サンプルにおける遺伝子発現パターンの網羅的解析を行った。その結果、骨棘形成の多寡と相関する遺伝子として、オステオポンチン及びその翻訳後修飾に関与する酵素であるプロトロンビナーゼを同定した。その後の解析より、オステオポンチンの滑膜における発現量、関節液中のタンパク量は、関節軟骨の損傷に伴い増加すること、トロンビン切断型オステオポンチンの関節液中における存在量は、リウマチ性関節炎において増大することを明らかとした。現在、関節症の病態におけるオステオポンチン並びにトロンビン切断型オステオポンチンの生理機能の解析をオステオポンチンノックアウトマウスの系を用いて行っている。

さらに今後の関節症研究の展開を広げるため強制的走行機械を用いたマウスの関節症発症モデルを開発中である。また臨床に使用されている貼付剤の薬物動態を人を対象として明らかにした（12）。

12. Sekiya I, Muneta M, et al.: AAPS PharmSciTech 2010: 154-158

(5) 間葉幹細胞による再生医療の開発

Repair of intraarticular tissue injury by synovial mesenchymal stem cells

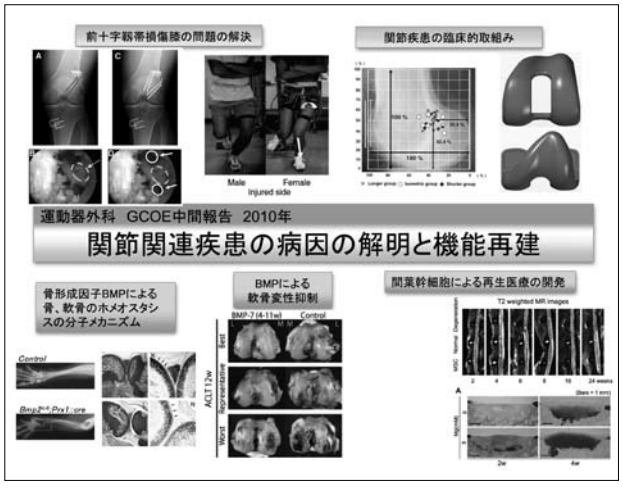
私たちのこれまでの解析によると、正常膝関節液中の間葉幹細胞はわずかにしか存在しないが、前十字靭帯損傷や軟骨損傷を有する膝の関節液中には100倍以上の間葉幹細胞が存在する。また、前十字靭帯、半月板、滑膜等の関節内組織由来の間葉幹細胞は、骨髄液、皮下脂肪、骨格筋等の関節外組織由来の間葉幹細胞と比較し、互いに遺伝子プロファイルが類似する。さらに滑膜由来の間葉幹細胞を関節内に投与すると、損傷組織部位に接着し、修復に寄与する。in vitroの軟骨分化の指標に用いているpellet cultureの系で細胞の種類で異なるのかを、電

顕的な微細構造で明らかにした（13)。関節軟骨、半月板、靭帯等の関節内組織損傷により、間葉幹細胞が滑膜から関節液中に動員され、損傷部位に接着し、組織修復に貢献する機序の存在が予測される。しかし、実際には動員または損傷部位に接着する幹細胞の数が限られるため、自然治癒には限界があるものと推察される。軟骨損傷部位により多くの幹細胞が接着するためにマグネシウムを培養液に加えることを発見し、そのメカニズムがインテグリンを介することを明らかにした（14）

私たちは、これまでの基礎研究の成果を踏まえ、滑膜の間葉幹細胞を体外で自己血清を使用して増殖させ、人工素材を使用せずに、関節鏡視下で、軟骨欠損部に移植する、関節軟骨の再生医療を開始している。自己血清の熱処理の影響を報告した（15)。幹細胞は、高齢の方からも確実に多くの細胞を確保できることから、変形性関節症への応用も期待できる。また家兎の椎間板変性モデルに対する滑膜幹細胞移植の有用性を検討した（16)。さらにラットの脳梗塞モデルに対する人間葉幹細胞の注入により神経機能の回復が進むことを実験的に明らかにした（17)。

13. Ichinoase S, Muneta T, Sekiya I, et al.: Lab Invest 2010 90:210-221.
14. Shimaya M, Muneta T, Sekiya I, et al.: Osteoarthritis Cartilage 2010 18: 1300-1309
15. Nimura A, Muneta T, Sekiya I, et al.: BMC Musculoskelet Disord 14:11:208.
16. Miyamoto T, Muneta T, Sekiya I, et al.: Arthritis Res Ther 2010 12:R206.
17. Xu H, Muneta T, Mizusawa H: J Neurosci Res 2010 88:3598-3609.

2)



3）発表の研究内容についての英文要約

Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I.
Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes.
Lab Invest. 90（2）:210-21, 2010.

Mesenchymal stem cells（MSCs）from a variety of mesenchymal tissue contain common features, but distinguishing properties dependent on their origin are emerging. We investigated morphological differences of human bone marrow-MSCs, synovium-MSCs, and chondrocytes during in vitro chondrogenesis. Two hundred thousands cells were pelleted after centrifugation and cultured in chondrogenic media that contained BMP-2, TGF-beta3, and dexamethasone. The pellets were analyzed histologically, immunohistologically, and electron microscopically. Before chondrogenic induction, trypsinized MSCs and chondrocytes looked similar. At day 1, the structure of the three masses was divided into two layers, and the most obvious differences in the three populations were observed in the deep zone. In bone marrow-MSCs, round cells accumulated without intercellular space, and the cells were mainly connected through intermediate junctions. In synovium-MSCs, elongated cells accumulated with small desmosomes and intercellular spaces could occasionally be seen. In chondrocytes, separated oval and polygonal cells connected only in a narrow spotty area through a small desmosome. At day 7, the structure of the three masses was divided into three layers, and the most obvious differences in the three populations were observed in the middle zone. In bone marrow-MSCs, the middle zone consisted of dense smaller cells and apoptotic cells. In synovium-MSCs, the middle zone consisted of dense arrayed wider cells and apoptotic cells. In chondrocytes, the middle zone was acellular without apoptotic cells. At day 21, the morphology of cells and extracellular space became similar in that each cell was located separately with abundant extracellular matrix. The superficial zone was still obvious in bone marrow-MSCs, but hardly seen both in synovium-MSCs and chondrocytes. In this study, we revealed morphological differences of bone marrow-MSCs, synovium-MSCs, and chondrocytes during in vitro chondrogenesis. The most obvious differences in the three populations were observed at day 1 in the deep zone.

Ohno K, Noguchi Y, Kawashima Y, Yagishita K, Kitamura K.
Secondary hyperbaric oxygen therapy for idiopathic sudden sensorineural healing loss in the subacute and chronic phases.
J Med Dent Sci, 57（2）:1-6, 2010.

This study investigated the efficacy of hyperbaric oxygen therapy（HBOT）as a secondary treatment for patients

with idiopathic sudden sensorineural hearing loss（ISSNHL）in the subacute and chronic phases. Forty-eight ISSNHL patients（HBOT group）who had received primary conventional treatment within 4 weeks after onset and underwent HBOT between 4 and 20 weeks post-onset were retrospectively compared with 44 ISSNHL patients（control group）with primary conventional treatment alone. Mean hearing gain was slight, with gains of 5.2 +/- 8.9 dB in the HBOT group and 2.0 +/- 7.6 dB in the control group. However, no significant difference was recognized between the two groups. In the HBOT group, no significant difference was observed in hearing gain among patients with HBOT initial time at 4-7, 8-11, 12-15 or 16-20 weeks after onset. Meanwhile, hearing gain was significantly higher in patients with profound hearing loss than in the other patients. We conclude that the effectiveness of secondary HBOT for ISSNHL patients in either subacute or chronic phase remains unproven, and thus, the decision administer HBOT should be made with caution.

Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T.
Mechanisms for Noncontact Anterior Cruciate Ligament Injuries: Knee Joint Kinematics in 10 Injury Situations From Female Team Handball and Basketball.
Am J Sports Med 38（11）:2218-2225, 2010
The mechanism for noncontact anterior cruciate ligament injury is still a matter of controversy. Video analysis of injury tapes is the only method available to extract biomechanical information from actual anterior cruciate ligament injury cases. This article describes 3-dimensional knee joint kinematics in anterior cruciate ligament injury situations using a model-based image-matching technique. Ten anterior cruciate ligament injury video sequences from women's handball and basketball were analyzed using the model-based image-matching method. The mean knee flexion angle among the 10 cases was 23°（range, 11° -30°）at initial contact（IC）and had increased by 24°（95% confidence interval [CI], 19° -29°）within the following 40 milliseconds. The mean valgus angle was neutral（range, -2° to 3°）at IC, but had increased by 12°（95% CI, 10° -13°）40 milliseconds later. The knee was externally rotated 5°（range, -5° to 12°）at IC, but rotated internally by 8°（95% CI, 2° -14°）during the first 40 milliseconds, followed by external rotation of 17°（95% CI, 13° -22°）. The mean peak vertical ground-reaction force was 3.2 times body weight（95% CI, 2.7-3.7）, and occurred at 40 milliseconds after IC（range, 0-83）. Based on when the sudden changes in joint angular motion and the peak vertical ground-reaction force occurred, it is likely that the anterior cruciate ligament injury occurred approximately 40 milliseconds after IC. The kinematic patterns were surprisingly consistent among the 10 cases. All players had immediate valgus motion within 40 milliseconds after IC. Moreover, the tibia rotated internally during the first 40 milliseconds and then external rotation was observed, possibly after the anterior cruciate ligament had torn. These results suggest that valgus loading is a contributing factor in the anterior cruciate ligament injury mechanism and that internal tibial rotation is coupled with valgus motion. Prevention programs should focus on acquiring a good cutting and landing technique with knee flexion and without valgus loading of the knee.

Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, Tsuji K, I. Sekiya I.
Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins.
Osteoarthritis and cartilage 18:1300-9, 2010
We previously reported that more than 60% of synovial mesenchymal stem cells（MSCs）placed on osteochondral defects adhered to the defect within 10 min and promoted cartilage regeneration. The efficiency of adherence is considered to depend on the interaction between cells and extracellular matrix（ECM）, in which integrins may play some important roles. Divalent cations such as calcium, magnesium, and manganese may affect functions of integrins, and the integrins may be involved in differentiation of MSCs. Among divalent cations, magnesium is used in clinical practice as a therapeutic agent and increases the affinity of integrin to ECM. In this study, we investigated whether magnesium enhanced adherence and chondrogenesis of synovial MSC through integrins. We performed assays for adherence of human synovial MSCs to collagen-coated slides, in vitro chondrogenesis, ex vivo assays for adherence of human synovial MSCs to osteochondral defect, and in vivo assays for adherence and cartilage formation of synovial MSCs in a rabbit osteochondral defect model. Magnesium increased adhesion of human synovial MSCs to collagen, and this effect was inhibited by neutralizing antibodies for integrin α 3 and β 1. Magnesium also promoted synthesis of cartilage matrix during in vitro chondrogenesis of synovial MSCs, which was diminished by neutralizing antibodies for integrin β 1 but not for integrin α 3. Ex vivo analyses demonstrated that magnesium enhanced adherence of human synovial MSCs to osteochondral defects. In vivo studies in rabbits showed that magnesium promoted adherence at 1 day and cartilage formation of synovial MSCs at 2 weeks. Magnesium enhanced adherence of synovial MSCs through integrins, which promoted synthesis of cartilage matrix at an early phase.

Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y.
Osteopontin Deficiency Impairs Wear Debris–Induced Osteolysis via Regulation of Cytokine Secretion From

Murine Macrophages.
ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 62（5）: 1329–1337, 2010
To investigate the molecular mechanisms underlying particle-induced osteolysis, we focused on osteopontin（OPN）, a cytokine and cell-attachment protein that is associated with macrophage chemoattractant and osteoclast activation. We compared OPN protein levels in human periprosthetic osteolysis tissues with those in osteoarthritis（OA）synovial tissues. To investigate the functions of OPN during particle-induced osteolysis in vivo, titanium particles were implanted onto the calvaria of OPN-deficient mice and their wild-type（WT）littermates. Mice were killed on day 10 and evaluated immunohistologically. The effects of OPN deficiency on the secretion of inflammatory cytokines were examined using cultured bone marrow-derived macrophages（BMMs）. BMMs from OPN-deficient and WT mice were cultured with titanium particles for 12 hours, and the concentrations of inflammatory cytokines in the conditioned media were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. xpression of OPN protein was enhanced in human periprosthetic osteolysis tissues as compared with OA synovial tissues. In the particle-induced model of osteolysis of the calvaria, bone resorption was significantly suppressed by OPN deficiency via inhibition of osteoclastogenesis, whereas an inflammatory reaction was observed regardless of the genotype. Results of immunostaining indicated that OPN protein was highly expressed in the membrane and bone surface at the area of bone resorption in WT mice. When BMMs were exposed to titanium particles, the concentration of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha, interleukin-1alpha（IL-1alpha）, IL-1beta, and IL-6, as well as chemotactic factors, such as monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1alpha, in the conditioned medium were significantly reduced by OPN deficiency. Whereas phagocytic activity of BMMs was not attenuated by OPN deficiency, phagocytosis-mediated NF-kappaB activation was impaired in OPN-deficient BMMs. These data indicated that OPN was implicated in the development of particle-induced osteolysis via the orchestration of pro-/antiinflammatory cytokines secreted from macrophages. PN plays critical roles in wear debris-induced osteolysis, suggesting that OPN is a candidate therapeutic target for periprosthetic osteolysis.

Sekiya I, Morito T, Hara K, Yamazaki J, Ju YJ, Yagishita K, Mochizuki T, Tsuji K, Muneta T.
Ketoprofen absorption by muscle and tendon after topical or oral administration in patients undergoing anterior cruciate ligament reconstruction.
AAPS PharmSciTech. 11（1）:154-8, 2010
Topical ketoprofen patches are widely used in the treatment of musculoskeletal pain, but the pharmacokinetics of ketoprofen following topical application remain unclear. This open-label, single-dose pharmacokinetic study was designed to determine the concentrations of ketoprofen in the semitendinosus muscle/tendon and plasma after topical application or oral administration to patients scheduled for anterior cruciate ligament reconstruction. Two ketoprofen patches（20 mg each）were applied over the semitendinosus muscle/tendon for 1, 6, 14, or 20 h before surgery in 21 patients, while one sustained-release 150 mg ketoprofen capsule was administered to six patients 14 h before surgery. Ten untreated patients served as the control group. The main outcome measures were the semitendinosus muscle/tendon and plasma concentrations of ketoprofen at 1, 6, 14, and 20 h. Ketoprofen was detected in the semitendinosus muscle/tendon from about 1 h after topical application. The peak concentration was reached at 6 h, and it decreased gradually until 20 h, although the concentration at 20 h was still higher than that at 1 h. Unlike the tissue concentration, the plasma concentration of ketoprofen increased gradually after topical application. At 14 h, there was no significant difference of the tissue concentration between the topical and oral groups, although the plasma concentration was about 17-fold higher in the oral group than in the topical group. In conclusion, following topical application in a patch, ketoprofen shows rapid and sustained delivery to the underlying tissues without a significant increase of the plasma drug concentration.

Stankovic, K.M., Adachi, O., Tsuji, K., Kristiansen, A.G., Adams, J.C., Rosen, V., and McKenna, M.J.
Differences in gene expression between the otic capsule and other bones.
Hear Res 265, 83-89, 2010
Our long term goal is to understand the molecular pathology of otosclerosis and to develop better forms of therapy. Toward this goal, the current study focused on characterizing the molecular factors responsible for the unique biological features of the otic capsule: its minimal rate of remodeling, and lack of healing capacity when fractured. We compared expression levels of 62 genes involved in bone metabolism between the adult murine otic capsule and the tibia and parietal bones; the latter exemplify bones formed by endochondral and intramembranous ossification, respectively. Gene expression levels were measured using real-time quantitative RT-PCR and analyzed using tools of bioinformatics. Expression patterns of key genes were verified with in situ hybridization. The molecular profile of the otic capsule was distinctly different from that of the tibia and parietal bone. Genes found to be most characteristic of the otic capsule were: osteoprotegerin（opg）, bone morphogenetic protein receptor 1b（bmpr1b）and bone morphogenetic protein 3（bmp3）. Expression

levels were high for opg and bmpr1b, and minimal for bmp3 within the otic capsule. We concluded that opg and bmpr1b likely play important roles in inhibition of remodeling within the otic capsule.

Tateishi T, Tsuchiya M, Motosugi N, Asahina S, Ikeda H, Cho S, Muneta T.
Graft length change and radiographic assessment of femoral drill hole position for medial patellofemoral ligament reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (in press)
Medial patellofemoral ligament (MPFL) reconstruction has been recognized as a useful treatment method for patella instability. However, the optimal fixation site has not been well investigated, and few reports have examined intraoperative graft length change. The purpose of the study is to evaluate the intraoperative graft length change and femoral drill hole position to find the optimal graft placement. The graft length change between the two points on patella and femur was measured using Isotac ((R)) and Isometric Positioner ((R)) during passive knee motion in 27 cases of MPFL. The location of Isotac ((R)) was also evaluated on the 2-directional radiograph. The pre- and postoperative radiographic assessments have been done in order to evaluate the effect of MPFL reconstruction on patellofemoral alignment. There were 10 cases in which the distance between the two points became longer during knee flexion, 8 cases in which it became shorter and the remaining 9 cases in which the distance changed within 2 mm. The femoral drill hole position was assessed assuming that the maximum anterior-posterior (AP) diameter of the femur on the lateral radiograph was defined as 100%. The distance of the femoral tunnel position from the articular surface averaged 50% overall, 46% in the short group, 55% in the longer group and 48% in the isometric group ($P < 0.001$). Patella height seemingly affected the length change character. The intraoperative length change influenced the early recovery of knee range motion postoperatively. The femoral tunnel position is reaffirmed to be an essential determinant for the graft length change in the MPFL reconstruction. Both graft length change measurements and intraoperative radiographic assessment are practical for proper graft placement.

Tsuji, K., Cox, K., Gamer, L., Graf, D., Economides, A., and Rosen, V.
Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair.
J Orthop Res 28, 384-389, 2010
While the osteoinductive activity of recombinant bone morphogenetic protein 7 (BMP7) is well established, evaluation of the role of endogenous BMP7 in bone formation and fracture healing has been hampered by perinatal lethality in BMP7 knockout mice. Here we employ conditional deletion of BMP7 from the embryonic limb prior to the onset of skeletogenesis to create limb bones lacking BMP7. We find that the absence of locally produced BMP7 has no effect on postnatal limb growth, articular cartilage formation, maintenance of bone mass, or fracture healing. Our data suggest that other BMPs present in adult bone are sufficient to compensate for the absence of BMP7.

Hayashi M, Muneta T, Takahashi T, Ju YJ, Tsuji K, Sekiya I.
Intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 retard progression of existing cartilage degeneration.
Journal of Orthopaedic Research, 28: 1502–1506, 2010
We investigated the effect of weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on prevention of progression of existing cartilage degeneration in an osteoarthritis model in rabbits. An anterior cruciate ligament transection (ACLT) model was used to create a progressive osteoarthritis model. BMP-7 was intra-articular injected weekly into the right knee and PBS into the left knee from 4 weeks after ACLT. Both sides of the knees were compared macroscopically, histologically, immunohistochemically, and by micro CT. Macroscopically, fibrillation in the femoral condyle was observed 4 weeks after ACLT. In the control knees, cartilage degeneration further progressed throughout the 12-week period. In the BMP-7 treated knee, osteoarthritis progression was milder than in the control knees. Histologically, safranin-O staining was decreased in the surgical knees at 4 weeks. Obvious erosions in both medial and lateral condyles were revealed in the control knees at 12 weeks, while cartilage matrix was predominantly retained in the BMP-7 treated knees. The macroscopic and microscopic OA score in the BMP-7 treated knee was better than that in the control in each rabbit. Immunohistochemical analysis demonstrated that both type II collagen and BMP-7 were more expressed in cartilage treated with BMP-7. Micro CT analysis showed that osteophytes were smaller in the BMP-7 treated knee compared to that of the control. Weekly intra-articular injections of BMP-7 inhibited progression of existing cartilage degeneration.

Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I.
Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits.
Arthritis Res Ther., 12 (6) :R206, 2010.
Synovial mesenchymal stem cells (MSCs) have high proliferative and chondrogenic potentials, and MSCs transplanted into the articular cartilage defect produce

abundant extracellular matrix. Because of similarities between the articular cartilage and the intervertebral disc cartilage, synovial MSCs are a potential cell source for disc regeneration. Here, we examined the effect of intradiscal transplantation of synovial MSCs after aspiration of nucleus pulposus in rabbits. The nucleus pulposus tissues of rabbit's intervertebral discs were aspirated to induce disc degeneration, and allogenic synovial MSCs were transplanted. At 2, 4, 6, 8, 16, 24 weeks postoperatively, we evaluated with imaging analyses such as X-ray and magnetic resonance imaging（MRI）, and histological analysis. To investigate interaction between synovial MSCs and nucleus pulposus cells, human synovial MSCs and rat nucleus pulposus cells were co-cultured, and species specific microarray were performed. The existence of transplanted cells labeled with DiI or derived from green fluorescent protein（GFP）-expressing transgenic rabbits was confirmed up until 24 weeks. X-ray analyses demonstrated that intervertebral disc height in the MSC group remained higher than that in the degeneration group. T2 weighted MR imaging showed higher signal intensity of nucleus pulposus in the MSC group. Immunohistological analyses revealed higher expression of type II collagen around nucleus pulposus cells in the MSC group compared with even that of the normal group. In co-culture of rat nucleus pulposus cells and human synovial MSCs, species specific microarray revealed that gene profiles of nucleus pulposus were altered markedly with suppression of genes relating matrix degradative enzymes and inflammatory cytokines. Synovial MSCs injected into the nucleus pulposus space promoted synthesis of the remaining nucleus pulposus cells to type II collagen and inhibition of expressions of degradative enzymes and inflammatory cytokines, resulting in maintaining the structure of the intervertebral disc being maintained.

Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Morito T, Yagishita K, Sekiya I.
Revision anterior cruciate ligament reconstruction by double-bundle technique using multi-strand semitendinosus tendon.
Arthroscopy. 26（6）:769-81, 2010
The purpose of the study was to compare the outcome of revision anterior cruciate ligament（ACL）reconstruction by the double-bundle（DB）technique using multi-strand semitendinosus tendon with that of primary reconstruction by use of the same technique. The study included 21 patients who underwent revision ACL reconstruction（mean follow-up, 40 months）with the semitendinosus tendon DB technique between 1995 and 2006 and 86 unilateral primary DB ACL reconstructions（mean follow-up, 33 months）between 2000 and 2004. The outcome of both groups was compared based on differences between operated and unoperated limbs and modified International Knee Documentation Committee grades. Both the overall and sports-related subjective scores were evaluated between the 2 groups. The KT measurements（MEDmetric, San Diego, CA）averaged 1.7 mm（SD, 1.8 mm）in the revision group and 1.5 mm（SD, 1.6 mm）in the primary group. There was no significant difference in KT measurements between the 2 groups. The Lachman test was negative in 83% of revision cases and 87% of primary cases; the anterior drawer test was negative in 83% and 91%, respectively, and the pivot-shift test was negative in 78% and 90%, respectively. There was a tendency for a positive pivot-shift test in the revision group being higher. The Lysholm score and subjective recovery score were significantly lower in the revision group. The semitendinosus tendon DB revision procedure provided range of motion and anterior stability comparable to those after primary DB surgery and a comparable return to athletic activities. However, the patients tended to have positive pivot-shift test results. The revision cases were also inferior in terms of the general evaluation of recovery of knee condition. The outcome scores were lower overall in the revision group.

Yamazaki J, Muneta T, Koga H, Sekiya I, Ju YJ, Morito T, Yagishita K.
Radiographic description of femoral tunnel placement expressed as intercondylar clock time in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.（in press）
The purpose of this study was to propose an objective description of femoral tunnel position expressed as time of the intercondylar clock in ACL reconstruction using a simple radiograph for the sake of objective discussion and technical improvement. The reproducibility of the method was evaluated in double-bundle（DB）reconstructions. The first series of 54 knees in 54 patients who underwent primary "isometric" DB ACL reconstructions from 1995 to 2002 were randomly picked up. The second series of 48 knees in 48 patients with primary "anatomic" DB ACL reconstructions during 2007 were assessed as a recent femoral tunnel position with the same method. All DB reconstructions of ACL with the anteromedial（AM）and posterolateral（PL）bundles were performed with an arthroscopically assisted trans-tibial technique. The o'clock description of femoral tunnel placement was expressed using a weight-bearing posterior-anterior view at 45 degrees of flexion（45 degrees W/B PA view）of the knee. Assessment was undertaken with radiographs 1 year postoperatively. The o'clock descriptions of femoral tunnel placement resulted in noon 40 min（standard deviation（SD）: 10 min）for the AM bundle and one o'clock 40 min（SD: 20 min）for the PL bundle on average in the "isometric" reconstruction. In the "anatomic" reconstruction, the time

descriptions of femoral tunnel placement were one o'clock 20 min（SD: 10 min）for the AM bundle and two o'clock 20 min（SD: 20 min）for the PL bundle on average. With the intra-examiner reproducibility assessment in the "anatomic" reconstruction, the differences between first and second assessments averaged 10 min（SD: 7 min）for femoral tunnel placement of the AM bundle and 12 min（SD: 9 min）of the PL bundle. Regarding the inter-examiner reproducibility, the differences between two examiners averaged 9 min（SD: 6 min）for femoral tunnel placement of the AM bundle and 14 min（SD: 9 min）of the PL bundle. This simple radiographic assessment is reproducible and reliable for clinical use, and useful for the evaluation of ACL reconstructive procedures.

Yamazaki J, Muneta T, Ju YJ, Morito T, Okuwaki,T, Sekiya I.
Hip Acetabular Dysplasia and Joint Laxity of Female Anterior Cruciate Ligament-Injured Patients.
Am J Sports Med.（in press）
It has been noted that some female anterior cruciate ligament-injured patients have complaints of both coxalgia and joint laxity. Female anterior cruciate ligament-injured patients tend to have both acetabular dysplasia and generalized joint laxity. Hip radiographs of 100 female anterior cruciate ligament-injured patients and 40 female athletes without any hip joint complaints or history of anterior cruciate ligament injury were evaluated by measuring their center-edge angle（CEA）. In addition, generalized joint laxity tests using 8 items were performed for anterior cruciate ligament-injured patients. Anterior-posterior（A-P）tibiofemoral translation of the uninjured knee was measured using a KT-1000 knee arthrometer to evaluate joint laxity under anesthesia before anterior cruciate ligament reconstruction. The average（± standard deviation）CEA of female anterior cruciate ligament-injured patients was 25.5° ± 5.3°（uninjured side）and 25.8° ± 4.8°（injured side）, and that of the control group was 28.2° ± 4.2°（right side）and 29.2° ± 5.7°（left side）, both $P < .05$. Among the 100 patients with anterior cruciate ligament tears, both the generalized joint laxity score and A-P tibiofemoral translation of the group with acetabular dysplasia（CEA of <25° , n = 37）were significantly greater than that of the normal group（CEA of ≥25° , n = 63）. There was a negative correlation between the CEA of female anterior cruciate ligament-injured patients and both the generalized joint laxity score and A-P tibiofemoral translation. The CEA of female anterior cruciate ligament-injured patients was significantly smaller than that of the control group. Statstical analysis showed a moderate negative correlation between the CEA and generalized joint laxity score. Female athletes with an anterior cruciate ligament injury had an increased prevalence of acetabular dysplasia and generalized joint laxity.

Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H.
Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion.
J Neurosci Res. 88（16）:3598-609, 2010
The options for treating stroke are limited, but stem cells hold promise as a therapy because of their multipotency. Neuronal cells derived from mesenchymal stem cells（MSC）were reported to have more therapeutic effect than MSCs. For elucidating the therapeutic mechanism of neuronal cells, here we generated a model of focal cerebral infarction by performing left common carotid artery occlusion in adult gerbils. We transfected human trabecular bone-derived MSCs（hMSCs）with the Notch intracellular domain to induce their differentiation into neuronal cells（hN-MSCs）. These cells were stereotaxically transplanted into the local ischemic hemisphere 4 days after the occlusion. Behavioral analyses were conducted 28 days after transplantation, and then fluorescence in situ hybridization（FISH）and a histological evaluation were performed. Histologically, transplanted cells were distributed around the periinfarct region, and approximately 8.5% and 4.2% of hN-MSCs and hMSCs survived, respectively; 53.2% ± 9.6% of hN-MSCs were microtubule-associated protein 2（+）（MAP-2（+））and extended neurites, whereas only 0.9% ± 0.3% of hMSCs were MAP-2（+）. In FISH, human nucleus-specific signals were detected in both hN-MSCs and hMSCs grafted brains, but no transplanted cell had a merged gerbil-specific nuclear signals. hN-MSC-transplanted animals showed significantly better recovery than animals given control vehicle in the T-maze, bilateral asymmetry, and open field tests. These findings suggested that hN-MSCs have greater therapeutic potential than hMSCs for stroke and that cell fusion does not primarily contribute to the therapeutic mechanism of MSC transplantation.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

間葉幹細胞を用いた新規治療:これまで教室のメインテーマとして滑膜幹細胞の細胞移植による関節軟骨欠損の治療を臨床応用まで高めた。さらに性能の良い修復法を検討している。滑膜幹細胞の臨床応用を米国の施設とも共同して臨床応用を進めていく計画が進んでいる。また関節軟骨欠損の治療ばかりでなく、他の関節構造、特に変形性関節症の進展の主要素の1つと考えられる半月板の再建に滑膜幹細胞を応用する基礎的研究が進んでいる。

各種BMPの機能解析と新規治療法の開発:各種BMPを発生過程さらに生後の必要な時期にノックアウト、ノックダウンする技術を駆使して研究をしてきた研究者をGCOEの国際シャペロン教官として教室に得た。M・Dタワーに教室が移転し、ノックアウトマウスの飼育スペースも確保され、BMP4, BMP7のコンディショナルノックアウトマウスの作成に成功した。現在解析中である。Harvard大学との共同研究も引き続いて行われている。

膝前十字靱帯損傷治療などの主要関節手術の成績改善:高い臨床治療実績、長年のACL研究、解剖学的研究に基づいた再建手術の最適化に加えて、バイオメカ研究によってACL損傷患者の特徴を明らかにしつつある。またフィールドスタディも進みつつある。その他人工関節手術の向上のために臨床研究を主体として取り組んでいる。

B（研究教育環境）

M・Dタワーへの引っ越しにより教室の研究面積が3倍増した。新しい動物実験設備も完備し、遺伝子組み換え実験室も整った。GCOE事業担当分野間の共同研究も複数進行している。教育スタッフの増員によって大学院生各人に対する個別教育の時間が増し、同時に複数の研究テーマを扱うことを大学院生のルーチンにしている。

C（人材確保）

国際シャペロンの分野への採用により研究の幅が広がり、教育の充実化が図られた。毎年3,4人の大学院生を受け入れ、国外からの留学生も慎重な選択のもとに受け入れている。

D（人材育成）

週3回の早朝カンファランスと勉強会により、研究基盤として最新研究に遅れないように留意している。海外の著名な研究者や新進の研究者に積極的に依頼し、セミナーを適時開催している。セミナーの前後に大学院生に個別の指導を依頼し、実施している。国際シャペロンの分野への採用により教育の充実化が図られた。

E（国際化）

国際シャペロンとの関係からHarvard大学歯学部との2つの共同研究プロジェクトを立ち上げた。滑膜幹細胞を用いた関節軟骨細胞治療の臨床研究が米国テキサス州の病院と進みつつある。

大学院生卒業生が米国に2名とノルウェーに留学し、業績を挙げている。大学院卒業生の留学率が増加している。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

GCOEにより新たに教室に加わった国際シャペロン教官による各種改変マウスを駆使したBMP研究の推進。シャペロン教官による大学院生の個別教育の充実。滑膜幹細胞を用いた治療法の臨床応用の推進と間葉幹細胞研究の対象の広域化。国際的な共同研究の推進。事業者間の共同研究の立ち上げ。

6）英文原著論文

- ◎Ichinose S, Muneta T, Koga H, Segawa Y, Tagami M, Tsuji K, Sekiya I.
  Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes.
  Lab Invest. 90（2）:210-21, 2010.
  PDF
- Ohno K, Noguchi Y, Kawashima Y, Yagishita K, Kitamura K.
  Secondary hyperbaric oxygen therapy for idiopathic sudden sensorineural healing loss in the subacute and chronic phases.
  J Med Dent Sci, 57（2）:1-6, 2010.
- Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T.
  Mechanisms for Noncontact Anterior Cruciate Ligament Injuries: Knee Joint Kinematics in 10 Injury Situations From Female Team Handball and Basketball.
  Am J Sports Med 38（11）:2218-2225, 2010
- ◎Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, Tsuji K, I. Sekiya I.
  Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins.
  Osteoarthritis and cartilage 18:1300-9, 2010
  PDF
- Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y.
  Osteopontin Deficiency Impairs Wear Debris–Induced Osteolysis via Regulation of Cytokine Secretion From Murine Macrophages.
  ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 62（5）: 1329–1337, 2010
- Sekiya I, Morito T, Hara K, Yamazaki J, Ju YJ, Yagishita K, Mochizuki T, Tsuji K, Muneta T.
  Ketoprofen absorption by muscle and tendon after topical or oral administration in patients undergoing anterior cruciate ligament reconstruction.
  AAPS PharmSciTech. 11（1）:154-8, 2010
- Stankovic, K.M., Adachi, O., Tsuji, K., Kristiansen, A.G., Adams, J.C., Rosen, V., and McKenna, M.J.
  Differences in gene expression between the otic capsule and other bones.

Hear Res 265, 83-89, 2010
・Tateishi T, Tsuchiya M, Motosugi N, Asahina S, Ikeda H, Cho S, Muneta T.
Graft length change and radiographic assessment of femoral drill hole position for medial patellofemoral ligament reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc（in press）
・Tsuji, K., Cox, K., Gamer, L., Graf, D., Economides, A., and Rosen, V.
Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair.
J Orthop Res 28, 384-389, 2010
・◎Hayashi M, Muneta T, Takahashi T, Ju YJ, Tsuji K, Sekiya I.
Intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 retard progression of existing cartilage degeneration.
Journal of Orthopaedic Research, 28: 1502–1506, 2010
PDF
・◎Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I.
Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits.
Arthritis Res Ther., 12（6）:R206, 2010.
PDF
・Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Morito T, Yagishita K, Sekiya I.
Revision anterior cruciate ligament reconstruction by double-bundle technique using multi-strand semitendinosus tendon.
Arthroscopy. 26（6）:769-81, 2010
・Yamazaki J, Muneta T, Koga H, Sekiya I, Ju YJ, Morito T, Yagishita K.
Radiographic description of femoral tunnel placement expressed as intercondylar clock time in double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.（in press）
・Yamazaki J, Muneta T, Ju YJ, Morito T, Okuwaki,T, Sekiya I.
Hip Acetabular Dysplasia and Joint Laxity of Female Anterior Cruciate Ligament-Injured Patients.
Am J Sports Med.（in press）
・Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H.
Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion.
J Neurosci Res. 88（16）:3598-609, 2010
・Nimura A, Nakagawa T, Wakabayashi Y, Sekiya I, Okawa A, Muneta T.
Repair of olecranon fractures using fiberWire without metallic implants: report of two cases.
J Orthop Surg Res. 2010 Oct 12;5:73.
・◎Nimura A, Muneta T, Otabe K, Koga H, Ju YJ, Mochizuki T, Suzuki K, Sekiya I.
Analysis of human synovial and bone marrow mesenchymal stem cells in relation to heat-inactivation of autologous and fetal bovine serums.
BMC Musculoskelet Disord. 2010 Sep 14;11:208.
PDF
・Kume H, Inoue Y, Mitsuoka A, Sugano N, Morito T, Muneta T.
Doppler ultrasonography-aided early diagnosis of venous thromboembolism after total knee arthroplasty.
Eur J Vasc Endovasc Surg. 2010 Nov;40（5）:664-8.
・Mitsuoka A, Inoue Y, Kume H, Sugano N, Morito T, Muneta T.
Discrimination of types of venous emboli using Doppler ultrasound.
Ann Vasc Surg. 2010 Aug;24（6）:721-7.

7）総説ならびに著書

・宗田　大
前十字靭帯損傷―最も重要なスポーツ膝傷害―
Medical Practice 27:880-883, 20100426
・宗田　大
膝後外側動揺に対する手術療法。
関節外科29:703-711, 2010
・宗田　大
「あなたの安心:健康寿命をのばそう⑤」
朝日新聞2010.6.30 p.32
・宗田　大
前十字靱帯損傷の診断と治療。
整形外科61（10）:1129-1137, 2010
・宗田　大
Anterior Knee Painに対する保存療法。
整形災害外科53:1153-1160, 2010
・宗田　大
膝痛の診断と治療―プライマリケアにおける痛みへの対処―
日本医事新報No.4520（2010.12.11）:55-59
・宗田　大
膝の痛み。
NHKきょうの健康大百科。NHK出版　P.166-173
2010.4.25
・宗田　大
膝屈筋腱を用いるMPFL再建術の手術手技とコツ
膝関節鏡視下手術　吉矢晋一編集　文光堂 2010.5.27
p.123-133

・宗田　大
膝の痛み　クリニカルプラクティス
整形外科臨床パサージュ　中山書店　2010.6.15
中高年齢期の膝痛を治療する　p.201-222
・宗田　大
EBMを正しく理解するために。
今日の整形外科治療指針。編集　国分正一ほか　医学書院　2010.6.15　P9-10
・宗田　大
ガイドラインの考え方。
今日の整形外科治療指針。編集　国分正一ほか　医学書院　2010.6.15　P11
・半月板の再生医療
関矢一郎・宗田　大
臨床整形外科 p42-45 Vol. 46 No.1 2011
・関矢一郎
骨折
人体の構造と機能からみた病態生理ビジュアルマップ5
佐藤千史、井上智子編集
医学書院　p1-7　2010
・関矢一郎、宗田大
変形性膝関節症
人体の構造と機能からみた病態生理ビジュアルマップ5
・佐藤千史、井上智子編集
医学書院　p29-34　2010
・大串始, 服部耕治, 牛田多加志, 星和人, 関矢一郎, 早乙女進一, 脇谷滋之, 名井陽, 安達伸生, 加藤幸夫, 河口浩之, 黒田良祐, 木下靭彦, 梅澤明弘, 田中康仁, 山田陽一, 袴塚康治, 山我美佳, 菅原桂, 中島武彦
臨床研究の活性化と再生医療産業化の促進 ―骨・関節領域（整形外科, 歯科・口腔外科）の実施者からの提言―
再生医療, 9（3）: 393-400, 2010.
・関矢一郎　宗田　大
外傷学総論・組織損傷の修復過程
アスリートのリハビリテーションとリコンディショニング
p42-49
小林寛和編集　文光堂　2010
・関矢一郎　宗田　大
人工膝関節置換術の有効性と限界
Osteoarthritis Update　2010　No.3　12-15
・関矢一郎　宗田　大
再生医療の変形性膝関節症への応用と今後の展望
Osteoarthritis Update　2010　No.3　37-41
・関矢一郎　宗田　大
リウマチ下肢の再建手術
膝展開困難例への対応とコツ
リウマチ診療の要点と盲点
p258-259
木村友厚編集　文光堂　2010
・関矢一郎　宗田　大
分子レベルからみた整形外科疾患
変形性膝関節症に対する骨形成因子の複数回関節内投与　―実験的検討から―
整形災害外科　890-891　2010
・関矢一郎　宗田　大
誌上シンポジウム
軟骨再生　基礎と臨床　滑膜細胞を利用した治療
滑膜間葉幹細胞の鏡視下移植術
臨床整形外科　2010　Vol.45　No.9　791-795
・関矢一郎　宗田　大
第115回日本解剖学会　シンポジウム
「骨髄幹細胞―再生医療や難病治療への新しい展開―」
滑膜幹細胞は軟骨再生の細胞源として有用
メディカルトリビューン　2010
・朱　寧進、宗田　大
外傷学総論　2.病態のとらえ方
アスリートのリハビリテーションとリコンディショニング　上巻
外傷学総論/検査・測定と評価 2010, p29-33
・仁賀定雄
救急外傷発生時におけるプロアスリートへの対応.
競技スポーツ帯同時に役立つ外傷初期治療ガイド（臨床スポーツ医学臨時増刊号）.9、2010
・仁賀定雄、池田浩夫
骨盤・股関節・大腿の障害.
スポーツ外傷・障害診療実践マニュアル.Monthly Book Orthopaedics vol23（5）、13、2010
・立石智彦　長瀬寅　清水禎則
特集:スポーツ外傷・障害診療実践マニュアルⅣ。治療法　装具療法―下肢
MB Orthop.23（5）:213-218,2010.
・望月　智之、秋田　恵一
腱板筋群の構造と停止部の新しい解剖知見.
肩関節鏡手術のための局所解剖.

肩関節鏡下手術　10-16, 2010
・望月　智之
コンタクトアスリートにおける反復性肩関節脱臼の術後再発予防.
臨床スポーツ医学　12:1369-74, 2010
・望月　智之、秋田　恵一
腱板筋群の構造と停止部の新しい解剖知見.
別冊整形外科　58:　7-11,2010
・八木茂典
Anterior knee pain に対する的確・迅速な臨床推論のポイント.
理学療法28. 2011
・八木茂典, ほか
公認アスレティックトレーナーワークブック.
アスレティックリハビリテーション. 2011.
・八木茂典
投球障害肩の診かた　機能解剖学的アプローチ.
Sportsmedicine 118. 23-24. 2010.
・八木茂典,　ほか
最先端ACLリハの実際　重要ポイントを整理する.
Sportsmedicine 123. 3-20. 2010.
・八木茂典
シンスプリントの重症度分類と治療.
Sportsmedicine 126. 21-22. 2010.
・八木茂典
肩腱板停止部の新しい解剖知見にもとづいた評価方法の開発 針筋電図を用いた検討.
リハビリテーションひろば 49. 2011.
・柳下和慶
靭帯損傷治療における高気圧酸素治療の意義はどのようなものでしょうか.
スキル関節鏡視下手術アトラス・膝関節鏡視下手術.
吉矢晋一編集、越智光夫監修.P336, 文光堂 2010.
・柳下和慶.
高気圧酸素治療による再建ACLの治癒促進.
特集ACL再建術後のスポーツ復帰.
関節外科30（1）:35-40, 2011
・柳下和慶、加藤剛、外川誠一郎、岡崎史紘、眞野喜洋.
スポーツ外傷とスポーツパフォーマンスに対する高気圧酸素の効果及びアンチ・ドーピングとの関連.―現況と展望―.
日本高気圧環境・潜水医学会雑誌　Vol.45（3）:99-105, 2010.

8）平成22年度までの自己評価

GCOEの国際シャペロンが教室に加わったことにより基礎的研究と教育の密度が増し、新しい研究が芽生えつつある。教室も活気を増した。新棟に引っ越し研究環境も改善した。しかし論文数は十分とはいえず、もう少し効率の良いまとめ方と論文作成が望まれる。研究の拡大による出費の増加に対しより多くの研究費の獲得や施設の拡充の必要性も感じる。臨床面での滑膜幹細胞を用いた軟骨治療に対する一層の改善と発展が求められる。

9）和文原著論文

・清水　禎則、立石　智彦、長瀬　寅、本杉　直哉、中川　照彦、土屋　正光
大相撲力士の膝前十字靱帯損傷の検討 －靱帯再建例と保存治療例との比較－
日本整形外科スポーツ医学会誌 Vol.30（2）:119-123, 2010
・清水　禎則、立石　智彦、長瀬　寅、中川　照彦、土屋　正光
大相撲力士の大腿部肉離れ
日本臨床スポーツ医学会誌 Vol.18（3）:416-421, 2010
・清水　禎則、立石　智彦、長瀬　寅、朝比奈　信太郎、長谷川 清一郎、土屋　正光
両側同時TKAにおける輸血の必要性に関する検討
日本人工関節学会誌 Vol.40:606-607, 2010
・朱　寧進、関矢　一郎、柳下　和慶、原　憲司、森戸　俊行、山崎　順也、四宮謙一、宗田　大
膝前十字靭帯損傷患者術中超音波測定器による膝関節軟骨のIntegrity, 厚さの測定と他の因子のとの関連
日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌vol.35, No.1, 6-7, 2010
・朱　寧進、関矢　一郎、柳下　和慶、原　憲司、森戸　俊行、山崎　順也、四宮謙一、宗田　大
膝前十字靭帯損傷患者における血清グリコサミノグリカン濃度の測定
日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会雑誌vol.35, No.1, 84-85, 2010
・朱　寧進、関矢　一郎、柳下　和慶、森戸　俊行、山崎　順也、片桐　洋樹、四宮謙一、宗田　大
内側型変形性膝関節症における下肢機能軸と膝蓋腱脛骨付着部の関係と影響を与える因子の検討:3Dテンプレートを用いた研究
日本人工関節学会会誌　第40巻138-139, 2010
・仁賀定雄、池田浩夫.

肉離れの発生機序（サッカー）.
Monthly Book Orthopaedics vol23（12）、15-25、2010
・仁賀定雄、池田浩夫.
ACL再建術後のスポーツ復帰（プロサッカー）.
関節外科vol30（1）、86-93, 2010

10）学会発表（英文）

Otabe K, Sekiya I, Kawashima N, Muneta T.
Regenerative Property of Mesenchymal Stem Cells in Oral Tissues.
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T.
Reconstruction of the mechanism for ACL injury among female basketball and team handball players using a model-based image matching technique -A new hypothesis for ACL injury mechanisms based on video analysis-.
14th ESSKA Congress. Poster, Oslo, Norway, 2010.6.9-12

Koga H, Bahr R, Myklebust G, Engebretsen L, Grund T, Muneta T, Sekiya I, Krosshaug T.
The First Ever Video Analysis of Anterior Tibial Translation in a Non-contact ACL Injury Situation Using Model-based Image-matching Technique.
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T. Reconstruction of the mechanism for non-contact ACL injury among female basketball and team handball players using a model-based image-matching technique.
ACL Research Retreat V. Oral, Greensboro, 2010.3.25-27

Koga H, Krosshaug T.
Reconstruction of the injury mechanisms for ACL injuries in alpine skiing.
FIS ISS Steering Committee Meeting. Oral, Oslo, 2010.4.15

Koga H, Krosshaug T.
The first ever analysis of anterior tibial translation in a non-contact ACL injury situation.
Oslo Sports Trauma Research Center spring seminar. Oral, Oslo, 2010.5.10-12

Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T.
Reconstruction of the Mechanism for ACL Injury Among Female Basketball and Team Handball Players from Videotapes Using a Model-based Image Matching Technique.
57th Annual Meeting of American College of Sports Medicine. Oral, Baltimore, 2010.6.2-5

Koga H, Nakamae A, Shima Y, Iwasa J, Muneta T, Sekiya I, Myklebust G, Engebretsen L, Bahr R, Krosshaug T.
Reconstruction of ACL injury mechanism using a model-based image matching technique -A new hypothesis for ACL injury mechanisms-.
7th Biennual Meeting of Asia-Pacific Orthopaedic Society for Sports Medicine. Oral, Okinawa, 2010.7.2-4

Koga H, Bahr R, Myklebust G, Engebretsen L, Muneta T, Sekiya I, Krosshaug T.
A New Hypothesis for ACL Injury Mechanisms based on Video Analysis using Model-Based Image-Matching Technique.
International Symposium on Ligaments & Tendons - XI. Oral, Long Beach, 2011.1.12

Shimaya M, Muneta T, Ichinose S, Tsuji K, I. Sekiya I.
Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins.
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, New Orleans, 2010.3.6-9

Shimizu S, Tateishi T, Nagase T, Asahina S, Motosugi N, Nakagawa T, Tsuchiya M.
Radiological Examination of Position of the Patella after Medial Patellofemoral Ligament Reconstruction.
14th ESSKA Congress, Poster, Oslo, 2010.6.9-12

Shimizu S, Tateishi T, Nagase T, Nakagawa T, Tsuchiya M.
Study of Anterior Cruciate Ligament Injuries in Professional Sumo Wrestlers.
14th ESSKA Congress, Poster, Oslo, 2010.6.9-12

Sekiya I, Muneta T.
Synovial stem cell-based regeneration of tissues in the knee joint
7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. Morning Lecture, Oral, Kyoto, 2010.10.19

Sekiya I, Muneta T.
Clinical Researches and Experiences for Cartilage Regeneration Therapy
Cartilage regeneration with synovial stem cells.
The International Symposium of Global Center of Excellence Program, Oral, Tokyo, 2011.2.3

Sekiya I.
Mesenchymal stem cells derived from synovium: their properties and clinical application for cartilage regeneration

Oral, Morehouse College, Atlanta, 2011.1.18

Nakamura T, Sekiya I, Hatsushika D, Horie M, Tsuji K, Muneta T, Kawarasaki T, Watanabe A, Hishikawa S, Fujimoto Y, Tanaka H, Kobayashi E
Synovial Mesenchymal Stem Cells Transplantation Contributes to Cartilage Regeneration in Porcine Model
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Takahashi T, Muneta T, Sekiya I.
BMP-7 inhibits cartilage degeneration through suppression of inflammation in rat zymosan induced arthritis
7th Combined Meeting of the ORS, Poster, Kyoto, 2010.10.16-19

Toru Takahashi, Takeshi Muneta, Ichiro Sekiya
Articular cartilage degradation in rat zymosan induced arthritis is inhibited by repetitive intraarticular administrations of Bone Morphogenetic Protein-7 through suppression of synovial inflammation
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Miyatake K, Yamaga M, Sekiya I, Muneta T, Tsuji K.
Human chitinase 3-like protein 2（YKL39）; an osteoarthritis-associated gene which enhances adipogenic differentiation of synovial fibroblasts.
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Miyamoto T, Muneta T, Tsuji K, Sekiya I.
Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of MMP-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits
Annual meeting of Orthopaedic Research Society. Poster, Long Beach, 2011.1.13-16

Yagishita K, Kato T, Togawa S, Okazaki F, Kojima Y, Mano Y.
Quantitative analysis of reduction of soft tissue edema by hyperbaric oxygen therapy application.
43th Undersea and Hyperbaric Medical Society UHMS. Oral, Florida, 2010.6.3

11）学会発表（和文）

・浅野浩司
人工膝関節置換術後の疼痛管理
第40回日本人工関節学会 沖縄 2010.2.26

・浅野浩司
術前屈曲角度が小さい症例の人工関節置換術後の屈曲角度
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・浅野浩司
CR型人工膝関節置換術における軟部組織の緊張と術後の可動域との関係
第41回日本人工関節学会 東京 2011.2.26

・池田浩夫
膝屈筋腱による一重束ACL再建術において大腿骨骨孔の位置が術後中期経過症例の安定性に及ぼす影響
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・荻内隆司、岩澤大輔、池田浩夫、栗原良暁
腓骨筋腱脱臼に対する仮性嚢閉鎖術の成績 －後方切開と前方切開法の比較－
足の外科学会　奈良　2010.6.17

・荻内隆司、笠原政志、山本利春、有馬三郎
新入生に対する整形外科的メディカルチェックの有効性
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・荻内隆司、笠原政志、山本利春、有馬三郎
新入生に対するメディカルチェック後の整形外科治療について
第21回　臨床スポーツ医学会　つくば　2010.11.6

・片桐洋樹、宗田大、関矢一郎、朱寧進、森戸俊行、山崎順也、柳下和慶
人工膝関節全置換術における膝蓋骨や大腿骨滑車部の厚さ、後方顆部の高さが術後膝関節可動域改善へ与える影響
第40回日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-.27

・栗原良暁
A Case of Knee Osteonecrosis after Union of Coronal Fracture of Femoral Lateral Condyle
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・栗原良暁
大腿骨外顆Coronal Fracture癒合後に骨壊死を生じた1例
第37回　関東膝を語る会　東京　2010.11.13

・古賀英之、中前敦雄、島洋祐、岩佐潤二、Grethe Mykrebust、Lars Engebretsen、Roald Bahr、宗田大、関矢一郎、Tron Krosshaug
Model-based image matching techniqueを用いた非接

触性ACL損傷メカニズムの解析-非接触性ACL損傷メカニズムについての新たな仮説-
第25回日本整形外科学会基礎学術集会　京都　2010.10.14-15

・古賀英之、中前敦雄、島洋祐、岩佐潤二、Grethe Mykrebust、Lars Engebretsen、Roald Bahr、宗田大、関矢一郎、Tron Krosshaug
Model-based image matching techniqueを用いた非接触性ACL損傷メカニズムの解析
第37回日本臨床バイオメカニクス学会　京都　2010.11.1-2

・古賀英之、Roald Bahr、Grethe Mykrebust、Lars Engebretsen、宗田大、関矢一郎、Tron Krosshaug
Model-based image matching techniqueを用いた非接触性ACL損傷における脛骨前方引き出しのビデオ解析
第21回日本臨床スポーツ医学会　つくば　2010.11.6-7

・古賀英之、Roald Bahr、Tone Bere、宗田大、関矢一郎、Tron Krosshaug
アルペンスキーワールドカップにおけるACL損傷メカニズムの解析
第21回日本臨床スポーツ医学会　つくば　2010.11.6-7

・古賀英之、Grethe Mykrebust、Lars Engebretsen、Roald Bahr、宗田大、関矢一郎、Tron Krosshaug
Model-based image matching techniqueを用いた非接触性ACL損傷メカニズムの解析 －非接触性ACL損傷メカニズムについての新たな仮説－
第15回御茶ノ水・膝スポーツ懇話会　東京　2011.11.25

・清水　禎則、立石　智彦、長瀬　寅、朝比奈　信太郎、長谷川 清一郎、土屋　正光
両側同時TKAにおける輸血の必要性に関する検討
第40回日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-27

・清水　禎則、立石　智彦、長瀬　寅、朝比奈　信太郎、中川　照彦、土屋　正光
大相撲力士の膝前十字靱帯損傷 －靱帯再建例と保存治療例との比較－
第83回日本整形外科学会学術総会　東京　2010.5.27-30

・清水　禎則、宗田　大、柳下　和慶、朱　寧進、森戸　俊行、山崎　順也、関矢　一郎
PCLを含む複合靱帯損傷に対する治療経験
第59回東日本整形災害外科学会　盛岡　2010.9.16-17

・朱　寧進、宗田　大、関矢一郎、柳下和慶、森戸俊行、山崎順也、片桐洋樹、四宮謙一
内側型変形性膝関節症における下腿機能軸と膝蓋腱脛骨付着部の関係と影響を与える因子の検討:3Dテンプレートを用いた研究
第40回　日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-27.

・朱　寧進、宗田　大、山賀　美芽、森戸俊行山崎順也、関矢一郎、四宮　謙一
変形性膝関節症に対する積極的膝伸展・屈曲訓練介入研究の短期成績
第83回　日本整形外科学会総会　東京　2010.5.27-30.

・朱　寧進、宗田　大、関矢　一郎、柳下　和慶、森戸　俊行、山崎　順也、片桐　洋樹、四宮　謙一
膝前十字靱帯再建患者における術後血清グリコサミノグリカン濃度の推移
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・関芳衛
【U-17日本代表】2009 U-17ワールドカップナイジェリア帯同報告
第46 回サッカードクターセミナー　横浜　2010.2.27

・関芳衛, 栗原良暁, 荻内隆司, 立石智彦, 中川照彦, 本杉直哉, 岩澤大輔, 土屋正光
膝関節限局型色素性絨毛結節性滑膜炎に対する鏡視下摘出術の経験
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・関芳衛, 立石智彦, 岩澤大輔, 本杉直哉, 中川照彦, 土屋正光
スポーツ選手に生じた足関節内果疲労骨折に対する手術療法の有用性
第36回日本整形外科スポーツ医学会学術集会　横浜　2010.9.11

・関芳衛, 宮川俊平, 荒川正一, 池田浩, 須藤隆二, 長尾雅史, 鈴木円, 福林徹
関東大学サッカーリーグにおける傷害報告の分析　Jリーグとの比較
第21回日本臨床スポーツ医学会学術集会　つくば市　2010.11.6

・関矢一郎、朱寧進、森戸俊行、山崎順也、片桐洋樹、柳下和慶、宗田　大
TKAの大腿骨シャンファーカット後の脛骨骨切量とギャップ変化との関係
日本人工関節学会　那覇　2010.2.27
関矢一郎、森戸俊行、尾島美代子、朱寧進、山崎順也、

島谷雅之、山賀美芽、宗田大
関節液中の間葉幹細胞は軟骨変性に応じて増加する
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・関矢 一郎、中村 智祐、宗田 大、菱川修司、田中穂積、小林英司
ブタを用いた滑膜幹細胞による低侵襲関節軟骨再生治療の関節鏡・組織学的検討
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・関矢一郎、宗田大、尾島美代子
関節液中の間葉幹細胞による変形性膝関節症の早期診断と予後予測
厚労省長寿科学研究班会議　名古屋　2010.8.14

・関矢一郎、市野瀬志津子、古賀英之、瀬川裕子、四宮謙一、宗田大
骨髄間葉幹細胞, 滑膜間葉幹細胞, 軟骨細胞のin vitro軟骨分化過程における形態学的比較
日本整形外科学会基礎学術集会　京都　2010.10.14

・高橋　徹　宗田　大　関矢　一郎
ラット関節炎モデルに対するBMP-7関節内投与効果の検討
第23回日本軟骨代謝学会　鹿児島　2010.4.2-3

・高橋　徹　宗田　大　関矢　一郎
BMP-7 inhibits cartilage degeneration in rat zymosan induced arthritis
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・高橋　徹　宗田　大　関矢　一郎
「BMP-7 の関節内投与は関節炎を抑制し軟骨基質を維持する」
第25回日本整形外科学会基礎学術集会　京都　2010.10-14-15

・立石智彦、中川照彦、土屋正光
膝蓋骨骨折に対する早期超音波骨折治療器の使用経験
第37回日本生体電気・物理刺激研究会　東京　2010.3.6

・立石智彦
フットボール選手におけるリスフラン靭帯損傷
日本フットボール学会7th Congress　東京　2010.3.13

・立石智彦、長瀬寅、清水禎則、中川照彦、土屋正光、白澤進一
膝蓋骨骨折に対するStrong Suture法による手術法
第83回日本整形外科学会学術総会 東京　2010.5.29

・立石智彦、長瀬寅、清水禎則、本杉直哉、朝比奈信太郎、中川照彦、土屋正光、宗田大
MPFL再建術における術中isometryの重要性　-膝蓋骨高位・術後早期可動域との関連について -
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・立石智彦、清水禎則、関芳衛、岩澤大輔、中川照彦、土屋正光
スポーツ現場での肉離れの治療及び復帰
パネル:肉離れの最先端治療と将来の展望
第36回日本整形外科スポーツ医学会学術集会　茨城　2010.9.10

・仲津留恵日、張禎浩、能瀬宏行
Experience of Treatment for Bilateral-Patella habitual dislocation
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS）　沖縄　2010.7.2-4

・中村智祐、関矢一郎、宗田大、菱川修司、田中穂積、小林英司
Arthroscopic and histological analyses of low invasive articular cartilage repair with porcine synovial mesenchymal stem cells
第23回日本軟骨代謝学会　鹿児島　2010.4.3

・中村智祐、関矢一郎、宗田大、河原崎達雄、菱川修司、田中穂積、小林英司
滑膜幹細胞を用いた低侵襲な軟骨再生治療のブタでの検討
第14回日本適応医学会 東京 2010.7.3

・中村智祐、関矢一郎、初鹿大祐、宗田大、河原崎達雄、渡辺淳也、菱川修司、田中穂積、小林英司
ブタ滑膜間葉幹細胞を用いた低侵襲軟骨再生治療の検討
第29回日本運動器移植・再生医学研究会 京都 2010.9.25

・中村智祐、関矢一郎、菱川修司、田中穂積、河原崎達雄、渡辺淳也、四宮謙一、小林英司、宗田大
ブタを用いた滑膜幹細胞による低侵襲軟骨再生治療:（GFP）関節鏡, 組織, MRI による評価
第25回日本整形外科学会基礎学術集会 京都 2010.10.15

・中村智祐、関矢一郎、河原崎達雄、渡辺淳也、和田佑一、小林英司、宗田大
滑膜幹細胞による低侵襲軟骨再生治療:ブタを用いた検討

第37回関東膝を語る会 東京 2010.11.13

・Hatsushika D, Sekiya I, Yamaguchi K, Akita K, Muneta T.
Anatomy of Normal Human Posterior Cruciate Ligament Attachments Evaluated by Divided Small Bundles
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・林将也
内反変形重症度はTKA成績に影響するか?
第40回日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26

・林将也
若年者へのTKAは躊躇すべきか?
第83回日本整形外科学会総会　東京　2010.5.29

・林将也
内側型変形性膝関節症の重症度は内反角に左右されるか?
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・宮武和正、山賀美芽、関矢一郎、宗田大、辻邦和
変形性関節症に伴い滑膜で発現が増大する遺伝子YKL39（chitinase 3-like protein 2）の分子機能の解析
第24回日本軟骨代謝学会学術集会　福岡　2011.3.4-5

・宮本　崇、関矢　一郎、田渕　隆、松本　健治、宗田　大
椎間板変性に対する滑膜幹細胞移植のウサギを用いた検討
第23回日本軟骨代謝学会　鹿児島　2010.4.2

・宮本　崇、関矢　一郎、宗田　大
滑膜幹細胞移植は椎間板変性を抑制する
第29回日本運動器移植・再生医学研究会　京都　2010.9.25

・宮本　崇、関矢　一郎、田渕　隆、松本　健治、四宮　謙一、宗田　大
滑膜幹細胞移植による椎間板変性抑制効果
第25回日本整形外科学会基礎学術集会　京都　2010.10.15

・望月智之、加藤敦夫、山口久美子、菅谷啓之、二村昭元、中川照彦、秋田恵一
肩関節包大結節付着部の組織学的検討.
第37回日本肩関節学会 仙台　2010.10.8

・八木茂典, ほか
膝蓋腱炎に対し手術療法を施行した一例
スポーツ傷害フォーラム　2010

・八木茂典, ほか
棘上筋と棘下筋の機能について －針筋電図を用いた検討－.
第7回肩の運動機能研究会 2010.

・八木茂典, ほか
シンスプリントの発生要因に関する解剖学的検討
第21回日本臨床スポーツ医学会　つくば　2010.11.6-7

・柳下和慶、加藤剛、外川誠一郎、岡崎史紘、眞野喜洋
軟部組織外傷に対する高気圧酸素治療.
第83回日本整形外科学会学術総会　東京　2010.5.27

・柳下和慶、加藤剛、朱寧進、森戸俊行、山崎順也、片桐洋樹、関矢一郎、宗田大、四宮謙一
大腿骨内顆に生じた局所性移動性骨粗鬆症（Regional migratory osteoporosis）に対する高気圧酸素治療
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・柳下和慶、加藤剛、外川誠一郎、宗田大
高気圧酸素治療前後の下腿腫脹変化の各種定量評価と、各評価法の比較検討
第21回日本臨床スポーツ医学会　つくば　2010.11.6-7

・山賀美芽、辻邦和、宮武和正、山田淳、片桐洋樹、関矢一郎、宗田大
関節液中のオステオポンチン量は膝関節痛の程度に相関する
第24回日本軟骨代謝学会学術集会 福岡 2011.3.4-5

・山崎順也　宗田大　関矢一郎　朱寧進　森戸俊行　片桐洋樹　四宮謙一
一期的に両膝前十字靭帯再建術を施行した症例の術後成績
第2回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（JOSKAS） 沖縄　2010.7.2-4

・結城新
若年者サッカー選手に生じた大腿骨小転子裂離骨折の1例と、撮影された受傷シーンからの受傷機転の検討
第36回日本整形外科スポーツ医学会学術集会　横浜　2010.9.10

・王耀東、渡邊敏文、石突正文、宗田大
Charcot膝関節に対して両側人工膝関節全置換術を施行した1例
第40回　日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-27

・船内雄生、渡邊敏文、石突正文、宗田大
人工股関節置換術後の緩みから骨盤内嚢腫様病変を発症した1例
第40回　日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-27

・渡邊敏文、石突正文、王耀東、船内雄生、宗田大
人工膝関節全置換術における術中関節ギャップと術後可動域の関係
渡邊敏文、石突正文、王耀東、船内雄生、宗田大
第40回　日本人工関節学会　沖縄　2010.2.26-27

12）受賞

古賀英之
Mechanisms for Noncontact Anterior Cruciate Ligament Injuries: Knee Joint Kinematics in 10 Injury Situations From Female Team Handball and Basketball.
東京医科歯科大学整形外科同門会研究奨励賞

13）外部資金の獲得状況

科学研究費補助金、基盤C
研究題目:滑膜幹細胞を用いた新しい低侵襲骨関節疾患治療の臨床応用の発展のための大動物研究
代表:宗田　大
期間:平成21年―平成23年
研究総額:340万円

科学研究費補助金、 基盤C
研究題目: 軟骨損傷に対する滑膜幹細胞浮遊液静置療法において細胞接着効率を向上させる為の検討
代表: 関矢一郎
期間: 平成21年―平成23年
研究費総額:340万円

科学研究費補助金、基盤研究C
研究題目:骨形成因子BMPシグナルによる造血微小環境のホメオスタシスの制御
代表:辻邦和
平成22年度―平成24年度
研究費総額:405万円

科学研究費補助金、基盤研究C
研究題目:変形性膝関節症における疼痛の分子メカニズムの解析
代表　朱寧進
平成22年度―平成24年度
研究費総額:382万円

14）特別講演、招待講演、シンポジウム

・宗田　大
人工関節置換術後の血栓予防とクレキサンの使用
愛媛VTE学術講演会　愛媛松山　2010.1.23
・宗田　大
膝関節機能解剖の最新の知見とその臨床応用
整形外科リハビリテーション学会　名古屋　2010.4.10
・宗田　大
前十字靭帯損傷の診断と治療
熊本機能病院特別セミナー　熊本　2010.4.15
・宗田　大
前十字靭帯損傷の診断と治療の基本
第8回東京スポーツ整形外科研修会　東京　2010.4.24
・Muneta T
Normal ACL anatomy in respect to double-bundle reconstruction.
7th International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine. Keelung, 2010.5.8
・Muneta T
Revision Anterior Cruciate Ligament Reconstruction By Double-Bundle Technique.
7th International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine. Keelung, 2010.5.8
・Muneta T
Differences in Kinematics of Single Leg Squatting between Anterior Cruciate Ligament Injured Patients and Healthy Controls.
7th International Symposium for Orthopaedic Sports Medicine. Keelung, 2010.5.8
・宗田　大
前十字靭帯再建術の最新の話題
ICL 7: Specialty Day JOA 2010　東京　2010. 5. 28
・宗田　大
膝痛の診断と治療
JOA2010　教育研修講演 35　東京　2010.5.30
・Muneta T
16 years of experience in ACL double-bundle surgery.
ACL double-bundle symposium. Finland, 2010.6.15
・宗田　大
外来での膝関節疾患の診断と治療
第3回東京女子医科大学整形外科集談会　東京　2010.6.20
・宗田　大

PCL再建術Up-to-date
JOSKAS 2010　沖縄　2010.7.3
・宗田　大
ロコモと膝の痛み
第1回山口県運動疾患研究会　新山口　2010.8.5
・宗田　大
スポーツ膝損傷:外来での診断治療・リハビリテーション
岐阜スポーツ外傷治療・リハビリテーション研修会　岐阜
・宗田　大
最近の前十字靱帯再建術とその問題点
第7回和歌山骨関節靱帯フォーラム　和歌山
2010.8.28
・宗田　大
V-リーグ選手の下肢の傷害・障害の治療経験
第38回青森県スポーツ医学研究会。青森　2010.9.4
・宗田　大
ACLの解剖とハムストリング腱ACL再建術
第20回大阪スポーツ傷害研究会　大阪　2010.9.18
・宗田　大
変形性膝関節症の治療の実際
山梨県ヒアルロン酸製剤研究会　山梨
・宗田　大
膝損傷とスポーツ復帰における変形性関節症の影響
第37回神奈川膝21
・Muneta T
Knee Joint Disorders and Joint Fluid Stem Cells.
Fourth International Conference on Cell Therapy.
Seoul, 2010.11.11
・宗田　大
膝関節のスポーツ障害
第38回日本関節病学会「関節病セミナー3」 京都
2010.11.18
・関矢一郎
間葉幹細胞を用いる軟骨再生医療
日本解剖学会総会シンポジウム　盛岡　2010.3.28
・関矢一郎、森戸俊行、島谷雅之、宮本崇、鈴木志郎、
中村智祐、朱寧進、山崎順也、小田邉浩二、四宮謙一、
宗田大
軟骨再生の基礎と臨床の進歩:滑膜間葉幹細胞と関節
内組織修復
日本整形外科学会総会シンポジウム 東京　2010.5.27
・関矢一郎
スポーツ障害に対する関節鏡視下手術の現況と展望
軟骨損傷に対する関節鏡視下での滑膜幹細胞移植術
日本外科系連合学会シンポジウム 浦安　2010.6.15
・関矢一郎
幹細胞による関節軟骨の再生医療 （膝の軟骨損傷か
ら変形性関節症まで）
代々木ゼミナール特別講義　東京　2010.6.25
・関矢一郎
滑膜間葉幹細胞から考える膝関節疾患の病態と再生
第1回横浜膝関節研究会招待講演　横浜　2010.7.17
・関矢一郎
滑膜幹細胞による軟骨再生医療
東京医科歯科大学大学院セミナー　東京　2010.7.26
・関矢一郎
滑膜間葉幹細胞の視点から膝関節疾患の病態と再生
を考える
JST育成研究公開イベント　広島　2010.9.3
・関矢一郎
滑膜細胞の挙動から膝関節疾患の病態と治療を考える
中央区・港区整形外科医会学術講演会　東京
2010.10.8
・関矢一郎、森戸俊行、二村昭元、古賀英之、島谷雅之、
宮本崇、中村智祐、鈴木志郎、小田邉浩二、朱寧進、
山崎順也、片桐洋樹、望月智之、堀江雅史、四宮謙一、
宗田大
滑膜間葉幹細胞による軟骨再生医療の開発
日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム　京都
2010.10.14
・関矢一郎、宗田大
滑膜幹細胞による軟骨再生医療
日本再生医療学会シンポジウム運動機能の回復をめ
ざした再生医療　東京　2011.3.2
・関矢一郎、宗田大
滑膜間葉幹細胞を用いる低侵襲軟骨再生医療におけ
るマグネシウムの細胞接着促進効果
第24回日本軟骨代謝学会シンポジウム組織工学的
手法を用いた軟骨病変の治療の現状と展望　福岡
2011.3.4
・荻内隆司
生活習慣病（成人病）に対する適切な運動療法（5）
変形性関節症を合併する場合のプログラム
健康運動指導士養成講習会　東京　2010.7.17
・古賀英之
Model-based image matching（MBIM）を用いた
ACL損傷メカニズムの解析
第10回膝と歩む会　東京　2010.6.28

・中村智祐、関矢一郎、宗田大、菱川修司、田中穂積、小林英司
Arthroscopic and histological analyses of low invasive articular cartilage repair with porcine synovial mesenchymal stem cells
第23回日本軟骨代謝学会　鹿児島　2010.4.3
・中村智祐、関矢一郎、宗田大、河原崎達雄、菱川修司、田中穂積、小林英司
滑膜幹細胞を用いた低侵襲な軟骨再生治療のブタでの検討
第14回日本適応医学会　東京　2010.7.3
・仁賀定雄
MRIタイプ分類に基づく肉離れの治療経験
Jリーグチームドクター研修会　東京　2010.1.17
・仁賀定雄
サッカー選手の肉離れ（肉離れ治療の最前線）
第8回東京スポーツ整形外科研修会　東京　2010.4.24
・仁賀定雄
プロサッカー選手の肉離れと早期現場復帰への工夫
日本整形外科学会　東京　2010.5.28
・仁賀定雄
プロサッカー選手のスポーツ障害
東京医科歯科関連同門会学術講演会　東京　2010.2.27
・仁賀定雄
プロサッカー選手のスポーツ障害
松山市医師会健康スポーツ医部会総会講演会　松山　2010.6.12
・仁賀定雄
プロサッカー選手のスポーツ障害～プロ選手の特殊性と一般選手へ還元できる知見について～
熊谷市医師会健康スポーツ医会　2010.11.11
・仁賀定雄
プロサッカー選手のスポーツ障害
西多摩整形外科医会　立川　2010.11.25
・立石智彦
プロスポーツ選手の外傷・障害と現場Drの現状
札幌市整形外科医会総会　札幌　2010.2.13
・宮本　崇、関矢　一郎、田渕　隆、松本　健治、宗田　大
椎間板変性に対する滑膜幹細胞移植のウサギを用いた検討
第23回日本軟骨代謝学会　鹿児島　2010.4.2
・柳下和慶
外保連活動による診療報酬改定活動の報告と今後の方向性.
第45回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会　岡山　2010.11.26
・柳下和慶、加藤剛、結城新、外川誠一郎、小島泰史、岡崎史紘、椎塚詰仁、鈴木直子、山本和雄、眞野喜洋
下腿正常例における高気圧酸素治療前後での下腿腫脹変化の各種定量的検討.
第45回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会　岡山　2010.11.27
・柳下和慶
高気圧酸素治療の原理と、スポーツ外傷における早期競技復帰のための適応
筑波スポーツ医学セミナー2010. Sports Medicine In Tsukuba（SMIT）筑波　2010.7.24
・柳下和慶
減圧症と高気圧酸素治療.
斜里・北海道　2010.7.26
・柳下和慶
高気圧酸素治療
チームドクター研修会2010　つくば 2010.11.5
・柳下和慶
高気圧酸素治療と遅発性放射線障害に対する適応
兵庫県立粒子線医療センター教育講演　兵庫県たつの市　2010.11.12
・柳下和慶
スポーツ外傷に対する高気圧酸素治療
第22回城南地区荏原医師会講演会　東京　2010.2.13
・柳下和慶、加藤剛、外川誠一郎、岡崎史紘、眞野喜洋
下肢末梢循環不全に対する高気圧酸素治療
第8回日本フットケア学会年次学術集会　東京　2010.2.27
・柳下和慶
スポーツ外傷に対する高気圧酸素治療
三共第一勉強会　東京　2010.3.2
・柳下和慶
スポーツ外傷に対する高気圧酸素治療の有効性.
第一回日本高気圧環境・潜水医学会中国四国地方会学術総会　岡山　2010.3.20
・柳下和慶
肉離れに対する高気圧酸素治療
第8回東京スポーツ整形外科研修会　東京　2010.4.24
・柳下和慶
今春の診療報酬改定への経緯と今後の展望

第10回日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会学術総会 川崎　2010.6.12

・柳下和慶

高気圧酸素治療の適応疾患

第9回日本高気圧環境・潜水医学会教育集会　東京　2010.7.4

・柳下和慶

高気圧酸素治療の適応疾患

第11回高気圧酸素治療専門医研修講座.高気圧酸素治療の適応疾患　東京　2010.7.4

・柳下和慶

高気圧酸素治療といわゆる酸素カプセルの違いについて.

日本スポーツ歯科医学会第10回認定研修会　博多　2010.7.10

・八木茂典, ほか

陸上競技長距離選手のシンスプリント　発生率と重症度分類.

シンポジウム持久系スポーツの傷害.

スポーツ傷害フォーラム　大阪　2010.1.30

・八木茂典

膝関節の機能解剖とその治療への応用.

整形外科リハビリテーション学会第187回　特別講演　名古屋　2010.4.10

・八木茂典

アスレティックリハビリテーション.

平成22年度（財）日本体育協会公認アスレティックトレーナー養成講習会専門科目第5期講習会　名古屋　2010.10.23

15）主催学会

第2回スポーツリハビリテーションワークショップ

2010年1月16日（土）16:00-20:30　東京医科歯科大学5号館4F講堂

第7回御茶ノ水関節症研修会

2010年1月22日（金）18:30-20:30 東京医科歯科大学Ⅰ期棟　2階　講義室　1

第21回運動器外科学セミナー

2010年　3月 29日（月）　18:00-19:00

第22回運動器外科学セミナー

2010年4月5日（月）18:00-19:00

大学院セミナー

2010年4月16日（金）18:00-19:00

第8回東京スポーツ整形外科研修会

平成22年4月24日（土）14:30-20:00ベルサール神田　宗田主催

第3回スポーツリハビリテーションワークショップ

2010年6月26日（土）16:00-21:00　東京医科歯科大学5号館4F講堂

第10回膝と歩む会

6月28日　19:30-21:00 ホテルメトロポリタンエドモント　3階『千鳥』

第4回スポーツリハビリテーションワークショップ

2010年10月2日（土）17:30-21:00　東京医科歯科大学5号館4F講堂

第23回運動器外科学セミナー

2010年11月29日（月）18:00-19:00

大学院ミニレクチャー

2010年12月1日（水）18:00-19:00

16）新聞、雑誌、TV報道

読売新聞　2011年3月4日

医療ルネサンス　No.5033　再生医療　3/7

欠けた軟骨　幹細胞で修復

関節にかかる衝撃を和らげる「軟骨」。栄養を届ける血管が通っていないため、一度すり減ったり欠けたりすると元に戻らないとされる。しかし今、その常識は覆されつつある。

神奈川県の男性会社員Bさん(40)は2009年3月、ランニング中に転び、左膝を痛めた。歩く際に激痛が走るようになり、4か月後、総合病院で膝関節内の軟骨の切れ端などを取り除く手術を受けた。

しかし、関節鏡という小型カメラで関節内を見ると、大腿骨側の軟骨が縦1・6㌢、横0・8㌢ほど欠け、骨がむき出しになっていた。これが痛みの原因だった。

「現状では、軟骨を元に戻す治療法はない」と医師に言われ、太ももの筋力を強化するリハビリに取り組んだ。しかし、2か月たっても多少歩きにくさが改善しただけで、激痛は消えない。そのうち、以前は1時間で済んだ通勤に1時間半かかるようになった。

そこでインターネットで調べて知ったのが、東京医科歯科大（東京都文京区）で研究中の「軟骨再生」だった。体の様々な組織に変化する「幹細胞」を使うという。「痛みを感じずに歩きたい」と、臨床研究への参加を希望し、昨年春、この再生治療を受けた。

同大軟骨再生学准教授の関矢一郎さんによると、患者の膝関節を取り巻く軟骨と滑膜は、同じ幹細胞が分化してできており、滑膜から採取した幹細胞を、軟骨の欠けた部位に入れると軟骨に変化するという。

まず、関節鏡で関節内を見ながら、滑膜組織を0・5㌢・㌘採取。その中の幹細胞を2週間、自分の血液で5000万個まで培養し、軟骨が欠けた部分に注射器で入れる。

Bさんは1週間で退院し、最初の1か月半は松葉づえで生活、3か月後には職場復帰した。「日に日に良くなり、今は歩いても痛まない」と喜ぶ。膝への負担が大きいランニングは無理だが、週末には5㌔のウオーキングをする。

関矢さんらの研究では、軟骨を損傷し半年以上たった患者12人（20～51歳）にこの治療を行うと、9人で軟骨が増えた。ただし、強度が十分になるまで2年以上かかるとみられ、激しい運動は避けた方がよい。

対象は当面、直径2㌢程度までの狭い範囲の欠損だが、関矢さんは「将来は、加齢に伴い軟骨がすり減って起こる変形性膝関節症に応用したい」と話す。

軟骨再生の研究は他の施設でも進んでおり、患者から取った軟骨細胞を増やし、欠損部分に縫いつける方法なども試みられている。

幹細胞注入で膝関節軟骨が再生した例の関節鏡画像。傷ついて荒れた関節軟骨の表面（上）が、11か月後には滑らかになった（下）（関矢一郎さん提供）

膝関節の断面図

滑膜

軟骨

産経新聞2011年1月7日朝刊1面

軟骨で成果　世界初、臨床応用へ

東京医科歯科大　研究グループ

激しい痛みや腫れを伴う変形性膝関節症の原因になる半月板損傷について、自分の膝の滑膜の幹細胞を取り出して培養し、それを注入して半月板を再生させる医療が東京医科歯科大学の関矢一郎准教授（軟骨再生学）の研究グループによって実用化されることになった。半月板再生の臨床応用は世界初という。厚生労働省によると、自覚症状のある変形性膝関節症の患者数は約1千万人と推定され、半月板再生医療に注目が集まりそうだ。

半月板は膝の骨と骨の間で衝撃を和らげるクッションの役目を果たす軟骨組織。過度のスポーツによる損傷や加齢によって、摩耗したり変形した場合は治りにくく、これまでは糸で縫合したり、傷ついた箇所を切除するなどの治療が行われてきた。

関矢准教授のグループは、滑膜が軟骨などの損傷が起きると傷を治そうと関節液中に幹細胞を増加させ、損傷した箇所を自己修復しようとする機能に着目。滑膜を取り出し、患者の血液で分離した血清によって増やした幹細胞組織を注射で複数回、損傷箇所に注入することにした。

関矢准教授らは平成20年から膝の軟骨が損傷、欠損した20～51歳の患者12人にこの治療を施したところ、7割で軟骨が再生した。これを半月板の再生に応用する方針。関矢准教授は「滑膜幹細胞は年齢にはほぼ関係なく、体外で増やせる。まずは外傷性の半月板損傷の患者を対象にし、加齢による変形などの患者にも応用したい」としている。

「資料送っておいて」と言われたらチャンスと思え！
大塚 寿
定価840円（税込）
双葉社

17）GCOE総合講義

講義の題目:Recent advances in BMP biology（辻　邦和）
講義の日時:平成22年10月4日　12時30分から2時
講義のサマリー（講義は英語）

骨形成因子BMPの骨のホメオスタシスにおける生理機能に関して、一年間の研究の進捗状況（未発表データ）の紹介を行った。講義の前半は、加齢に伴う骨量の減少におけるBMP3の生理機能の解析結果の紹介を行った。後半は、BMP分子による骨髄内の造血微小環境（Hematopoietic Stem Cell Niche）の制御に関して、ノックアウトマウスを用いた実験の結果の紹介を行った。ハンドアウトは提出済みです。

19）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前

運動器外科	教授	宗田　大
軟骨再生学	准教授	関矢　一郎
GCOE	講師	辻　邦和
運動器外科	助教	朱　寧進
軟骨再生学	助教	森戸　俊行
軟骨再生学	助教	古賀　英之
運動器外科	医員	清水　禎則
運動器外科	医員	山崎　順也
運動器外科	大学院生	中村　智祐
運動器外科	大学院生	高橋　徹
運動器外科	大学院生	宮本　崇
運動器外科	大学院生	八木　茂典
運動器外科	大学院生	鈴木　志郎
運動器外科	大学院生	山賀　美芽
運動器外科	大学院生	宮武　和正
運動器外科	大学院生	初鹿　大祐
運動器外科	大学院生	小田邉　浩二
運動器外科	大学院生	片桐　洋樹
運動器外科	大学院生	山田　淳
運動器外科	大学院生	結城　新
運動器外科	大学院生	大関　信武
運動器外科	大学院生	奥野　真起子
運動器外科	専攻生	アブラ・カハル
運動器外科	非常勤講師	山本　晴康
運動器外科	非常勤講師	松原　正明

20）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点

GCOEによる研究の活発化や業績の評価は高い。しかし臨床分野の一人の事業担当者としてみるとGCOEのメリットはあまり大きいとはいえない。メリットに対する報告書作成に必要な労力、拘束時間は少ないとはいえない。国際シンポジウムの開催について、この機会に海外の研究者を招聘できることは魅力があるが、GCOE予算の使い勝手の悪さは上記同様であり、時間および神経の浪費が大きいと感じる。

21）その他　研究教育活動について特記する点

海外からの著名な研究者を定期的に招聘し、英語によるプレゼンテーション、討論、講演を行っている。

また留学経験者の話やトラベリングフェローの経験を聞く機会を設け、留学に対する前向きな姿勢を養うことに努力している。

Osteoarthritis and Cartilage 18 (2010) 1300–1309

Osteoarthritis and Cartilage

OARSI OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY INTERNATIONAL

Magnesium enhances adherence and cartilage formation of synovial mesenchymal stem cells through integrins

M. Shimaya †, T. Muneta †‡, S. Ichinose §, K. Tsuji ‡, I. Sekiya ‖*

† Section of Orthopedic Surgery, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
‡ Global Center of Excellence Program for International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Disease, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
§ Instrumental Analysis Research Center, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
‖ Section of Cartilage Regeneration, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 December 2009
Accepted 10 June 2010

Keywords:
Magnesium
Mesenchymal stem cell
Integrin
Cartilage regeneration

SUMMARY

Objective: We previously reported that more than 60% of synovial mesenchymal stem cells (MSCs) placed on osteochondral defects adhered to the defect within 10 min and promoted cartilage regeneration. The efficiency of adherence is considered to depend on the interaction between cells and extracellular matrix (ECM), in which integrins may play some important roles. Divalent cations such as calcium, magnesium, and manganese may affect functions of integrins, and the integrins may be involved in differentiation of MSCs. Among divalent cations, magnesium is used in clinical practice as a therapeutic agent and increases the affinity of integrin to ECM. In this study, we investigated whether magnesium enhanced adherence and chondrogenesis of synovial MSC through integrins.

Methods: We performed assays for adherence of human synovial MSCs to collagen-coated slides, *in vitro* chondrogenesis, *ex vivo* assays for adherence of human synovial MSCs to osteochondral defect, and *in vivo* assays for adherence and cartilage formation of synovial MSCs in a rabbit osteochondral defect model.

Results: Magnesium increased adhesion of human synovial MSCs to collagen, and this effect was inhibited by neutralizing antibodies for integrin α3 and β1. Magnesium also promoted synthesis of cartilage matrix during *in vitro* chondrogenesis of synovial MSCs, which was diminished by neutralizing antibodies for integrin β1 but not for integrin α3. *Ex vivo* analyses demonstrated that magnesium enhanced adherence of human synovial MSCs to osteochondral defects. *In vivo* studies in rabbits showed that magnesium promoted adherence at 1 day and cartilage formation of synovial MSCs at 2 weeks.

Conclusion: Magnesium enhanced adherence of synovial MSCs through integrins, which promoted synthesis of cartilage matrix at an early phase.

© 2010 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are useful cell sources for regenerative medicine[1–3]. Synovium is a practical MSC source for cartilage regeneration because of its superior proliferation potential with autologous human serum and high chondrogenic ability[4–10]. Current cell therapy for cartilage regeneration requires invasive procedures, periosteal coverage, and the use of scaffold[11,12]. We recently reported that more than 60% of synovial MSCs suspended in phosphate buffered saline (PBS) placed on the osteochondral defect adhered to the defect in 10 min and promoted cartilage regeneration[13]. This method makes it possible to transplant synovial MSCs on the osteochondral defect arthroscopically; however, any improvement in its efficiency for cell adhesion remains in question.

Integrins are a family of cell surface molecules which mediate adhesive interaction with extracellular matrix (ECM), activate intracellular pathways, and play important roles in many biological processes including differentiation[14–16]. Some functions of integrins are dependent on interaction with divalent cations such as calcium, magnesium, and manganese through a metal ion dependent adhesion site (MIDAS) and MIDAS-like motives[17,18]. Among divalent cations, calcium and magnesium are widely used in clinical practices as therapeutic agents, and magnesium increases the affinity of integrins for ligands including ECM in a millimolar concentration[19], while calcium reverses the increased affinity in some cases[20].

* Address correspondence and reprint requests to: Ichiro Sekiya, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School, Section of Cartilage Regeneration, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519 Japan. Tel: 81-3-5803-4020; Fax: 81-3-5803-0266.

E-mail addresses: shimaya.orj@tmd.ac.jp (M. Shimaya), muneta.orj@tmd.ac.jp (T. Muneta), ichinose.bioa@tmd.ac.jp (S. Ichinose), ktsuji.gcoe@tmd.ac.jp (K. Tsuji), sekiya.orj@tmd.ac.jp (I. Sekiya).

1063-4584/$ – see front matter © 2010 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.joca.2010.06.005

We hypothesized that the addition of magnesium to MSC suspension might enhance adherence of synovial MSCs to osteochondral defect, increase cartilage matrix synthesis of synovial MSCs, and finally accelerate cartilage regeneration. The purpose of this study was to investigate the effect of magnesium on adherence and cartilage formation of synovial stem cells through integrins. The results will clarify some novel functions of integrins and provide some clues for obtaining better clinical outcome for cartilage regeneration with synovial MSCs.

Materials and methods

Isolation and culture of MSCs

The study was approved by an institutional review board, and informed consents were obtained from all subjects. Human synovium harvested from three donors (27 and 34-year-old males and a 28-year-old female) during arthroscopic surgery was digested with 3 mg/ml Collagenase D (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 3 h. The nucleated cells were cultured at a clonal density in 150 cm^2 culture dishes (Nalge Nunc International, Rochester, NY) in 20 ml α-minimum essential medium (MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) for 14 days, then replated at 50 cells/cm^2, cultured for 14 days, and cryopreserved. The frozen cells were slowly thawed, plated, and incubated for 4 days. The cells were replated at 50 cells/cm^2 again and cultured for 14 days for analyses.

Skeletally mature Japanese white rabbits weighing 3.0 kg on average were used. Animal care was in accordance with our institutional guidelines. Synovium harvested from the right knees under anesthesia was digested in a 3 mg/ml collagenase type V (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) solution for 3 h. After filtering, the nucleated cells were cultured at 3×10^6 cells/cm^2 for 7 days, replated at 50 cells/cm^2, and cultured for 14 days for analyses.

Cell differentiation

One hundred human synovial MSCs were plated in 60-cm^2 dishes and cultured for 2 weeks. For adipogenesis, the medium was changed to adipogenic medium. The cells were cultured for an additional 3 weeks and stained with Oil red O solution. For osteogenesis, the medium was changed to osteogenic medium. The cells were cultured for an additional 4 weeks and stained with alizarin red solution[4,8]. For *in vitro* chondrogenic differentiation, 300,000 human synovial MSCs were pelleted and cultured for 7 and 21 days in chondrogenic medium containing 500 ng/ml bone morphogenetic protein (BMP)-7, (Stryker Biotech, Boston, MA), 10 ng/ml transforming growth factor (TGF)β3 (R&D Systems, Minneapolis, MN), and 100 nM dexamethasone (Sigma–Aldrich). The concentration of magnesium was adjusted by adding $MgCl_2$. For analyses of involvement of integrins, the cells were pre-incubated with or without 20 μg/ml neutralizing antibodies for integrin β1 (P5D2, R&D Systems) or α3 (P1B5, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 h, then the cells were pelleted and cultured in chondrogenic medium containing 0.8 or 5 mM magnesium for 21 days. No antibodies were re-added during the culture.

Surface epitopes

One hundred thousand synovial MSCs suspended in 200 μl PBS containing 20 μg/ml of antibody were incubated for 20 min at 4°C and subsequently incubated with R-phycoerythrin-coupled anti mouse IgG (AbD Serotech, Oxford, UK) for 20 min. Antibodies used in neutralizing against integrin β1 (P5D2, R&D Systems), α3 (P1B5, Santa Cruz Biotechnology), α4 (HP2/1, AbD Serotech), α5 (JBC5, AbD Serotech) and isotype control (R&D Systems) were used to detect epitopes. FITC conjugated antibody for the integrin α2 (AK7, AbD Serotech), CD44 and CD106 (eBioscience, San Diego, CA); CD105 and CD166 (Ancell corporation, Bayport, MN), CD45, CD34, CD90 and isotype control (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) were used. In double-staining for integrin α2 and α3, phycoerythrin (PE)-conjugated antibody for integrin α3 (BioLegend, San Diego, CA) was used.

In vitro *cell adhesion assay*

One hundred thousand human synovial MSCs suspended in 10 μl PBS with 0, 0.1, 1, 5, and 10 mM magnesium were placed on 8-well culture slides with or without type I collagen coating (Becton-Dickinson) for 10 min. After washing slides with PBS, the number of cells in 4 high power fields (HPFs) was counted, and the mean was determined. For neutralizing against adhesion molecules, cells were pre-incubated in PBS 20 μg/ml antibody for integrin β1 (P5D2, R&D Systems), vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1; BBIG-V1, R&D Systems), activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM; 105901, R&D Systems), integrin α2 (P1E6, Abcam, Cambridge, UK), α3 (P1B5, Santa Cruz Biotechnology), α4 (HP2/1, AbD Serotech), α5 (JBC5, AbD Serotech) and isotype control (R&D Systems) for 1 h.

Immunocytochemical analysis

Ten thousand human synovial MSCs adhering to collagen-coat slides under 10 mM magnesium were fixed with 99.5% acetone for 15 min. The slides were stained with the integrin α2 (P1E6, Abcam) or α3 (P1B5, Santa Cruz Biotechnology) (1:1000) for 1 h. After washing, the slides were stained with goat anti-mouse IgG labeled with Alexa fluor 488 (Invitrogen) for 1 h. The nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen). The number of integrin-positive cells and nuclei was counted using 3 HPFs.

Assay for sulfated glycosaminoglycan (sGAG) content of pellets

After 21 days of culture, pellets were digested for 24 h at 60°C in papain buffer (200 μg/ml papain (Sigma–Aldrich) and dissolved in 50 mM phosphate buffer containing 1 M NaCl, 5 mM cysteine–HCl and 1 mM EDTA). The GAG concentration of supernatant was determined by the Blyscan-assay (Biocolor Ltd, Newtonabbay, Ireland) according to manufacturer's instructions.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Total RNA was extracted from the pellets cultured for 3 weeks using QIAzol (Qiagen, Hiden, Germany) and the RNeasy micro kit (Qiagen). cDNA was synthesized with oligo-dT primer from total RNA using the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (RT) was performed by 30 min incubation at 55°C, followed by 5 min incubation at 85°C. Real-time PCR was performed in a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics) using FastStart TaqMan Probe Master and TaqMan probes for COL2A1 (#75) and β-Actin (#64) (Roche Diagnostics). After an initial denaturation step (95°C for 10 min), amplification was performed for 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 60 s).

DNA content of pellets

Undifferentiated MSCs and pellets at 21 days were digested with 3 mg/ml collagenase, and DNA was prepared with a QIAamp DNA mini kit (Qiagen). The DNA content was calculated from the absorbance at 260 nm.

Ex vivo *analyses of cells adhered to osteochondral defect*

Human osteochondral fragments at the lateral femoral condyle were harvested during total knee arthroplasty, and osteochondral defects at 2.5 mm in diameter were created. Then the defects were filled with 1.5×10^5 synovial MSCs labeled with DiI (Molecular Probes, Eugene, OR) in 8 μl PBS with 0, 1, and 10 mM magnesium. After 10 min, the fragments were turned over for 10 min. The DiI-positive cells in the dish were counted after trypsinization, and the number of the cells attached to the defects was calculated. The fluorescence images of the entire defect were photographed. The total fluorescence intensity of the remaining cells in the defect was determined by measuring the brightness in the defect using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

In vivo *analyses for adherence and cartilage formation*

Knees of rabbits were approached medially under anesthesia. Osteochondral defects (5 × 5 mm, 1.5 mm deep) were created in the trochlear groove. To transplant cells, the defect was filled with synovial MSCs suspension, and the knees were held stationary for 10 min with the defect facing upward. For adhesion analyses at 1 day, 2×10^6 allogenic DiI-labeled cells at passage 1 suspended in 30 μl PBS with 5 mM magnesium or in PBS in the contralateral knee were used. Total fluorescence intensity over the defect was evaluated by measuring the brightness of the entire defect using Image J software. The ratio of the fluorescence positive area over the defect was evaluated by measuring the square measure of the entire defect and the fluorescence positive area at 1 day. For analyses of cartilage regeneration at 14 and 28 days, 5×10^6 autologous synovial MSCs at passage 0, suspended in PBS with or without 5 mM magnesium were transplanted in the left knee 7 days after harvest of synovium from the right knee.

Histological analyses

The specimens were fixed with 4% paraformaldehyde solution, decalcified, and embedded in paraffin. Sections were stained with safranin-o/fast green. Image J was used for measurement of defects and safranin-o positive areas. Sections without staining were used for fluorescence.

For immunohistochemistry, sections were treated with 0.4 mg/ml proteinase K (DAKO, Carpinteria, CA) in Tris–HCl and normal horse serum after deparaffinization. Primary antibodies for type II collagen (Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan) and a secondary antibody of biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) were employed. Immunostaining was detected with VECTASTAIN ABC reagent (Vector Laboratories) followed by 3,3′-diaminobenzidine staining.

Transmission electron microscopy

Cartilage pellets and regenerated cartilage were fixed with 2.5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% OsO_4. After dehydration, they were embedded in Epon 812. Ultrathin (90 nm) sections were collected on copper grids, double-stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined by transmission electron microscopy (H-7100, Hitachi, Hitachinaka, Japan)[18].

Immunoelectron microscopy

After fixation in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde, pellets were immersed in 2.3 M sucrose for 24 h and frozen in liquid nitrogen. The frozen sections mounted on silane-coated glass were placed on droplets of 1% BSA on a Parafilm sheet and subsequently transferred to droplets of mouse antibody against collagen type I, type II (diluted to 1:20, Fuji Yakuhin, Japan) and chondroitin sulfate-proteoglycans (diluted to 1:50, Seikagaku Kogyo, Japan) for 48 h. They were then incubated with goat anti-mouse IgG + IgM conjugated with 10–15 nmΦ gold colloidal particles (diluted to 1:50 with 1% BSA in 0.1 M PBS, British Bio Cell International, UK) for 24 h. The sections were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in a 1% OsO_4 solution, and dehydrated in a graded series of ethanol. Then they were embedded in Epon 812, stained with uranyl acetate, and examined by TEM[21].

Statistical analyses

Mann–Whitney *U* tests were used. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Magnesium increases adhesion of human synovial MSCs through integrin α3 and β1

Human synovial cells had a colony forming ability and multi-differentiation potentials [Fig. 1(A)]. Flow cytometric analyses demonstrated that human synovial cells expressed CD44, 90, 105, 166 highly, and CD34, 45, 106 at a low level [Fig. 1(B)]. These findings demonstrated that human synovial cells had characteristics similar to those of MSCs.

Magnesium increased the number of synovial MSCs attached to collagen-coated slides dose-dependently [Fig. 1(C)]. Time lapse analysis showed that 5 mM magnesium caused thinning of cell shape and spread the cells on collagen-coated slides within 5 min, while the cell was still thick and round even after 25 min without magnesium or collagen-coating [Fig. 1(D)]. Human MSCs also expressed integrin α5, β1 highly, integrin α2, α3 modestly, and integrin α4 at a low level [Fig. 1(B)]. The effect of magnesium on attachment of synovial MSCs was diminished by the neutralizing antibodies for integrin α3 and β1 [Fig. 1(E)]. Some studies have reported that α2 integrin was a collagen receptor[14,15], therefore, we attempted more detailed examinations of antibodies for integrin α2 and α3. Double staining flow cytometric assay showed that the double positive rate was only 17% [Fig. 1(F)]. Immunocytochemical analysis showed that the α2 positive cell rate was 38%, and the α3 positive cell rate was 73% among cells adhering to the collagen slide in the presence of 10 mM magnesium [Fig. 1(G)].

Magnesium enhances chondrogenesis of human synovial MSCs

In pellet culture for *in vitro* chondrogenesis, the weight of the pellets at 7 days was affected by magnesium concentration, and 5 mM magnesium had the greatest effect [Fig. 2(A)]. The weight of the pellets cultured in 5 mM magnesium for 21 days was also heavier than those cultured in 0.8 mM magnesium in three other donors [Fig. 2(B left)]. Pellets cultured in 5 mM magnesium produced more sGAG than pellets cultured in 0.8 mM magnesium [Fig. 2(B, right)].

Pretreatment with neutralizing antibody for integrin β1 resulted in a decrease of pellet weight, sGAG content and safranin-o staining in pellets cultured in 5 mM magnesium at 21 days [Fig. 2(C)]. Pellets cultured in 5 mM magnesium showed higher COL2A1 expression than pellets cultured in 0.8 mM magnesium [Fig. 2(D)]. The DNA content of pellets greatly decreased in 3 weeks, and no significant difference was observed between pellets cultured in 0.8 and 5 mM magnesium [Fig. 2(E)].

Transmission electron microscopy revealed polygonal cells with short processes, containing well-developed rough

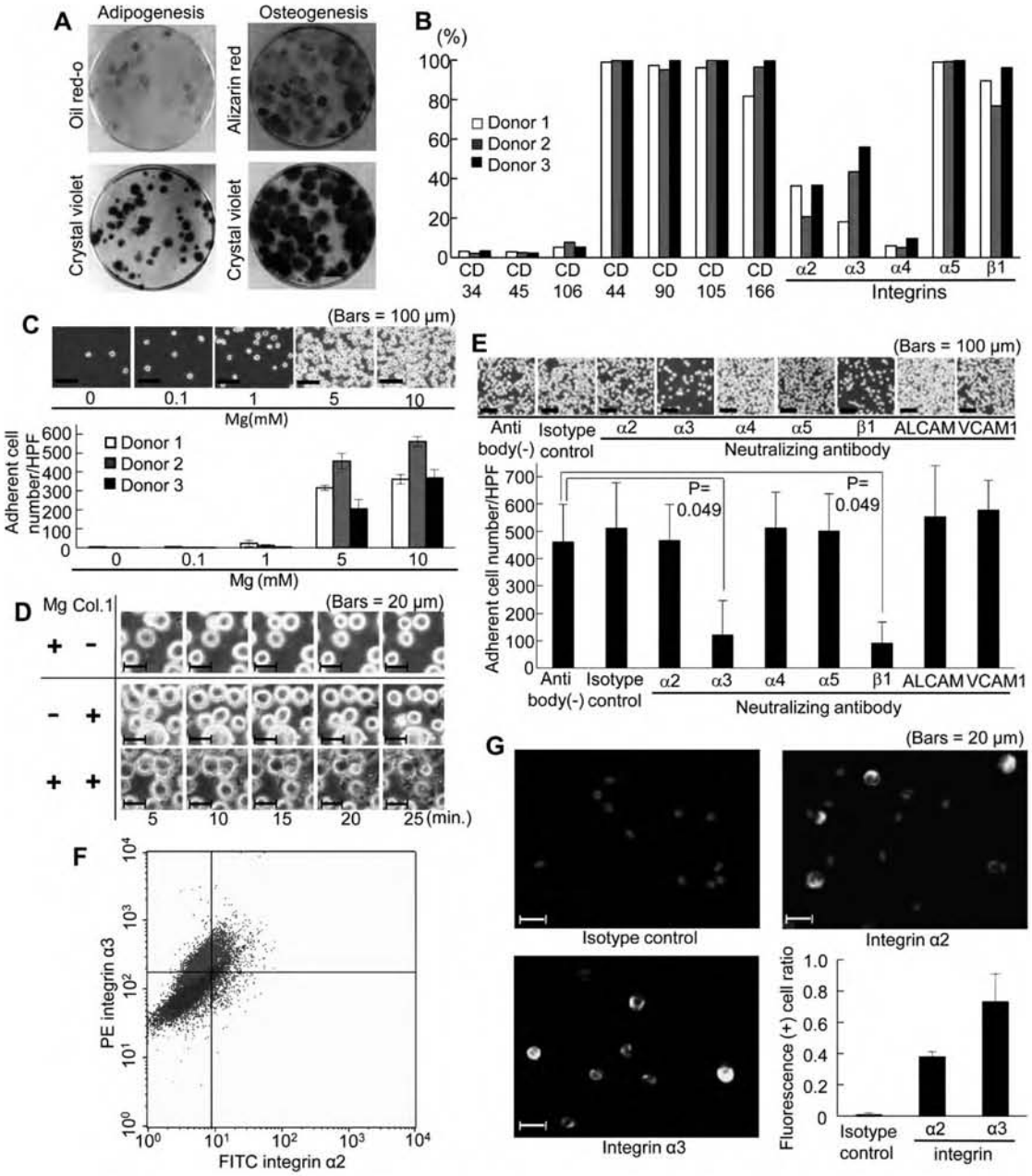


Fig. 1. Properties of human synovial MSCs and magnesium effects on adherence. (A) Macroscopic images of adipogenic and osteogenic differentiation of colony forming cells. (B) Surface epitopes. (C) Microscopic images and quantification of adherent cells on collagen-coated slides at indicated concentrations of magnesium. Values are means with 95% confidence interval (CI) ($n = 3$). (D) Time-lapse analyses of cell morphology during their adhesion on collagen coated slides with or without magnesium. (E) Microscopic images and quantification of adherent cells pretreated with neutralizing antibodies. Values are means with 95% CI ($n = 3$). (F) Two-dimensional plotting for integrin α2 and α3 (red), and for the isotype controls (blue). (G) Immunocytochemical analysis for integrin α2 and α3 of adhering cells on collagen-coated slides in the presence of 10 mM magnesium. The number of positive cells (green) and nuclei (blue) was counted using 3 HPFs, and the integrin positive ratio was calculated. Values are means with 95% CI ($n = 3$).

endoplasmic reticulum (rER), and surrounded by thin, faintly striated collagen fibrils in pellets cultured for 21 days even in 0.8 mM magnesium. Thick collagen bundles consisting of a large number of parallel collagen fibers characteristic for fibrocartilage[22,23] could not be seen [Fig. 2(F, upper panels)]. Immunoelectron microscopic analysis demonstrated expressions of type II collagen, chondroitin sulfate, and the absence of type I collagen in ECM [Fig. 2(F, lower panels)]. These results indicate that pellets of synovial MSCs differentiated into hyaline cartilage.

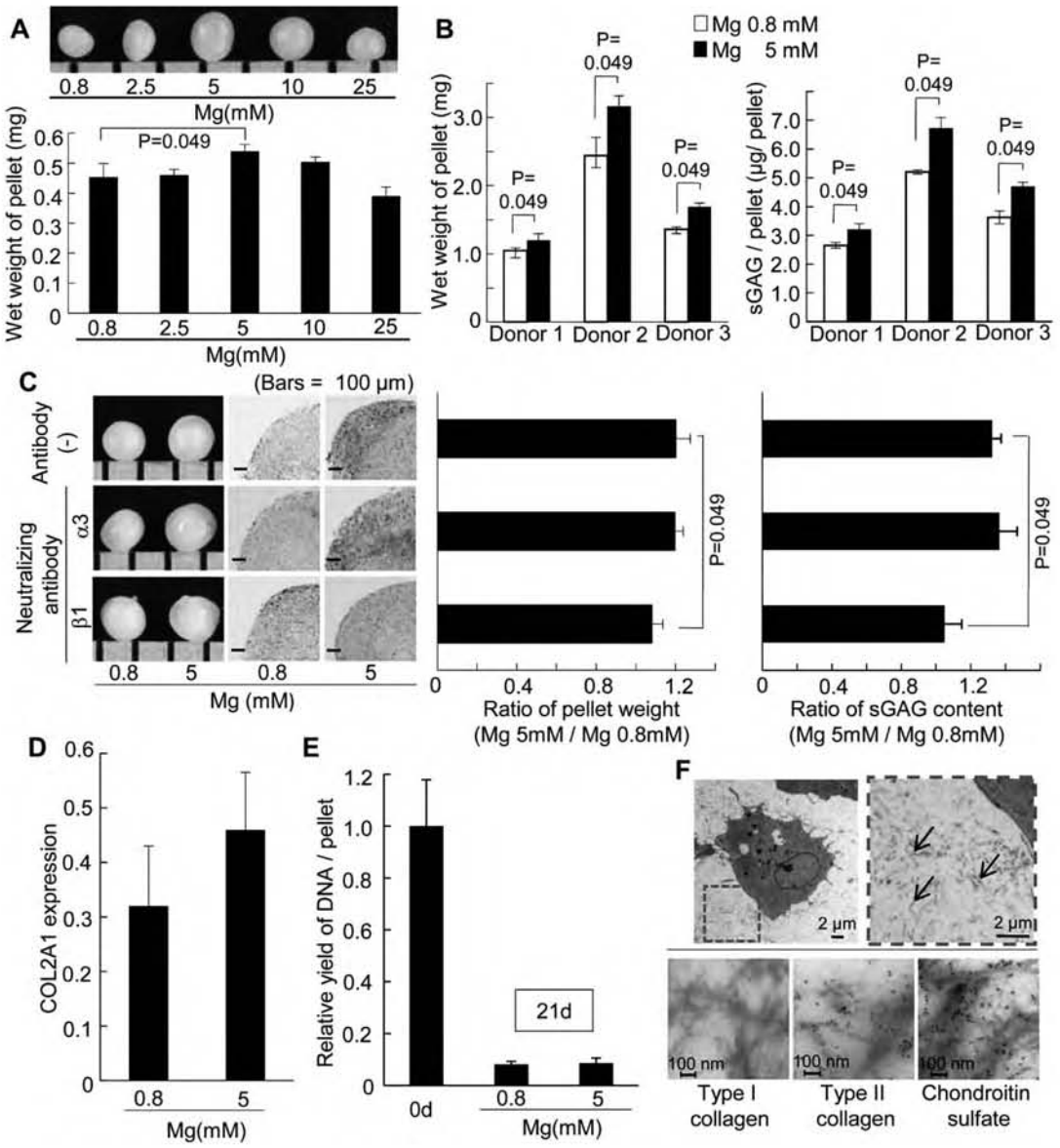


Fig. 2. Magnesium effects on *in vitro* chondrogenesis of human synovial MSCs. (A) Pellet cultured in chondrogenic medium at indicated concentration of magnesium. Macroscopic images at 1 week (upper, scale = 1 mm) and quantification of wet weight of pellets at 1 week (lower). Values are means with 95% CI for three pellets from one donor. (B) Wet weight (left) and sGAG content (right) of pellets cultured for 21 days in 0.8 and 5 mM magnesium. Values are means with 95% CI for three pellets from each donor. (C) Pellets of MSCs pretreated with antibodies. Pretreated pellets were cultured in chondrogenic medium at 0.8 and 5 mM magnesium for 21 days. Macroscopic images with 1 mm scale (left), histologies stained with safranin-o (middle), and relative weight and sGAG content of pellets cultured in 5 mM magnesium to those cultured in 0.8 mM magnesium (right). Values are means with 95% CI ($n = 3$). (D) Real time PCR analysis for gene expression of Col2A1 in pellets cultured for 21 days in 0.8 or 5 mM magnesium. β-Actin was used as an internal control. Values are means with 95% CI ($n = 3$). (E) DNA content of pellets at day 0 and day 21. Values are means with 95% CI ($n = 3$). (F) Transmission electron microscopic image (upper left), the magnified image (upper right) and immunoelectron microscopic images (lower) of pellets cultured for 21 days in chondrogenic medium containing 0.8 mM magnesium. The arrows indicate collagen fibrils (upper right).

Magnesium promotes adherence of human synovial MSCs on osteochondral defects in vitro

Macroscopic and fluorescence observations indicated that DiI labeled MSCs in the defect increased along with magnesium concentration. The intensity of DiI fluorescence of MSCs suspended in 10 mM magnesium was significantly higher than that in PBS without magnesium [Fig. 3(A)]. Histological analyses also indicated an increase of DiI-labeled cells in the defect along with magnesium concentration, and that the number of adherent MSCs in 10 mM magnesium was significantly higher than that in PBS without magnesium [Fig. 3(B)]. The fluorescence intensity of the defects significantly decreased with antibodies for integrin α3 or β1 [Fig. 3(C)].

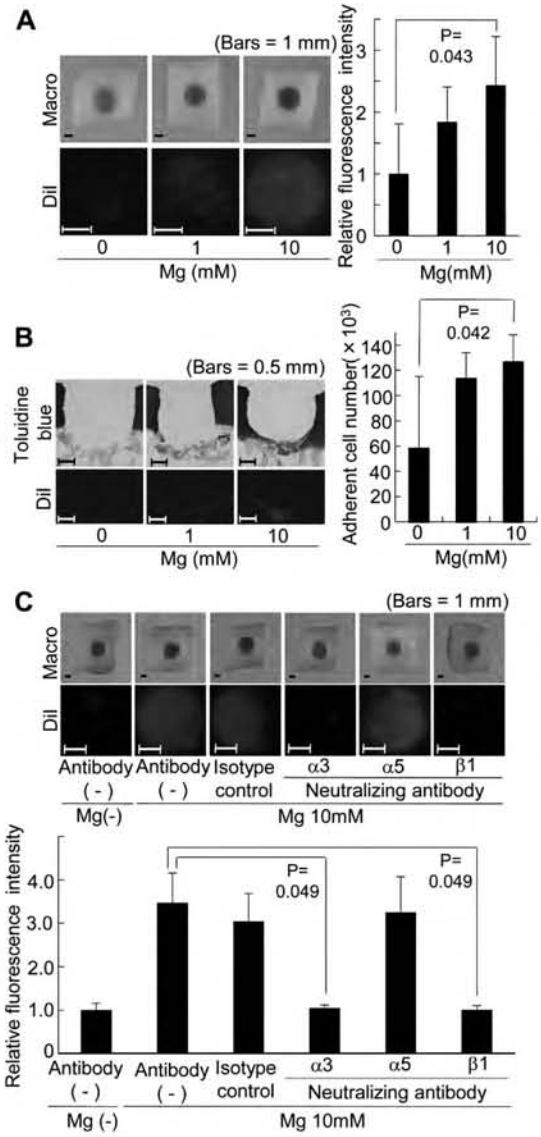


Fig. 3. *Ex vivo* studies for magnesium effects on adherence of human synovial MSCs on osteochondral defects. (A) Top side view of the osteochondral defects without fluorescence (left upper), with fluorescence (left lower), and quantification of the relative fluorescence intensity of DiI labeled MSCs in the defects (right). Values are means with 95% CI. Four pieces of osteochondral fragments were used for each group. (B) Histological analyses and quantification of attached cell number. Toluidine blue staining (left upper), the fluorescence image for DiI (left lower), and quantification of adherent cell number (right). Values are means with 95% CI. Four pieces of osteochondral fragments were used for each group. (C) Effects of the neutralizing antibodies. Top side view of the defects without fluorescence (upper) and with fluorescence (middle). The relative fluorescence intensities of cells in the defects were quantified (lower). Values are means with 95% CI. Three pieces of osteochondral fragments were used for each group.

Magnesium enhances adherence of rabbit synovial MSCs in osteochondral defects in vivo

Osteochondral defects in the rabbit knee joint were filled with DiI-labeled MSCs suspended in PBS with or without 5 mM magnesium, held stationary for 10 min [Fig. 4(A)], and then the joint capsule was closed. Under fluorescence at day 1, the DiI positive area was more distinct [Fig. 4(B, upper panels)], and the fluorescence intensity of defects [Fig. 4(B, lower left)] and the ratio of fluorescence positive area over the defect [Fig 4(B, lower right)] were significantly greater in the defect treated with magnesium. Histologically, a greater number of DiI-positive cells adhered to the defect treated with magnesium. Furthermore, a greater number of cells accumulated on the layer of cells which are attached to the basement of defects in the presence of magnesium [Fig. 4(C)].

Addition of magnesium results in a greater amount of cartilage matrix by MSCs in vivo

At 2 weeks, cartilage matrix stained with safranin-o appeared more distinct in the osteochondral defect treated with synovial MSCs suspended with magnesium than in the defect treated with synovial MSCs suspended without magnesium [Fig. 5(A)]. The safranin-o positive area ratio was significantly higher in the defect treated with magnesium [Fig. 5(B)]. At 4 weeks, the amount of cartilage matrix increased, and the difference of the ratio of the safranin-o positive area to the defect area lessened in both groups. The matrix of regenerated cartilage was positive for type II collagen in both groups [Fig. 5(C)]. Regenerated cartilage consisted of polygonal cells containing well-developed rER, with short processes, and surrounded with thin, faintly striated collagen fibrils [Fig. 5(D)]. These results indicate that the osteochondral defect was regenerated with hyaline cartilage.

Discussion

MSCs are defined as having been derived from mesenchymal tissue and by their functional capacity to self-renew and to generate a number of differentiated progeny[1,10]. Since the earliest studies by Friedenstein *et al.*, the standard assay used to identify the self-renewal ability of MSCs is the colony forming unit fibroblast assay[24]. Although clonal colonies of MSCs are readily prepared, they rapidly become heterogeneous as they expand[9,25,26]. We collected bulk colony-forming cells, and the cells used in the present study showed both colony-forming ability and multipotentiality. Surface markers were also identical to those of MSCs published elsewhere[1,4,7–10]. Therefore, the synovial cells we used were defined as MSCs, though the cells were not clonal. This point should be considered when our study is discussed in the field of "stem cells".

It was reported that magnesium enhanced adhesion of some tumor cells or lineage cell lines to collagen and fibronectin coated slides. Grzesiak *et al.* demonstrated that human fibroblast WI38 bound to type I collagen under regulation by shift in the concentrations of extracellular divalent cations. In their report, cells adhered to collagen more effectively along with the concentration of magnesium through integrins[20]. However, there have been no reports demonstrating that magnesium enhanced adhesion of MSCs to collagen coated slides or osteochondral defects. Furthermore, improvement of the efficiency of attachment of stem cells is currently one of the topics for stem cell biology and regenerative medicine. An increase in adherence of cells leads to the improvement of "efficiency of transplantation," a factor of increasing interest in cell based regenerative medicine[27]. We believe that this paper contributes greatly to the field of cell therapy for regenerative medicine.

Although Pittenger *et al.* reported that bone marrow MSCs expressed integrins α1, α2, α3, and β1, integrins expressed in human synovial MSCs have not been reported[1]. In this study, surface epitope analyses revealed that synovial MSCs expressed integrin α5 and β1 highly, and α2 and α3 moderately.

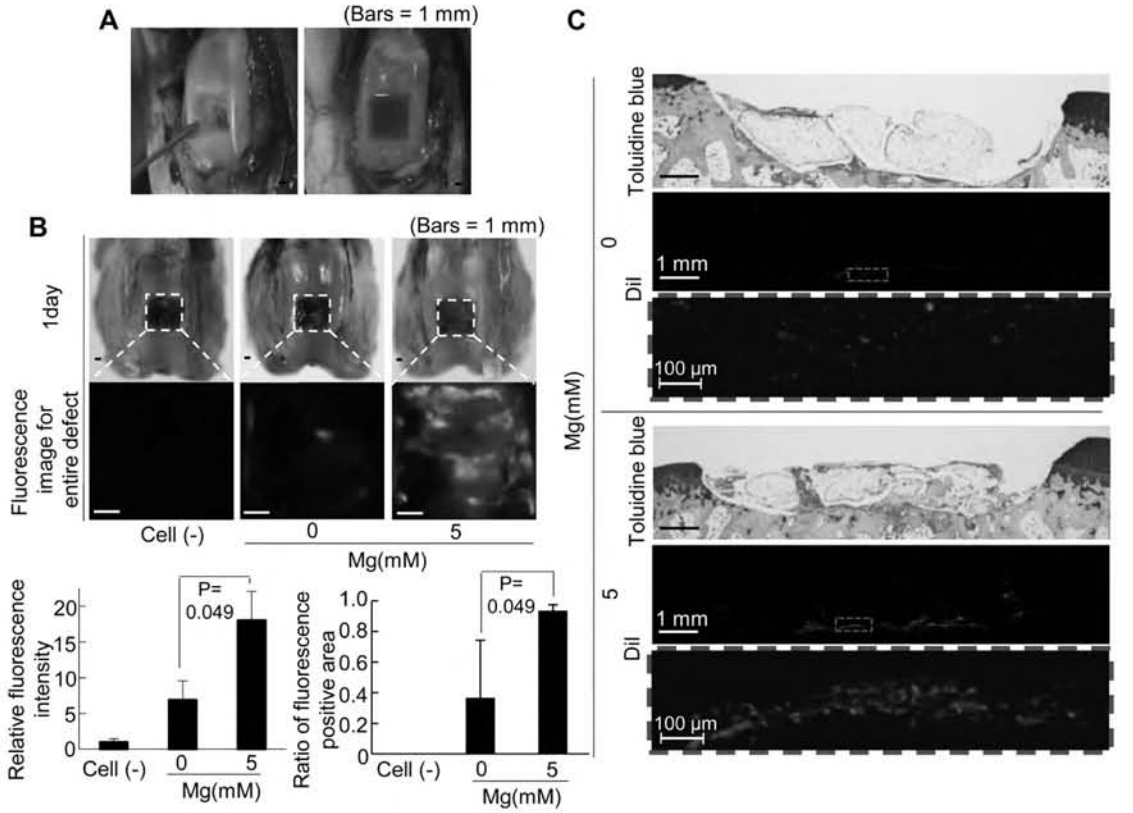


Fig. 4. *In vivo* analyses for magnesium effects on adherence of rabbit synovial MSCs on osteochondral defects. (A) Procedure for cell transplantation. Osteochondral defect was created, and needle was prepared over the defect (left). Cell suspension was dripped onto the defect, and this position was kept for 10 min (right). (B) Macroscopic and macroscopic fluorescence images of the defect for DiI labeled MSCs (upper six panels), quantification of relative fluorescence intensity over the defect at 1 day (lower left) and the ratio of fluorescence positive area over the defect at 1 day (lower right). The ratio was evaluated by measuring the square measure of the entire defect and the fluorescence positive area within the defect. Values are means with 95% CI ($n = 3$). (C) Sagittal sections of histologies stained with toluidine blue (upper), for DiI (middle) and the magnified image (lower).

Previous reports indicated that integrin α3β1 was a promiscuous cell adherent receptor. Wayner *et al.* first identified Integrin α3β1 as a receptor for type I, and IV collagen, laminin, and fibronectin[28]. Berdichevsky *et al.* reported that antibody for integrin α3 inhibited adhesion to polymerized collagen in mammary epithelial cells[29]. Carter *et al.* reported that human keratinocytes cultured on fibronectin, collagen, or laminin were detached from cover slips in the presence of anti integrin α3 antibody[30]. Though integrin α2β1 is also considered as one of the collagen receptors[14,15], our results demonstrated that neutralizing antibodies for α3 and β1 inhibited adhesion of synovial MSCs on collagen-coated slides. This indicates that integrin α3β1 functions as an adherence factor of synovial MSCs to type I collagen-coated slides under a higher concentration of magnesium.

In this study, we evaluated *in vitro* chondrogenesis potential as pellet weight. We intensively investigated pellet culture of MSCs. During *in vitro* chondrogenesis of MSCs, the pellets increased in size and weight. Conversely, the DNA yield per pellet decreased. The radioactivity per DNA in the cells, assessed by prelabeling with 3H-thymidine, was stable during *in vitro* chondrogenesis of MSCs. The increase in pellet size can be attributed to production of ECM and not to the proliferation of the cells[5,31]. Pellet weight is always correlated with expressions of cartilage related mRNAs such as COL2A1, aggrecan, link protein, SOX5, SOX6, and SOX9. Pellet weight is also correlated with proteoglycan staining by safranin-o, type II collagen by immunostaining, protein expressions of chondroitin 4-sulfate, chondrotitin 6-sulfate, and hyaluronan by ELISA as we previously reported[4–9,25,32]. All the results demonstrate that the weights of the pellets are quantitative indicators for chondrogenesis of MSCs.

While magnesium did not affect the DNA content of pellets, magnesium increased the wet weight, sGAG content, and gene expression for type II collagen of pellets. The effect was significantly diminished after pretreatment with neutralizing antibody for integrin β1 without re-adding antibodies. We investigated sequential gene expression profiles of MSCs during *in vitro* chondrogenesis within 24 h, and a large number of gene expressions were dramatically altered within a few hours (data not shown). Also, our morphological analysis demonstrated that the ultrastructure was altered most dramatically within 1 day[21]. We speculated the effect of neutralizing antibody for integrin β1 as follows: The neutralizing antibody for β1 integrin affected *in vitro* chondrogenesis at an early period, and this influence remained at a later stage, resulting in a difference of synthesis of cartilage matrix. We examined the magnesium effect on adherence of rabbit synovial MSCs on osteochondral defects *in vivo*. DiI-labeled MSCs suspended in PBS with or without 5 mM magnesium were placed on the defects for 10 min, and then the rabbit was allowed to move freely after operation. The distributions of DiI positive MSCs in the defects at 1 day were less homogenous compared with the results of *ex vivo*

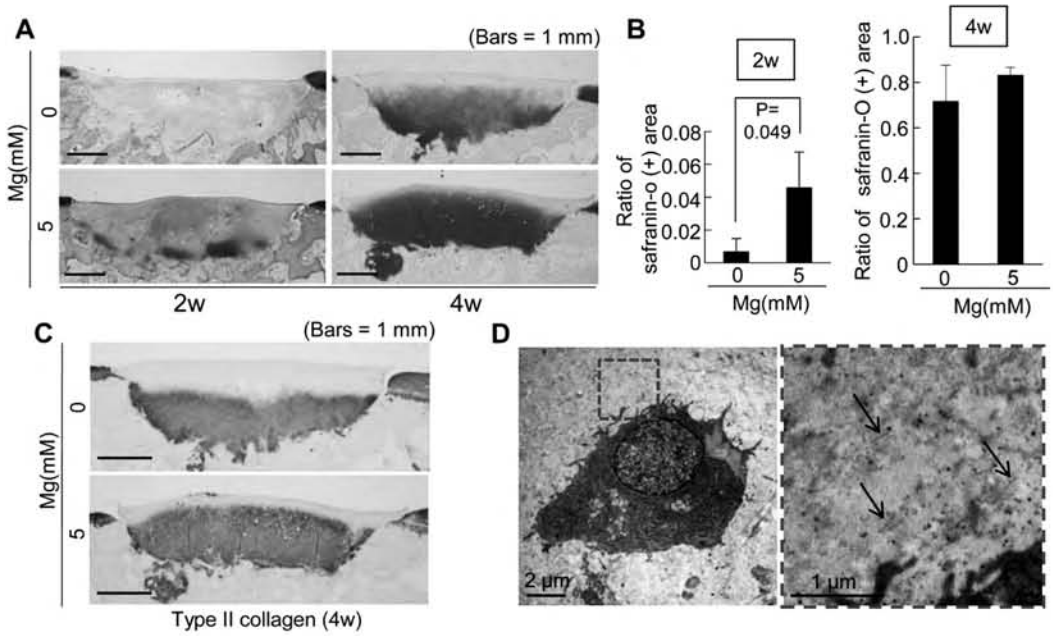


Fig. 5. *In vivo* analyses for magnesium effects on cartilage regeneration with rabbit synovial MSCs. (A) Sagittal section of defects stained with safranin-o at 2 and 4 weeks. (B) Ratio of safranin-o positive area to the total defect area at 2 and 4 weeks. Values are means with 95% CI ($n = 3$). (C) Immunohistochemistry for type II collagen at 4 weeks. (D) Transmission electron microscopic image of cell in regenerated cartilage of rabbit treated with synovial MSCs suspended in PBS at 4 weeks (left) and the magnified image (right). The arrows indicate collagen fibrils.

analysis. Intra-articular circumstance caused a discomfort condition for MSCs to continue in their attachment to osteochondral defects due to gravity force, bleeding, inflammatory reactions, and mechanical stresses accompanied with joint motions.

During *in vivo* situation, magnesium increased adherence of MSCs to the basement of the defect. Histologically, a greater number of cells accumulated on the layer of cells which were attached to the basement of the defects in the presence of magnesium. There are two possibilities to account for the result. Magnesium also may enhance accumulation of MSCs on the layer of the cells. Otherwise, a greater number of single-layered cells on the basement of defect may enhance accumulation of MSCs dependent on or independent of magnesium.

In vivo studies showed that cartilage matrix was regenerated earlier in the defects treated in the presence of 5 mM magnesium at 2 weeks. The number of cells involved in regeneration of cartilage is an important factor[33]. The difference of initial cell number attached to the defect or initial magnesium concentration may have been an

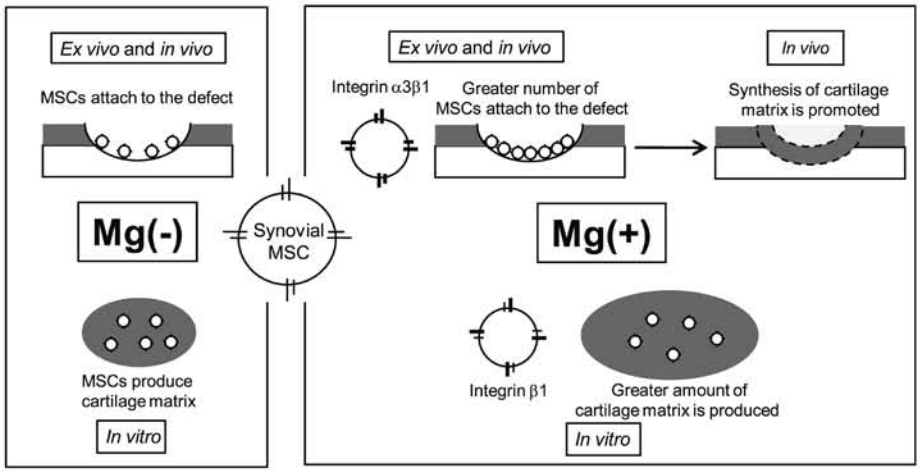


Fig. 6. Scheme of MSC based cartilage regeneration with magnesium. Magnesium increases MSC attachment and cartilage matrix formation through integrins at initial stage without toxicity.

influencing factor even after 2 weeks. As a whole, the presence of magnesium in cell suspension promoted cell adhesion to osteochondral defects and exerted no toxic effect on *in vivo* cartilage formation.

Standard media for cell culture, which also promote cell attachment, are not usually approved for clinical use. The most popular standard solution for clinical use is a lactate Ringer's solution, which does not contain magnesium. To demonstrate the effect of magnesium experimentally, we selected PBS (−), which is a more simplified standard solution close to a lactate Ringer's solution. PBS (+) contains 0.8 mM magnesium, and we showed that 5 mM magnesium had stronger effects for attachment and cartilage formation of synovial MSCs than PBS (+) containing 0.8 mM magnesium. Even if we had used PBS (+) as a control, the results would not have been significantly affected.

In summary, magnesium enhanced attachment of synovial MSCs to osteochondral defect through integrin $\alpha 3\beta 1$. A greater number of MSCs were attached to the defect and promoted synthesis of cartilage matrix at an early phase. Furthermore, magnesium increased cartilage matrix synthesis through integrin $\beta 1$ during *in vitro* chondrogenesis of synovial MSCs (Fig. 6).

Contributions

Masayuki Shimaya: conception and design, analysis and interpretation of the data, collection and assembly of data, drafting of the article; Takeshi Muneta: obtaining of funding, provision of study materials and patients; Kunikazu Tsuji: critical revision of the article for important intellectual content; Shizuko Ichinose: electron microscopy; Ichiro Sekiya: conception and design, critical revision of the article for important intellectual content, final approval of the article, obtaining of funding.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was supported by grants from the Japanese Ministry of Education Global Center of Excellence (GCOE) Program, the International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases and from the Japan Society for the Promotion of Science (21591914) to TM and by the Japan Society for the Promotion of Science (21591914) to IS Recombinant human bone morphogenetic protein-7 was kindly provided by Stryker Biotech.

References

1. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284(5411):143–7.
2. Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997;276(5309):71–4.
3. Sekiya I, Larson B, Smith J, Pochampally R, Cui J, Prockop D. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 2002;20(6):530–41.
4. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005;52(8):2521–9.
5. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. *In vitro* chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. J Cell Biochem 2006;97(1):84–97.
6. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. Cell Tissue Res 2007;327(3):449–62.
7. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, *et al.* Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. Arthritis Rheum 2008;58(2):501–10.
8. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, *et al.* Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. Arthritis Rheum 2006;54(3):843–53.
9. Nagase T, Muneta T, Ju YJ, Hara K, Morito T, Koga H, *et al.* Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. Arthritis Rheum 2008;58(5):1389–98.
10. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profile. J Orthop Res 2009;27(4):435–41.
11. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994;331(14):889–95.
12. Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 1994;76(4):579–92.
13. Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, *et al.* Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. Arthritis Res Ther 2008;10(4):R84.
14. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. J Cell Mol Med 2007;11(1):21–38.
15. Hynes R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 2002;110(6):673–87.
16. Martino M, Mochizuki M, Rothenfluh D, Rempel S, Hubbell J, Barker T. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. Biomaterials 2009;30(6):1089–97.
17. Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of integrin function by Ca2+. Biochim Biophys Acta 2000;1498(2–3):91–8.
18. Banères JL, Roquet F, Martin A, Parello J. A minimized human integrin alpha 5 beta 1 that retains ligand recognition. J Biol Chem 2000;275(8):5888–903.
19. Kirchhofer D, Grzesiak J, Pierschbacher MD. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. J Biol Chem 1991;266(7):4471–7.
20. Grzesiak J, Davis G, Kirchhofer D, Pierschbacher M. Regulation of alpha 2 beta 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg2+ and Ca2+. J Cell Biol 1992;117(5):1109–17.
21. Ichinose S, Tagami M, Muneta T, Sekiya I. Morphological examination during *in vitro* cartilage formation by human mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res 2005;322(2):217–26.

22. Moran DT, Rowley JC. Visual Histology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1988.
23. Cross PC, Mercer KL. Cell and Tissue Ultrastructure: a Functional Perspective. New York: W.H. Freeman and Company; 1993.
24. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. Int Rev Cytol 1976;47:327–59.
25. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. Biochem Biophys Res Commun 2001;284(2):411–8.
26. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Ichinose S, Shinomiya K, Muneta T. Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. Blood 2004;104(9):2728–35.
27. Song SW, Chang W, Song BW, Song H, Lim S, Kim HJ, *et al.* Integrin-linked kinase is required in hypoxic mesenchymal stem cells for strengthening cell adhesion to ischemic myocardium. Stem Cells 2009;27(6):1358–65.
28. Wayner E, Carter W. Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. J Cell Biol 1987;105(4):1873–84.
29. Berdichevsky F, Alford D, D'Souza B, Taylor-Papadimitriou J. Branching morphogenesis of human mammary epithelial cells in collagen gels. J Cell Sci 1994;107(12):3557–68.
30. Carter W, Wayner E, Bouchard T, Kaur P. The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell–cell and cell–substrate adhesion of human epidermal cells. J Cell Biol 1990;110 (4):1387–404.
31. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99 (7):4397–402.
32. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on *in vitro* cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. Cell Tissue Res 2005;320(2):269–76.
33. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju Y, Mochizuki T, *et al.* Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for *in vivo* chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. Cell Tissue Res 2008;333 (2):207–15.

有機材料分野

秋吉 一成

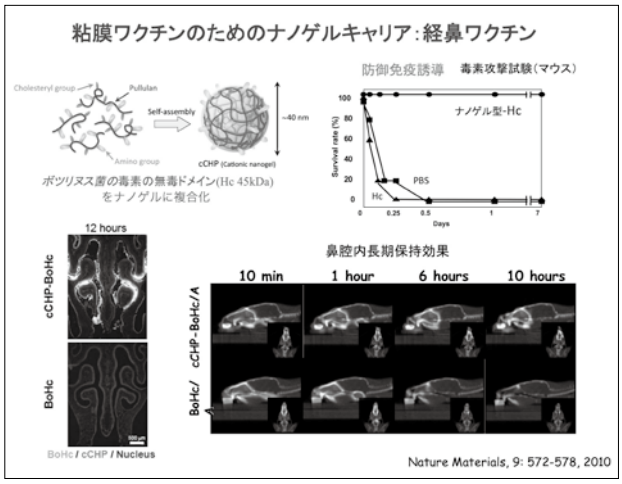
生体材料工学研究所・素材研究部門
有機材料学・教授

1）研究の題目

ナノゲル工学による新規ナノバイオマテリアル創製と医療応用

Development of novel nanobiomaterials by Nanogel engineering and medical applications

2)



3）研究内容についての英文要約

We develop tailor-made functional nanogels to create novel nanobiomaterials（nanogel engineering）by the self-assembly of functional associating polymers as building blocks. Macrogels with well-defined nanostructures can be obtained by self-assembly using these nanogels as building blocks. Raspberry-like assembly of nanogels（A-CHPNG）with a high potential as a carrier for protein delivery was prepared.

Cationic CHP nanogels were used as a universal protein-based antigen-delivery vehicle for adjuvant-free intranasal vaccination.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

昨年に引き続き、医歯工連携の共同研究を積極的に推進した。

B（研究教育環境）

講義内容を充実させ、質問も随時受け付ける窓口を開いた

C（人材確保）

当研究室の学生1人がスーパースチューデントとして採用された。

D（人材育成）

スーパースチューデントは積極的に本プログラムに参加し、研究面でも大いにプラスとなった。

E（国際化）

外国人特別講師とSSとの討論する機会を年2回以上もった。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

SS学生も積極的に医歯工連携の共同研究に参画させることで、研究の広がりと幅広い知識を身につけることに力を入れた。

6）英文原著論文

1. ◎S. Toita, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Functional cycloamylose-based biomaterial: application in a gene delivery system, Biomacromolecules, 11, 397- 401（2010.
2. S. Sawada and K. Akiyoshi, Nano-encapsulation of lipase by self-assembled nanogels: induction of high enzyme activity and thermal stabilization, Macromol. Biosci.,10, 353-358（2010）.
3. T. Hirakura, K. Yasugi, T. Nemoto, M. Sato, T. Shimoboji, Y. Aso, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Hybrid hyaluronan

hydrogel encapsulated nanogel as a protein nanocarrier: new system for sustained delivery of protein with a chaperone-like function, J. Controlled Release, 142, 483-489（2010）.
4. Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Development of an Artificial Chaperone System Based on Cyclodextrin, Current Pharmaceutical Biotechnology, 11, 300-305（2010）.
5. ◎T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono, Nanogel antigenic protein delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines, Nature Materials, 9, 572-578（2010.
6. ◎Y. Moritani, S. Nomura, I. Morita, K. Akiyoshi, Direct integration of cell-free synthesized connexin-43 into liposomes utilizing chaperone-like function of liposomes, FEBS J., 277, 3343-3352（2010）.
7. ◎H. Sasaki, Y. Nomura, S. Sawada, K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel-cyclodextrin system as artificial chaperone for in vitro protein synthesis of green fluorescent protein, Polymer Journal, 42, 823（2010）.
8. ◎K. Kamiya, K. Tsumoto, S. Arakawa, S. Shimizu, I. Morita, T. Yoshimura, K. Akiyoshi, Preparation of connexin43-integrated giant liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method, Biotechnology & Bioengineering, 107, 836-843（2010）.
9. ◎N. Alles, N. S. Soysa, J. Hayashi, M. Khan, A. Shimoda, H. Shimokawa, O. Ritzeler, K. Akiyoshi, K. Aoki, K. Ohya, Suppression of NF-kappaB increases bone formation and ameliorates osteopenia in ovariectomized mice. Endocrinology, 151, 4626-4634（2010）.
10. K. Kondo, N. Kaji, S. Toita, Y. Okamoto, M. Tokeshi, K. Akiyoshi, Y. Baba, DNA separation by cholesterol-bearing pullulan nanogels. Biomicrofluidics, 4, 32210-33218（2010）.
11. ◎Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Nanogel engineering for new nanobiomaterials: From chaperoning engineering to biomedical applications, The Chemical Record, 10, 366-376（2010）
12. ◎H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi, Amphiphilic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperone, ACS Nano. 5, no.1, 337-345（2011）.
13. Y. Sasaki, T. Hirakura, S. Sawada, K Akiyoshi, Metal coordinative-crosslinked polysaccharide nanogels with redox sensitivity, Chem. Lett.,40, 182-183（ 2011）
14. S. Toita, S. Sawada, K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel gene delivery system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A2, J. Controlled Release, in press
15. Y. Sasaki, Amphiphilic Polysaccharide Nanogels as an Artificial Chaperone in Cell-Free Protein Synthesis, Macromol Bioscience, in press

7）著書

1. 澤田晋一,秋吉一成,ナノゲル工学による新規DDSの設計,薬剤学,70（1）, 39-44（2010）.
2. 戸井田さやか,秋吉一成.ナノゲル工学によるDDSキャリアの開発と応用,食品・化粧品・医療分野へのゲルの利用.西成勝好監修,シーエムシー出版,186-192（2010）.
3. 高橋治子,秋吉一成,人工シャペロンシステム,酵素利用技術大系 －基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで－, 小宮山眞監修, NTS, 213-219（2010）.
4. 秋吉一成, 先端医療に活きるコロイド界面化学と技術,リポソーム,現代界面コロイド科学の事典,日本化学会編,113-115（2010）.
5. 安岡潤一,秋吉一成,ワクチン抗原デリバリーシステム, がん免疫療法-実用化へのチャレンジ-.珠玖洋監修,シーエムシー出版,74-82（2010）.
6. 佐々木善浩,秋吉一成,ナノゲルを基盤とするナノバイオエンジニアリング,人工臓器,39（3）, 197-201（2010）

8）平成22年度までの自己評価

我々の開発したDDSを利用した拠点内での協同研究を一層促進させるように努力した。

現在、野田教授、森田教授、春日井教授、大谷教授、小川教授との共同研究を進めている。それぞれの共同研究も順調に成果が得られており、本年度は、森田教授との論文、2報、大谷教授、1報の計3報が欧文誌に受理された。

9）学会発表（英文）

1） Takahashi H, Sawada S, Akiyoshi K. Glycogen nano-ball for polysaccharide nanogel engineering. 240th American Chemical Society National Meeting & Exposition（Fall 2010 National Meeting & Exposition）, Boston, USA, August, 2010.
2） Sekine Y, Moritani Y, Morimoto N, Akiyoshi K, Design of Hydrid Hydrogels with Nanogel and Liposomes as cross-linking domains. 240th American Chemical Society National Meeting & Exposition（Fall 2010 National Meeting & Exposition）, Boston, USA, August, 2010.
3） Kamiya K, Tsumoto K, Yoshimura T, Akiyoshi K. Preparation of connexin liposomes using baculovirus expression-liposome fusion systems. International liposome research days and Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver BC, Canada , August, 2010.
4） Toita S, Nakajima A, Akiyoshi K. Cycloamylose-

based Biomaterial: Nanogel of Cholesterol-bearing Cationic Cycloamylose for Drug Delivery System. 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan, 1-6 August, 2010.

5) Takahashi H, Sawada S, Akiyoshi K. Amphiphilic glycogen nano-ball. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

6) Shimoda A, Sawada S, Akiyoshi K. RGD-modified polysaccharide nanogels for targeted delivery. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

7) Toita S, Akiyoshi K, Functional Cycloamylose for Gene Delivery System. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

8) Tsuchido Y, Sasaki Y, Akiyoshi K. Nanogel formation of vitamin B6-bearing pullulan cross-linked with water soluble proteins. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

9) Moritani Y, Morita I, Akiyoshi K, Direct integration and oligomerization of cell-free synthesized native membrane proteins into liposomes. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

10) Yasuoka J, Toita S, Sawada S, Akiyoshi K. CpG DNA delivery by cationic amphiphilic polysaccharide nanogels. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

11) Sasaki Y, Abe K, Akiyoshi K. Development of 3D array formed with DNA-tagged liposomes for biochip applications. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December, 2010.

10) 学会発表（和文）

（一般）

1) 関根由莉奈,森谷優貴,深澤倫子,市川正敏,吉村研一,秋吉一成.ナノゲル－リポソーム複合体を架橋点とした新規ハイブリッドゲルの設計.第21回高分子ゲル研究討論会,東京,2010年1月.

2) 佐々木 善浩,阿部 慶太,秋吉 一成.バイオチップ作製へ向けた三次元リポソームアレイの構築.第4回バイオ・ナノテクシンポジウム,東京,2010年3月.

3) 土戸優志,佐々木善浩,秋吉一成.ビタミンB6-多糖コンジュゲートのナノゲル形成と機能評価.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.

4) 神谷厚輝,湊元幹太,吉村哲郎,秋吉一成.バキュロウイルス融合法による細胞間接着膜タンパク質組込みリポソームの構築.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.

5) 阿部慶太,佐々木善浩,秋吉一成.DNAの分子認識による三次元リポソームアレイの構築.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.

6) 佐々木善浩,黒須啓,山根説子,秋吉一成.有機－無機ハイブリッドナノゲルの創製と機能.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.

7) 高橋治子,澤田晋一,秋吉一成.グリコーゲン多糖ナノボールによる機能性材料の開発と機能評価.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

8) 下田麻子,秋吉一成.機能性ナノゲル架橋ナノ微粒子の設計.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

9) Sekine Y, Ikeda-Fukazawa T, Ichikawa M, Yoshikawa K, Akiyoshi K. Microrheology of Nanogel-structured Gel.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

10) 戸井田さやか,秋吉一成.機能化サイクロアミロースによる核酸デリバリー.第59回高分子学会年次会,横浜,2010年5月.

11) 中島彩,戸井田さやか,森本展行,秋吉一成.機能性サイクロアミロースを用いた細胞内への抗体デリバリー.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

12) 土戸優志,佐々木善浩,秋吉一成.ビタミンB6置換プルランのナノゲル形成と機能.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

13) 平野さやか,森本展行,清水繁,Thompson D H,秋吉一成.pH応答性ナノゲルの設計と評価.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

14) 神谷厚輝,湊元幹太,吉村哲郎,秋吉一成.バキュロウイルス融合法によるカドヘリンリポソームの構築.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

15) 阿部慶太,佐々木善浩,秋吉一成.DNAの相補的塩基対形成に基づく三次元リポソームアレイの構築.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

16) 佐々木善浩,黒☒啓,山根説子,秋吉一成.多糖－無機ナノハイブリッドの創製と機能.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

17) 澤田晋一,林 純吾,清水繁,秋吉一成.多価イオン性基置換多糖によるイオンコンフレックスナノケル.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

18) 飯田大介,高橋治子,清水繁,秋吉一成.蛍光相関分光法によるナノケルとタンハク質の相互作用解析.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.

19) 黒須啓,山根説子,佐々木善浩,清水繁,秋吉一成.多糖ナノゲルをテンプレートに用いるリン酸カルシウム複合材料.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.
20) 神谷厚輝,湊元幹太,吉村哲郎,秋吉一成.バキュロウイルス－リポソーム融合法によるコネキシンリポソームの構築とその応用.ナノ学会第8回大会,岡崎,2010年5月.
21) 下田麻子,澤田晋一, 秋吉一成.細胞親和性RGD修飾ナノゲルの設計と応用.第26回DDS学会学術集会,大阪,2010年6月.
22) 中島彩,戸井田さやか,森本展行,秋吉一成.機能性サイクロアミロースを用いた細胞内抗体デリバリーキャリアの開発.第26回DDS学会学術集会,大阪,2010年6月.
23) 戸井田さやか,秋吉一成.機能化サイクロアミロースによる遺伝子デリバリー.遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム,札幌,2010年6月.
24) 安岡潤一,戸井田さやか,澤田晋一,秋吉一成.機能性ナノゲルを用いたCpG DNAデリバリーシステムの構築.遺伝子・デリバリー研究会第10回シンポジウム,札幌,2010年6月.
25) 関根由莉奈,森谷優貴,秋吉一成.ナノゲル―ボトムアップ法による機能性ゲルの設計. 第20回 バイオ・高分子シンポジウム,東京,2010年 7月.
26) 土戸優志,佐々木善浩,秋吉一成.ビタミンB6多糖コンジュゲートナノゲルの作製と機能評価. 第20回バイオ・高分子シンポジウム,東京,2010年7月.
27) 安岡潤一,戸井田さやか,澤田晋一,秋吉一成.ナノゲルを用いた核酸デリバリーシステムの開発.第20回バイオ・高分子シンポジウム, 東京, 2010年7月.
28) 高橋治子,松田修,秋吉一成.多糖ナノゲル基盤DDSの開発とがん治療への応用.第59回がん若手研究者ワークショップ2010,蓼科,2010年9月.
29) 高橋治子,澤田晋一,秋吉一成.グリコーゲン多糖ナノボールの高機能化.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
30) 下田麻子,秋吉一成.多糖ナノゲル基盤DDS 材料の設計と医療応用.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
31) 関根由莉奈,森谷優貴,秋吉一成.ナノゲル―リポソーム複合体PEGゲルの設計.第59回高分子討論会,札幌,2010年 9月.
32) 戸井田さやか,秋吉一成.機能化サイクロアミロースによる核酸デリバリーシステム.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
33) 中島彩,戸井田さやか,森本展行,秋吉一成.シャペロン機能を有するナノゲルによる細胞内タンパク質デリバリー.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
34) 土戸優志,佐々木善浩,秋吉一成.タンパク質を架橋点とする動的ナノゲルの作製. 第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
35) 平野さやか,森本展行,清水繁,Thompson D H,秋吉一成.酸分解性ナノゲルの設計と機能.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
36) 神谷厚輝,湊元幹太,吉村哲郎,秋吉一成.バキュロウイルス－リポソーム融合法によるカドヘリンリポソームの作製と機能.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
37) 安岡潤一,森谷優貴,秋吉一成. 無細胞タンパク質発現系によるコネキシンリポソームの構築. 第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
38) 阿部慶太,佐々木善浩,秋吉一成.ヒドロゲル中での人工細胞膜ネットワークの構築と機能.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
39) 澤田晋一,秋吉一成.ナノケル工学による人工分子シャペロンシステムの設計と応用.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
40) 飯田大介,澤田晋一,清水繁,秋吉一成.イオンコンプレックス多糖ナノケルの設計と機能.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
41) 黒須啓,山根説子,佐々木善浩,秋吉一成.多糖によるリン酸カルシウム複合材料のナノ構造制御.第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
42) 神谷厚輝,湊元幹太,吉村哲郎,秋吉一成.バキュロウイルス－リポソーム融合法によるカドヘリン組込みリポソームの構築と機能.第48回日本生物物理学会年会,仙台,2010年9月.
43) 森谷優貴,森田育男,秋吉一成.無細胞合成した膜タンパク質に対するリポソームのシャペロン機能.第48回日本生物物理学会年会,仙台,2010年9月.
44) 高橋治子,澤田晋一,秋吉一成.両親媒性多糖ナノボールのシャペロン機能とタンパク質デリバリー.第32回日本バイオマテリアル学会大会,広島,2010年11月.

11) 受賞

1) 戸井田さやか,第59回高分子討論会,准奨励賞,2010年6月.

12）外部資金の獲得状況

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 計画班代表
（感染・炎症が加速する発がんスパイラルとその遮断に向けた制がんベクトル変換）
研究題目:ナノDDSを用いた制がんベクトル変換技術の開発
代表: 秋吉　一成
期間:平成22～26年度
研究費総額:106,000千円

文部科学省科学研究費補助金 基盤研究（A）
研究題目: ナノゲルを基盤とした新規ドラッグデリバリーシステムの開発
代表: 秋吉　一成
期間: 平成20～24年度
研究費総額: 3,910万円

13）特別講演、招待講演

1）秋吉一成.ナノゲルによるタンパク質デリバリー.第12回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ.「新技術から見たタンパク質性医薬品の現状と展望」,東京,2010年1月.
2）秋吉一成.ナノゲル工学による新規バイオマテリアル創製.高分子学会九州支部フォーラム,沖縄,2010年3月.
3）秋吉一成.ナノゲル微粒子の作成とバイオ・医療応用.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.
4）秋吉一成.タンパク質・ペプチドデリバリーと細胞機能制御.日本化学会第90春季年会,大阪,2010年3月.
5）秋吉一成.新規バイオ材料設計のためのシャペロン機能工学.第59回高分子学会年次大会,横浜,2010年5月.
6）秋吉一成.ナノゲル工学による新規タンパク質DDSの開発.第2回次世代シグナル伝達医学　グローバルCOE 研究討論会,淡路,2010年7月.
7）秋吉一成.ナノゲル工学によるバイオマテリアル創製.第42回茨城地区活動講演会　（高分子学会関東支部）,つくば,2010年7月.
8）佐々木善浩,阿部慶太,秋吉一成.バイオ応用のための三次元リポソームアレイの構築. 第59回高分子討論会,札幌,2010年9月.
9）秋吉一成.ナノゲル工学による新規タンパク質DDSの開発.第27回医用高分子研究会講座『未来医療を拓く医用高分子』,東京,2010年11月18日.
10）秋吉一成.先端医療を支えるドラッグデリバリーシステム.KONAN FIBER 社会人向け連続講座　NANO BIO COLLEGE 2010,東京,2010年11月27日.
11）秋吉一成.ナノゲル工学のバイオマテリアルへの応用.第19回ポリマー材料フォーラム,名古屋,2010年12月2日～3日.
12）Akiyoshi K. Polysaccaride nanogel engineering for biomedical applications. ARMT2010, Jeji, Korea, January, 2010
13）Akyoshi K. Nanogel Engineering for Protein Drug Delivery System. 6th Sweden-Japan Workshop on BioNano Technology, Shizuoka, Japan, May, 2010. Akiyoshi K. Polysaccharide nanogel engineering for protein delivery. The 5th GCOE International Symposium, "Frontier in Biomaterials Science and Technology for Regenerative Medicine and Gene/Drug Delivery ' Tokyo, Japan, 10-11 September, 2010.
14）Akiyoshi K. Nanogel engeneering for new nanobiomaterials: chaperon-like function and biomedical applications. Eighth iCeMS International Symposium " Meso-Control of Functional Architectures' Kyoto, Japan, 9 November, 2010
15）Akiyoshi K. Organic-inorganic hybrid polysaccharide nanogels for biomedical application. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December 15-20, 2010.
16）Akiyoshi K. Polysaccharide nanogel bottom-up systems for biomedical application. 2010 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, USA, December 15-20, 2010.

14）新聞、雑誌、TV報道

1. 2010年 7月13日　朝日新聞
ワクチン効果高い新カプセル
2. 2010年 9月号（7月26日発売） Newton ニュートン
注射を使わない新ワクチンへ前進

15）GCOE総合講義

本稿では、多糖ナノゲルをタンパク質DDSキャリアとして用いる研究について、分子シャペロン機能を有するナノゲルキャリアの開発、ナノゲルによる効率的な細

胞内導入から、免疫療法としての臨床応用にいたる研究成果を紹介した。多糖ナノゲルを用いた癌免疫ワクチンの臨床結果、特に食道癌の治療効果、また、経鼻ワクチンに対するカチオン性多糖ナノゲルを用いたナノキャリアの効果について最近の結果を紹介した。また、ナノゲルをビルディングブロックとしたボトムアップゲル製造技術により、ナノゲル基盤ヒドロゲル材料の開発と骨再生用ヒドロゲル足場材料としての応用について解説した。

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

佐々木善浩	准教授
澤田　晋一	特任助教
戸井田さやか	博士3年
神谷　厚輝	博士3年
下田　麻子	博士2年
○関根由莉奈	博士2年
高橋　治子	博士2年
土戸　優志	博士1年
安岡　潤一	博士1年
阿部　慶太	修士2年
中島　　彩	修士2年

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など自由形式で記載

本年度は、当研究室の一人がAISSに採用されて、充実した研究展開と共同研究が実施できた。

©朝日新聞社 2010年

44618号（日刊）

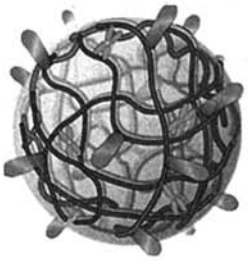
朝日新聞

2010年（平成22年）
7月13日
火曜日

科学
（火・金 掲載）

ワクチン効果高い新カプセル 東大

副作用の恐れが小さく、ワクチンの効果を高めるカプセルを東京大学医科学研究所の清野宏教授らのチームが開発した。ゲル状の極小カプセル＝イメージ図、清野教授提供＝でワクチンを包み、狙った場所に長くとどめる。英科学誌ネイチャーマテリアルズ電子版で発表した。



研究チームは、インフルエンザウイルスなどが進入する鼻の粘膜に吹き付けるタイプのワクチンへの応用を狙って開発を進めた。粘膜に長くとどめれば、副作用の恐れがある免疫増強剤を使わずに効果が期待できる。

チームの東京医科歯科大の秋吉一成教授らはグルコースから作った40ナノメートル（ナノは10億分の1）以下のカプセルで、病原性をなくしたボツリヌス菌や破傷風菌を包んだ。カプセル表面は微弱なプラスの電気を帯びており、マイナスを帯びた粘膜と結びつきやすい。マウスの実験で、10時間以上粘膜と結びつき、抗体ができることを確認した。中枢神経への副作用はなかった。（杉本崇）

注射を使わない“新ワクチン”へ前進

マテリアル・サイエンス

重症化予防から感染予防へ，次世代ワクチンに有望な材料

注射型のワクチンにかわり，鼻の粘膜に投与する「経鼻型ワクチン」が今，次世代ワクチンとして期待されている。鼻に吹き付けるなど簡単に使えるだけでなく，感染を効果的に予防できるのだ。副作用のリスクが課題だったが，このたび安全で効果的な経鼻型ワクチンの開発を可能にする研究が発表された。微細な「ナノゲル」でワクチン（抗原タンパク質）を包み，病原体と戦う免疫細胞へ届けるという。

協力

野地智法　東京大学医科学研究所炎症免疫学分野日本学術振興会特別研究員
幸 義和　東京大学医科学研究所炎症免疫学分野助教
清野 宏　東京大学医科学研究所炎症免疫学分野教授
秋吉一成　東京医科歯科大学生体材料工学研究所有機材料分野教授

粘膜は，鼻腔や腸など，体内にありながらつねに外部に面している“内なる外”だ。インフルエンザウイルスやエイズウイルス，ノロウイルス，大腸菌O157など，多くの病原体は粘膜から感染する。

現在使われているほとんどのワクチンは，注射で血管内へ接種される。この注射型ワクチンは，体内に入った病原体に効果を発揮し，発症や重症化を防ぐことができる。しかし粘膜には効果を発揮することはできず，病原体の体内への侵入には無防備だ。

一方，鼻などの粘膜に投与する粘膜ワクチンは，体内のみならず，粘膜での感染自体を予防できる次世代ワクチンとして広く研究されている。

粘膜ワクチンは単体では効果的にはたらかない。一つの理由として，粘膜組織は「上皮層」でおおわれており，奥にある免疫細胞へワクチンが到達しづらいということがある。ワクチンの効果を高めるため，増強剤が使われてきたが，現在マウスをもちいた実験で使われている粘膜用の増強剤は，ほとんどが毒素に関係する分子で，これらの毒性等の危険性は排除できていない。スイスで行われた経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験では，顔面麻痺を引きおこした例があり，増強剤との関連が疑われているという。

このように経鼻ワクチンはヒトへの応用はむずかしく，現在FluMist™という弱毒性インフルエンザワクチンが一種あるだけだ。

“ナノゲル”でワクチンを運ぶ

このたび東京大学医科学研究所と東京医科歯科大学生体材料工学研究所などの研究グループは，増強剤を使わず，鼻粘膜の免疫細胞にワクチンを効果的に運ぶ材料の開発に成功した。破傷風などのワクチンで，その効果が確かめられた。

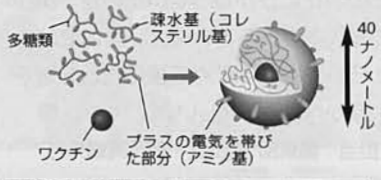
材料には東京医科歯科大学で開発していた「ナノゲル」を応用した。ナノゲルは直径30～40ナノメートル（ナノは10億分の1）の大きさで，ゆるやかな編み目構造をしており，タンパク質（ワクチン）を包んだり放出したりできる。この機能は「分子シャペロン」という生体分子に発想を得てつくられている。分子シャペロンは，細胞内などで構造がくずれたタンパク質を取りこみ，修復して放出する。同じようにナノゲルは，ワクチンを包み細胞内へ変形させずに放出できる。今回マイナスの電気を帯びている上皮層の細胞を通り抜けやすくするため，プラスの電気を帯びる分子を新たに付け加えた。

ワクチンが粘膜の「樹状細胞」へ到達！

ナノゲルの効果をマウスで実験したところ，鼻粘膜の表面に長時間とどまり，しだいに上皮層の中を浸透していくことが確認された。その際ワクチンはナノゲルから放出され，上皮層を抜けると免疫細胞の一種「樹状細胞」へとりこまれた。さらに，増強剤で危惧されている大脳への移行は，ナノゲルではまったくみられないことも確かめられた。現在，肺炎の原因の一つ「肺炎球菌」のワクチンで実験をしているが，ひきつづきヒトへの安全性やワクチンの安定性なども確認していく予定だ。

（担当：編集部　疋田朗子）

開発されたナノゲル



写真は，蛍光標識されたワクチン入りナノゲル（ピンク色）をぬったマウスの鼻腔組織。ナノゲルが粘膜の上皮層を浸透している。また，ナノゲルから放出されたワクチン（青紫色）が，直下の粘膜固有層に存在する樹状細胞（緑色）へ取りこまれている（矢印の部分）。

LETTERS
PUBLISHED ONLINE: 20 JUNE 2010 | DOI: 10.1038/NMAT2784
nature materials

Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines

Tomonori Nochi[1†‡], Yoshikazu Yuki[1†], Haruko Takahashi[2], Shin-ichi Sawada[2], Mio Mejima[1], Tomoko Kohda[3], Norihiro Harada[4], Il Gyu Kong[1], Ayuko Sato[1], Nobuhiro Kataoka[1], Daisuke Tokuhara[1], Shiho Kurokawa[1], Yuko Takahashi[1], Hideo Tsukada[4], Shunji Kozaki[3], Kazunari Akiyoshi[2] and Hiroshi Kiyono[1*]

Nanotechnology is an innovative method of freely controlling nanometre-sized materials[1]. Recent outbreaks of mucosal infectious diseases have increased the demands for development of mucosal vaccines because they induce both systemic and mucosal antigen-specific immune responses[2]. Here we developed an intranasal vaccine-delivery system with a nanometre-sized hydrogel ('nanogel') consisting of a cationic type of cholesteryl-group-bearing pullulan (cCHP). A non-toxic subunit fragment of *Clostridium botulinum* type-A neurotoxin BoHc/A administered intranasally with cCHP nanogel (cCHP–BoHc/A) continuously adhered to the nasal epithelium and was effectively taken up by mucosal dendritic cells after its release from the cCHP nanogel. Vigorous botulinum-neurotoxin-A-neutralizing serum IgG and secretory IgA antibody responses were induced without co-administration of mucosal adjuvant. Importantly, intranasally administered cCHP–BoHc/A did not accumulate in the olfactory bulbs or brain. Moreover, intranasally immunized tetanus toxoid with cCHP nanogel induced strong tetanus-toxoid-specific systemic and mucosal immune responses. These results indicate that cCHP nanogel can be used as a universal protein-based antigen-delivery vehicle for adjuvant-free intranasal vaccination.

Beginning in 2003, an enormous research initiative—Grand Challenges in Global Health—has been organized worldwide with the support of the Bill and Melinda Gates Foundation and the US National Institutes of Health. Its aim is to overcome the global infectious disease problems affecting human health today[3]. The development of a new-generation needle-free mucosal vaccine has been proposed as one of the initiative's most important goals, because it can elicit antigen-specific systemic humoral and cellular immune responses and simultaneously induce mucosal immunity, especially in the aero-digestive and reproductive tracts[2–4]. FluMist, which is composed of cold-adapted trivalent live influenza viruses, is a well-known example as the first advanced intranasal vaccine to be used in US public health, in 2003 (ref. 5). Since then, tremendous efforts have been made to further develop intranasal vaccine technology. Subunit intranasal vaccination is expected to be the safest strategy, because it should have a low risk of causing unfavourable and undesired biological reactions[6]. However, intranasal administration of a subunit antigen alone is generally insufficient for induction of antigen-specific immune responses. As a result, an adjuvant such as a bacterial toxin generally needs to be added, but these toxins are poorly tolerated by humans[7].

Cholera toxin and heat-labile enterotoxin have been extensively used as potent mucosal adjuvants in experimental animal studies because of their multiple immune-potentiating functions: they activate immunocompetent cells, including dendritic cells and B cells, and thus induce antigen-specific mucosal immunity[7–9]. However, a human clinical trial carried out in Switzerland from 2000 to 2001 to develop an intranasal influenza vaccine with inactivated influenza virus combined with a small amount of heat-labile enterotoxin was withdrawn because the co-administered heat-labile enterotoxin was suspected of causing Bell's palsy, a rare condition, in vaccinated subjects[10]. In addition, a separate study in mice demonstrated that the toxin-based adjuvant migrated into, and accumulated in, the olfactory tissues[11]. As a result of these safety issues, the development of intranasal vaccines employing the co-administration of toxin-based adjuvants has rapidly declined. Further scientific and technological innovations that will help the development of safe but effective adjuvant-free intranasal vaccines are, therefore, of high priority in global health.

Application of biomaterials, such as polymer nanoparticles and liposomes, has a great potential in vaccine development and immunotherapy[12–14]. In particular, nanometre-sized (<100 nm) polymer hydrogels (nanogels) have attracted growing interest as nanocarriers, especially in drug-delivery systems[15,16]. We have developed a new method of creating a series of functional nanogels through self-assembly of associating polymers[17]. One of these polymers, the cholesteryl-group-bearing pullulan (CHP) forms physically crosslinked nanogels by self-assembly in water[18–22] (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1). The CHP nanogels trap various proteins by mainly hydrophobic interactions[23] and acquire chaperon-like activity because the proteins are trapped inside a hydrated nanogel polymer network (nanomatrix) without aggregating and are gradually released in the native form[20,24]. These properties make the CHP nanogel a superior nanocarrier for protein delivery, especially in the area of cancer vaccine development[25,26]. In fact, recent successful clinical studies have clearly shown that subcutaneous injection of CHP nanogel carrying the cancer antigen HER2 (CHP–HER2) or NY-ESO-1 (CHP–NY-ESO-1) effectively

[1]Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan, [2]Department of Organic Materials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062, Japan, [3]Laboratory of Veterinary Epidemiology, Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka 599-8531, Japan, [4]PET Center, Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka 434-8601, Japan. †These authors contributed equally to this work. ‡Present address: Division of Infectious Diseases, Center for AIDS Research, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA. *e-mail: kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp.

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

NATURE MATERIALS DOI: 10.1038/NMAT2784 LETTERS

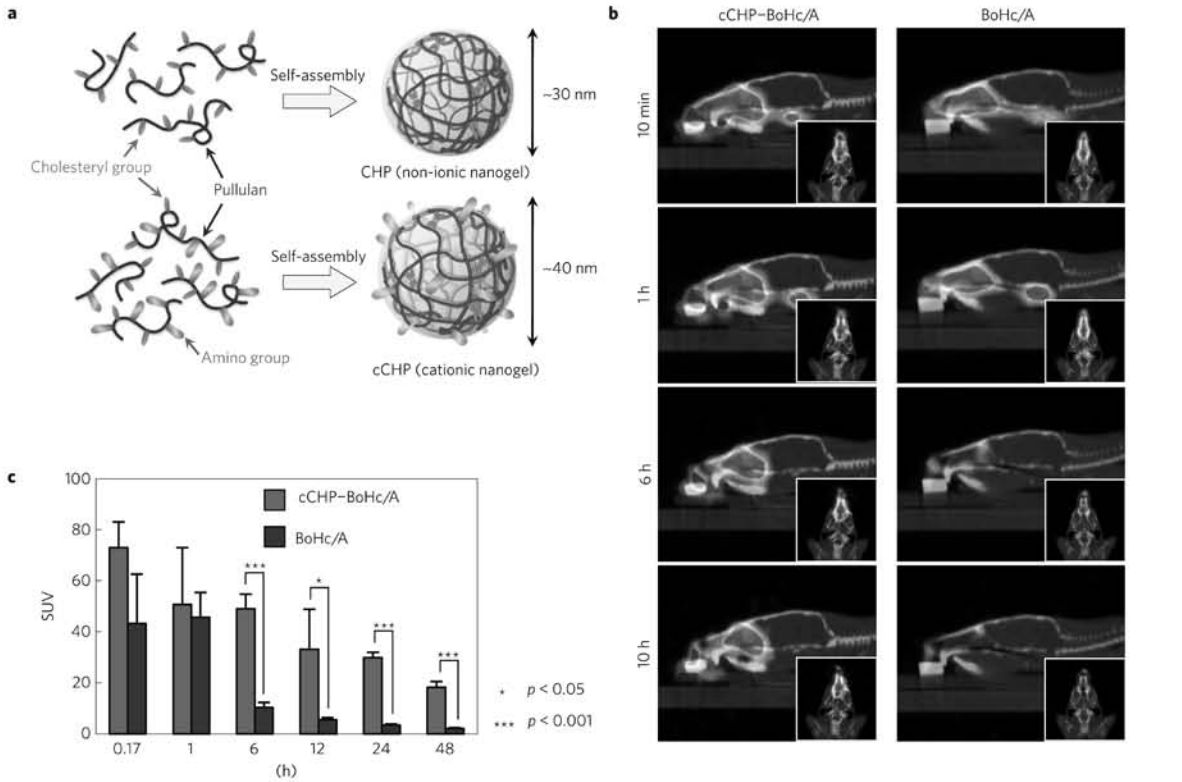


Figure 1 | Use of cCHP nanogel as a new antigen-delivery vehicle for intranasal vaccination. a, cCHP nanogel was generated from a cationic type of cholesteryl-group-bearing pullulan. **b**, Superimposition of sagittal and transverse (photo insets) PET images on the corresponding computed tomography images showed that intranasally administered cCHP nanogels carrying [^{18}F]-labelled BoHc/A were effectively delivered to the nasal mucosa. **c**, Direct quantitative study with [^{111}In]-labelled BoHc/A further demonstrated that BoHc/A was retained in the nasal tissues for more than two days after intranasal immunization with cCHP nanogel. In contrast, most naked BoHc/A disappeared from the nasal cavity within 6 h after administration.

induces antigen-specific CD8$^+$ cytotoxic T lymphocyte responses and antibody production[21,22]. Therefore, the technological successes have been extended to the use of a CHP nanogel strategy to develop adjuvant-free intranasal vaccines that can induce antigen-specific protective immunity against infectious diseases.

To demonstrate the effectiveness of CHP nanogel as a new vehicle for adjuvant-free intranasal vaccines, we prepared and used an *Escherichia-coli*-derived recombinant non-toxic receptor-binding fragment (heavy-chain C terminus) of *C. botulinum* type-A neurotoxin subunit antigen Hc (BoHc/A) as a prototype vaccine antigen because the immunogenicity of BoHc/A has already been demonstrated elsewhere[27,28]. In the initial study for evaluation of BoHc/A quality, because the antigen was highly purified, only a negligible amount of endotoxin with no *in vivo* biological effects on immunocompetent cells was detected (Supplementary Table S1; ref. 29). *C. botulinum* has been defined as a category A bioterrorism agent by the US Centers for Disease Control and Prevention because of the strong neural toxicity of *C. botulinum*-producing neurotoxin (BoNT), which could enable the bacterium to be disseminated as a biological weapon. Thus, the development of an effective vaccine—especially a mucosal vaccine—against BoNT is important for global deterrence of bioterrorism[30].

We intranasally immunized mice with CHP nanogel carrying BoHc/A (CHP–BoHc/A). It should be noted that the levels of endotoxin carried by the CHP nanogel were undetectable (Supplementary Table S1). Subsequent quality analyses of CHP–BoHc/A to confirm the nanometre-scale size uniformity and complex formation by dynamic light scattering (DLS) and fluorescence response energy transfer (FRET) analyses showed that the CHP nanogel continuously formed the nanoparticles after the incorporation of BoHc/A (Supplementary Fig. S2). However, intranasally administered CHP–BoHc/A was no better than naked BoHc/A for inducing BoNT/A-specific antibody responses (Supplementary Fig. S3a,b). These results suggest that CHP–BoHc/A is delivered minimally to the upper respiratory immune system because the mucosal tissues are tightly covered by an epithelial layer. In support of this hypothesis, the use of CHP nanogel did not enhance the BoHc/A uptake by nasal dendritic cells when compared to intranasal administration of naked BoHc/A (Supplementary Fig. S3c). Therefore, we next developed an endotoxin-free cationic type of CHP (cCHP) nanogel containing 15 amino groups per 100 glucose units (Fig. 1a and Supplementary Fig. S1 and Table S1) to improve the antigen-delivery efficacy of CHP nanogel to the anionic epithelial cell layer. DLS and FRET analyses showed that the cCHP nanogel possessed similar structural characteristics to the CHP nanogel because it maintained nanoscale size uniformity even after the incorporation of BoHc/A (Supplementary Fig. S2). In addition, consistent with its positive zeta-potential (Supplementary Table S2), it strongly interacted with the membranes of HeLa cells (Supplementary Fig. S4a) and was subsequently taken up into the cells by endocytosis (Supplementary Fig. S4b). These results are consistent with our previous finding that cCHP nanogel effectively delivered several proteins into cells *in vitro*[31]. Furthermore, an *in vivo*

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

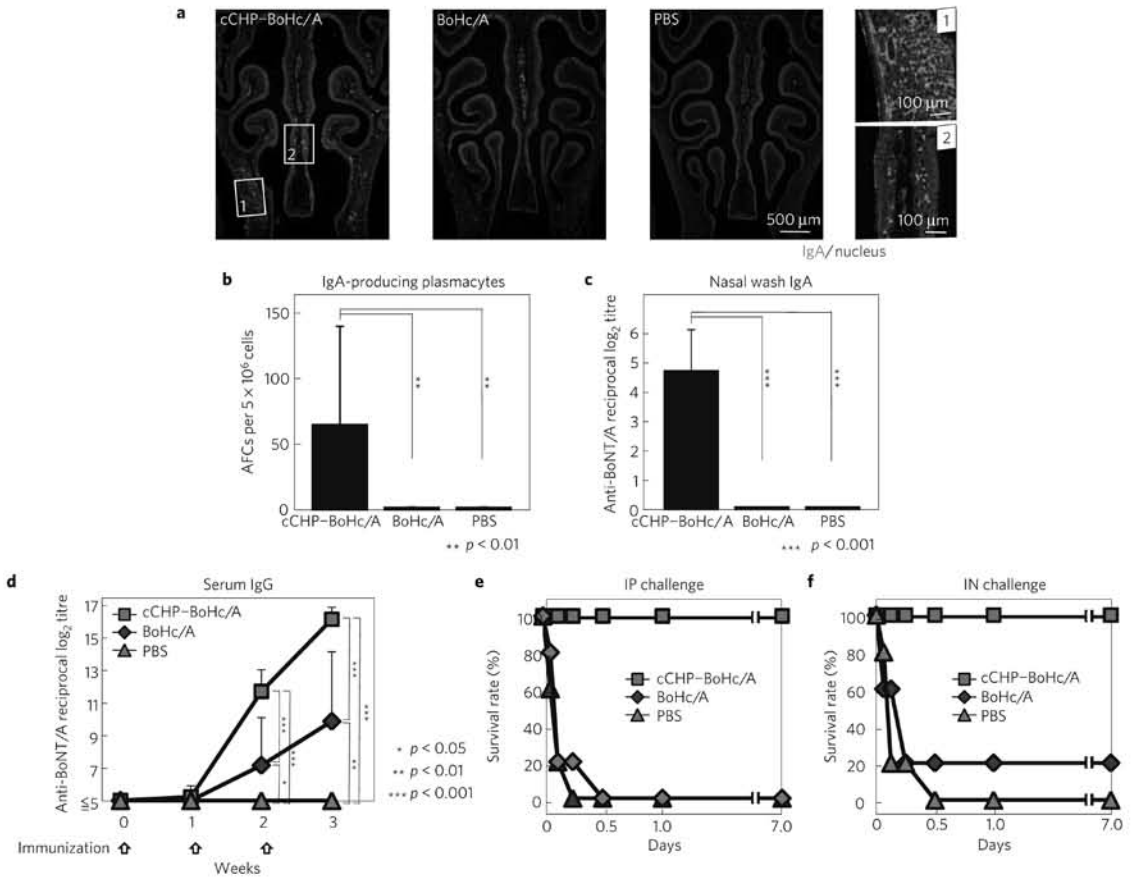


Figure 2 | Efficiency of BoHc/A with cCHP nanogel. a,**b**, BoNT/A-specific IgA-producing cells (or antibody-forming cells: AFCs) were effectively induced and recruited in the lamina propria and paranasal sinuses of the nasal mucosa 1 week after final immunization with cCHP–BoHc/A. **c**, Vigorous BoNT/A-specific IgA antibody responses were observed in nasal washes collected from mice intranasally immunized with cCHP–BoHc/A, but not from those given naked BoHc/A or control PBS. **d**, Strong BoNT/A-specific serum IgG antibody responses were induced by intranasal immunization with cCHP–BoHc/A. **e**,**f**, Mice intranasally vaccinated with cCHP–BoHc/A were completely protected from both intraperitoneal challenge with BoNT/A and intranasal exposure to the progenitor toxin.

imaging study using small-animal positron emission tomography (PET) and X-ray computed tomography showed clearly that intranasally administered cCHP nanogel carrying [^{18}F]-labelled BoHc/A was effectively delivered to, and continuously retained by, the nasal mucosa. In contrast, most of the [^{18}F]-labelled BoHc/A administered intranasally without cCHP nanogel disappeared from the nasal cavity within 6 h (Fig. 1b and Supplementary Fig. S5). A direct counting assay using a different radioisotope [^{111}In] with a long half-life (2.805 days) further demonstrated that BoHc/A was retained in the nasal cavity for more than two days when administered intranasally with cCHP nanogel (Fig. 1c).

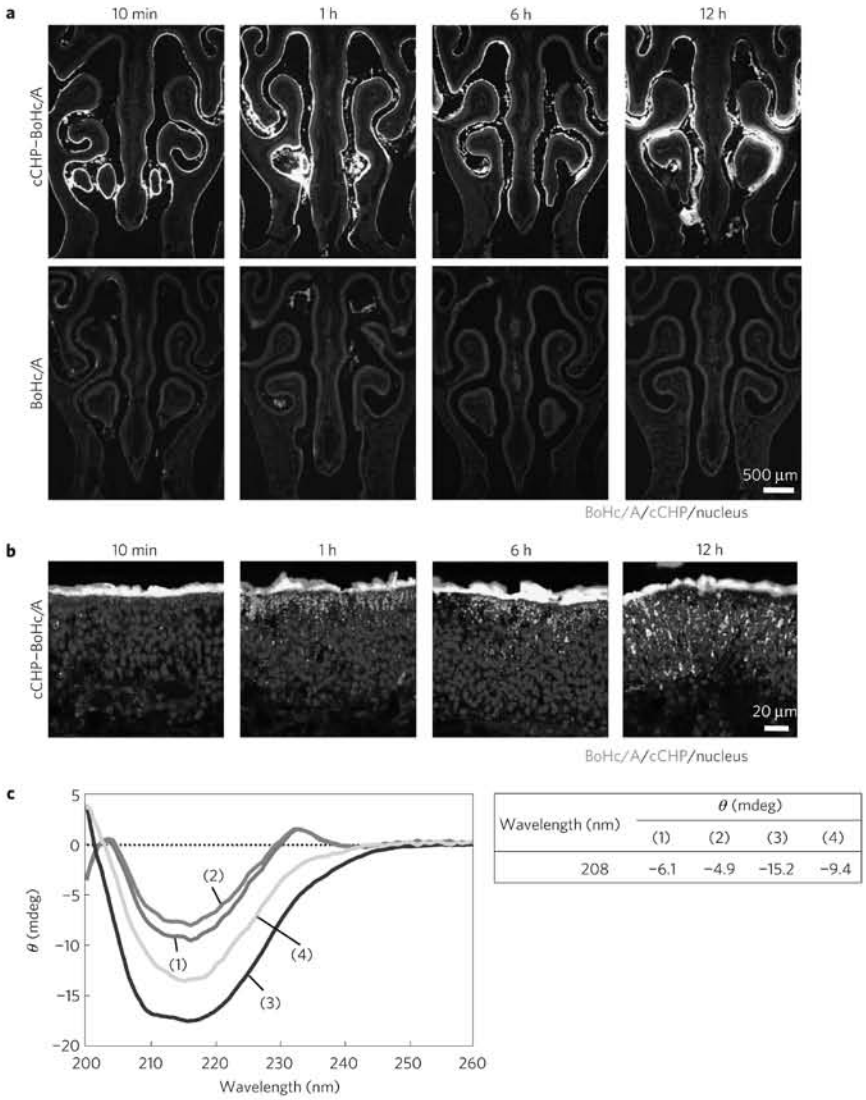
To explore the efficacy of cCHP nanogel as a new adjuvant-free delivery vehicle for intranasal vaccination, we next tested whether intranasal immunization with cCHP–BoHc/A would effectively induce BoNT/A-specific mucosal IgA antibody responses. A histochemical study showed that the numbers of IgA-committed B cells markedly increased in the lamina propria and paranasal sinuses of the nasal passages on intranasal immunization with cCHP–BoHc/A, but not with naked BoHc/A or control PBS (Fig. 2a). A subsequent enzyme-linked immunosorbent spot study analysing mononuclear cells isolated from the nasal cavities of cCHP–BoHc/A-immunized mice directly confirmed induction of BoNT/A-specific IgA-producing cells (Fig. 2b). Furthermore, high titres of BoNT/A-specific IgA antibodies were detected in only those nasal washes collected from mice immunized with cCHP–BoHc/A, not with naked BoHc/A or control PBS (Fig. 2c).

As mucosal vaccination induces two-layered immunity (that is, in both the systemic and the mucosal compartments)[2,4], our next experiments were designed to determine whether BoNT/A-specific serum antibody responses were induced by intranasal immunization with cCHP–BoHc/A. Vigorous BoNT/A-specific serum IgG antibody responses were induced in cCHP–BoHc/A-vaccinated mice but not in mice immunized with naked BoHc/A or control PBS (Fig. 2d). To confirm the broad utility of this strategy with cCHP nanogel, we next evaluated the efficacy of intranasal administration of cCHP nanogel carrying a second prototype vaccine antigen, tetanus toxoid (cCHP–TT). As we expected, high titres of tetanus-toxoid-specific serum IgG as well as mucosal IgA antibodies were induced by intranasal administration of cCHP–TT (Supplementary Fig. S6). These findings indicate that the cCHP nanogel can be used universally as a new protein antigen delivery vehicle for intranasal vaccines.

We next carried out toxin-challenge experiments to confirm the ability of intranasal immunization with cCHP–BoHc/A to

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

NATURE MATERIALS DOI: 10.1038/NMAT2784 LETTERS



Wavelength (nm)	θ (mdeg)			
	(1)	(2)	(3)	(4)
208	−6.1	−4.9	−15.2	−9.4

Figure 3 | Chaperone-like activity of cCHP nanogel facilitates effective delivery of vaccine antigen into the nasal mucosa. a, Intranasally administered cCHP–BoHc/A but not naked BoHc/A was effectively attached to the apical membrane of nasal epithelium. **b**, BoHc/A was subsequently released from the cCHP nanogel and transported into the epithelial layer. **c**, Circular dichroism analysis showed that the ellipticity (θ) value of BoHc/A, which was decreased to −15.2 mdeg after the BoHc/A was incorporated into cCHP nanogel, recovered to −9.4 mdeg after the release of BoHc/A from the cCHP nanogel by treatment with methyl-β-cyclodextrin. (1) Native BoHc/A, (2) BoHc/A heated for 5 h at 45 °C, (3) BoHc/A incubated with cCHP nanogel for 5 h at 45 °C, (4) cCHP–BoHc/A treated with methyl-β-cyclodextrin for 1 h at 25 °C.

neutralize BoNT/A and its progenitor *in vivo*. BoNT produced by *C. botulinum* usually forms a large complex called progenitor toxin with non-toxic accessory components, such as haemagglutinin, which are involved in binding to the mucosal epithelium[32]. It has been suggested that, on infection, the progenitor toxin binds to the mucosal epithelium; BoNT/A is then released into the blood circulation after detaching from these accessory components and finally interacts with nerve cells, causing botulism[33]. After intraperitoneal (i.p.) challenge with BoNT/A (500 ng, 5.5×10^4 i.p. LD_{50}, where LD_{50} represents the dose lethal to 50% of animals tested), mice intranasally immunized with cCHP–BoHc/A survived without any clinical signs, whereas those that had received naked BoHc/A or control PBS almost immediately developed neurological signs and died within half a day (Fig. 2e). Furthermore, mice intranasally immunized with cCHP–BoHc/A were completely protected from the effects of intranasal exposure to the progenitor toxin (10 μg, 2×10^5 i.p. LD_{50}) (Fig. 2f). Thus, the intranasal vaccine formulation of cCHP–BoHc/A effectively induces both systemic and mucosal protective immunity against lethal exposure to both BoNT/A and its progenitor without the co-administration of mucosal adjuvant.

To directly address how cCHP nanogel initiates and accelerates the immune responses against incorporated vaccine antigen without the use of a mucosal adjuvant, we next carried out a series of histochemical studies with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated cCHP nanogel carrying Alexa-Fluor-647-conjugated BoHc/A. As we expected, within 1 h of intranasal

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

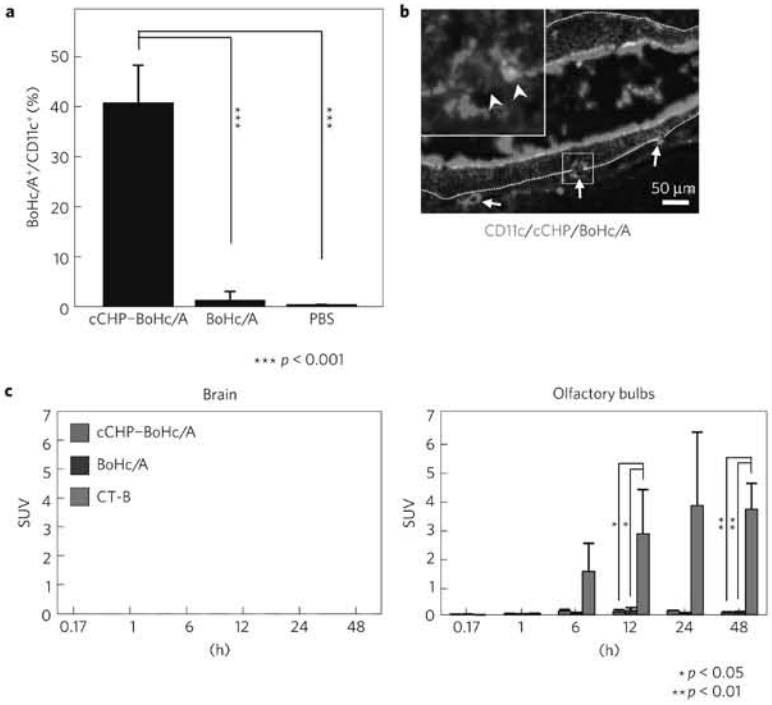


Figure 4 | Antigen delivered to dendritic cells by cCHP nanogel stimulates the nasal immune system but does not accumulate in the CNS. a,**b**, Flow cytometric (**a**) and immunohistochemical analyses (**b**) showed that BoHc/A released from cCHP nanogel was effectively taken up by $CD11c^+$ dendritic cells located in the epithelial layer and lamina propria of the nasal cavity, as shown by arrowheads. $CD11c^+$ dendritic cells and the basal layer of nasal epithelium in **b** are shown by arrows and dotted lines, respectively. **c**, The radioisotope counting assay showed that intranasally administered cCHP nanogel carrying [^{111}In]-labelled BoHc/A did not accumulate in the olfactory bulbs or brain. In contrast, [^{111}In]-labelled cholera toxin B subunit (CT-B), used as a positive control, accumulated in the olfactory bulbs from 6 h after administration.

administration, antigen-coupled fluorescence signals were observed in antigen-sampling M cells recognized by our previously established monoclonal antibody NKM 16-2-4 (ref. 34), in the nasopharynx-associated lymphoid tissues, which are inductive tissues for the airway mucosal immune system[4] (Supplementary Fig. S7a). However, because the nasal epithelium is anatomically widespread, cCHP–BoHc/A was universally distributed in the apical membrane of the nasal epithelium, and its density was much greater than that detected in the follicle-associated epithelium of nasopharynx-associated lymphoid tissues (Fig. 3a and Supplementary Fig. S7b). Examination of high-magnification images revealed that the cCHP–BoHc/A was internalized into the nasal epithelium immediately after the intranasal administration; BoHc/A was then detached gradually from the cCHP nanogel in a controlled manner in the nasal epithelial cells (Fig. 3b). In this regard, we previously showed that the proteins encapsulated by nanogels were released by protein exchange in the presence of excess amounts of other proteins, such as cellular components or enzymes[31]. In fact, the *in vitro* circular dichroism analysis showed that the secondary structure of BoHc/A was changed after the molecule was incorporated into the CHP nanogel but recovered after it was released (Fig. 3c). These results suggest that the cCHP nanogel acts as an artificial chaperone for intranasal vaccine antigen, leading to the induction of antigen-specific respiratory immune responses. In support of our hypothesis, the flow cytometric and immunohistochemical analyses showed that, within 6 h after administration of the BoHc/A with cCHP nanogel, the BoHc/A released from the nasal epithelium by exocytosis was effectively taken up by $CD11c^+$ dendritic cells located in both the epithelial layer and the lamina propria of the nasal cavity (Fig. 4a,b). It should be emphasized that the immunological role of cCHP nanogel is just to convey the vaccine antigen into the respiratory immune system effectively; it does not provide adjuvant-like activity to dendritic cells, because the bone-marrow-derived naive dendritic cells cultivated with cCHP nanogel did not enhance the expression of the co-stimulatory and antigen-presentation molecules (Supplementary Fig. S8). Moreover, nasal dendritic cells spontaneously expressed these molecules, probably because of chronic stimulation by inhaled environmental antigens, and their expression levels were not changed by intranasal administration with cCHP–BoHc/A (Supplementary Fig. S9). Therefore, the optimum antigen delivery offered by cCHP nanogel to activated nasal dendritic cells over a wide area of the nasal mucosa would be an effective strategy for inducing antigen-specific protective immune responses.

As the most important issue in intranasal vaccine development is to overcome safety concerns about the potential dissemination of intranasal vaccine antigens to the central nervous system (CNS), we carried out an *in vivo* tracer study with [^{111}In]-labelled BoHc/A. When cCHP nanogel carrying [^{111}In]-labelled BoHc/A was administered intranasally, no transition into the olfactory bulbs or brain was observed over a two-day period after administration (Fig. 4c). In contrast, when [^{111}In]-labelled cholera toxin B subunit, which can reach and accumulate in olfactory tissues[11], was administered intranasally with the same dose of radioisotope as used with the cCHP–BoHc/A, the radioisotope count in the olfactory bulbs was significantly higher than with cCHP nanogel holding [^{111}In]-labelled BoHc/A (Fig. 4c). These results support the hypothesis that cCHP nanogel administered intranasally possesses

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

NATURE MATERIALS DOI: 10.1038/NMAT2784 LETTERS

no risk of redirecting the vaccine antigen into the CNS when administered intranasally and, therefore, can be used as a safe delivery vehicle for intranasal vaccines.

In essence, the nanogel antigen delivery system now opens up a new avenue for the creation of adjuvant-free intranasal vaccines. Taken in terms of its validity in leading to the induction of effective immune responses at both systemic and mucosal compartments without a concern for the deposition of vaccine antigen into the CNS, it would provide a unique and attractive vaccine strategy for the control of respiratory infectious diseases (for example, influenza).

Methods

Animals. Female BALB/c mice between 6 and 8 weeks old were maintained in the experimental animal facilities at the Institute of Medical Science of The University of Tokyo and at Hamamatsu Photonics K.K. All experiments were carried out according to the guidelines provided by the Animal Care and Use Committees of the University of Tokyo and Hamamatsu Photonics K.K.

Preparation of nanogel vaccine. CHP or cCHP nanogel synthesized as described previously[31,35] was mixed for 5 h at 45 °C at a 1:1 molecular ratio with vaccine antigen (BoHc/A expressed by *E. coli* or tetanus toxoid; kindly provided by the Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University). The FRET was determined by an FP-6500 fluorescence spectrometer (Jasco) with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated BoHc/A and TRITC-conjugated CHP or cCHP nanogel. The DLS of CHP or cCHP carrying, or not carrying BoHc/A, and the zeta-potential of BoHc/A with or without cCHP nanogel were determined with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments). The circular dichroism spectra of BoHc/A before and after being incorporated into the cCHP nanogel, and after release from the cCHP nanogel by treatment with 15 mM of methyl-β-cyclodextrin, were obtained by using a J-720 spectropolarimeter (Jasco). To determine the cellular uptake *in vitro*, HeLa cells were treated with 10 nM of CHP or cCHP nanogel carrying FITC-conjugated BoHc/A, or of FITC-conjugated naked BoHc/A, for 4 h and analysed by flow cytometry with FACSCalibur (Becton Dickinson).

***In vivo* imaging study and radioisotope counting assay.** cCHP nanogel incorporating [^{18}F]-labelled BoHc/A was administered intranasally to mice and the distribution of radioisotope in the nasal cavity was determined by using a small-animal PET system (Clairvivo PET, Shimadzu Corporation)[36]. The radioisotope signals were measured for 10 h after administration and were superimposed on the image obtained by a small-animal X-ray computed tomography scanner (Clairvivo CT, Shimadzu Corporation). The images were analysed by using a PMOD software package (PMOD Technologies) and expressed as standardized uptake values (SUV) calculated from radioactivity in the volumes of interest. To trace the antigen for longer, [^{111}In]-labelled naked BoHc/A was administered intranasally with or without cCHP nanogel and the radioisotope counts in the nasal mucosa, olfactory bulbs and brain were directly measured by a γ-counter (1480 WIZARD, PerkinElmer) 10 min, 1, 6, 12, 24 and 48 h after administration. As a control, [^{111}In]-labelled cholera toxin B subunit[37] was administered intranasally. SUV was calculated as radioactivity (c.p.m.) per gram of tissue divided by the ratio of injection dose (1×10^6 c.p.m.) to body weight.

Immunization study. CHP or cCHP nanogel (each 88.9 μg for BoHc/A or 78.5 μg for tetanus toxoid) carrying BoHc/A (10 μg) or tetanus toxoid (30 μg), or the same amount of naked BoHc/A or tetanus toxoid dissolved in 15 μl of PBS, was administered intranasally to mice on three occasions at 1-week intervals. Sera were collected before, and 1 week after, each immunization, and nasal wash samples were taken 1 week after final immunization for antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay as described previously[34,38]. Mononuclear cells were isolated from the nasal passages 1 week after the final immunization and subjected to antigen-specific enzyme-linked immunosorbent spot analysis as shown in a previous study[38].

Neutralizing assay. To analyse the toxin-neutralizing activity of cCHP–BoHc/A-induced serum IgG and nasal IgA antibodies, the immunized mice were intraperitoneally challenged with 500 ng of BoNT/A (5.5×10^4 i.p. LD_{50}) diluted in 100 μl of 0.2% gelatin/PBS or intranasally exposed to 10 μg (in 10 μl PBS, 5 μl per nostril) of *C. botulinum*type-A progenitor toxin (2×10^5 i.p. LD_{50}, Wako). Clinical signs and survival rates were observed for 7 days, as described previously[34,38].

Histochemistry and flow cytometric analyses. Frozen sections of nasal tissues prepared from immunized mice were stained with FITC-conjugated anti-mouse IgA (BD Biosciences). To determine the distribution of cCHP–BoHc/A after intranasal administration, either TRITC-conjugated cCHP nanogel carrying Alexa-Fluor-647-conjugated BoHc/A, or Alexa-Fluor-647-conjugated naked BoHc/A, was administered intranasally and the sections of nasal tissues were stained with FITC-conjugated NKM 16-2-4 (ref. 34) or biotinylated anti-CD11c (BD Biosciences). For CD11c staining, the sections were then treated with streptavidin/horseradish peroxidase diluted 1:1000 (Pierce) followed by tyramide–FITC (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). All sections were finally counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma) and analysed under a confocal laser-scanning microscope (TCS SP2, Leica) or a fluorescence microscope (BZ-9000, Keyence). To determine the antigen uptake by dendritic cells, cCHP nanogel carrying Alexa-Fluor-647-conjugated BoHc/A, Alexa-Fluor-647-conjugated naked BoHc/A or control PBS was administered intranasally. After 6 h, mononuclear cells were isolated from the nasal passages and stained with FITC-conjugated CD11c (BD Biosciences). The frequency of BoHc/A$^+$ CD11c$^+$ cells was analysed by flow cytometry.

Data analysis. Data are expressed as means ± standard deviation. All analyses for statistically significant differences were carried out by Tukey's *t*-test, with significance indicated by *p* values of <0.001 (***), <0.01 (**) and <0.05 (*).

Received 9 December 2009; accepted 10 May 2010; published online 20 June 2010; corrected online 2 July 2010

References

1. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. K. & Zweck, A. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnol.* **24,** 1211–1217 (2006).
2. Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Med.* **11,** S45–S53 (2005).
3. Varmus, H. *et al.* Public health. Grand challenges in global health. *Science* **302,** 398–399 (2003).
4. Kiyono, H. & Fukuyama, S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Rev. Immunol.* **4,** 699–710 (2004).
5. Belshe, R., Lee, M. S., Walker, R. E., Stoddard, J. & Mendelman, P. M. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine. *Exp. Rev. Vaccines* **3,** 643–654 (2004).
6. Lavelle, E. C. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **62,** 2750–2770 (2005).
7. Yuki, Y. & Kiyono, H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* **13,** 293–310 (2003).
8. Xu-Amano, J. *et al.* Helper *T* cell subsets for immunoglobulin A responses: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th_2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* **178,** 1309–1320 (1993).
9. Takahashi, I. *et al.* Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J. Infect. Dis.* **173,** 627–635 (1996).
10. Mutsch, M. *et al.* Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *New Engl. J. Med.* **350,** 896–903 (2004).
11. van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Yuki, Y. & McGhee, J. R. Cutting edge: The mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J. Immunol.* **165,** 4778–4782 (2000).
12. Reddy, S. T., Swartz, M. A. & Hubbell, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: Developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* **27,** 573–579 (2006).
13. Peek, L. J., Middaugh, C. R. & Berkland, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60,** 915–928 (2008).
14. Sharma, S., Mukkur, T. K., Benson, H. A. & Chen, Y. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *J. Pharm. Sci.* **98,** 812–843 (2009).
15. Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J. & Matyjaszewski, K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog. Polym. Sci.* **33,** 448–477 (2008).
16. Reamdonck, K., Demeester, J. & Smedt, S. D. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter* **5,** 707–715 (2009).
17. Morimoto, N., Nomura, S., Miyazawa, N. & Akiyoshi, K. Nanogel engineered design for polymeric drug delivery. *Polym. Drug Deliv.* **II,** 88–101 (2006).
18. Akiyoshi, K., Deguchi, S., Moriguchi, N., Yamaguchi, S. & Sunamoto, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. *Macromolecules* **26,** 3062–3068 (1993).
19. Akiyoshi, K., Deguchi, S., Tajima, T., Nishikawa, T. & Sunamoto, J. Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide. *Macromolecules* **30,** 857–861 (1997).
20. Nomura, Y., Ikeda, M., Yamaguchi, N., Aoyama, Y. & Akiyoshi, K. Protein refolding assisted by self-assembled nanogels as novel artificial molecular chaperone. *FEBS Lett.* **553,** 271–276 (2003).
21. Uenaka, A. *et al. T* cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun.* **7,** 9 (2007).
22. Kageyama, S. *et al.* Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel. *Cancer Sci.* **99,** 601–607 (2008).
23. Nishikawa, T., Akiyoshi, K. & Sunamoto, J. Macromolecular complexation between bovine serum albumin and the self-assembled hydrogel nanoparticle of hydrophobized polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **118,** 6110–6115 (1996).

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

24. Akiyoshi, K., Sasaki, Y. & Sunamoto, J. Molecular chaperone-like activity of hydrogel nanoparticles of hydrophobized pullulan: Thermal stabilization with refolding of carbonic anhydrase B. *Bioconjug. Chem.* **10,** 321–324 (1999).
25. Gu, X. G. *et al.* A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces *in vitro* and *in vivo* cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarcomas. *Cancer Res.* **58,** 3385–3390 (1998).
26. Ikuta, Y. *et al.* Presentation of a major histocompatibility complex class 1-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: Implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood* **99,** 3717–3724 (2002).
27. Byrne, M. P., Smith, T. J., Montgomery, V. A. & Smith, L. A. Purification, potency, and efficacy of the botulinum neurotoxin type A binding domain from *Pichia pastoris* as a recombinant vaccine candidate. *Infect. Immun.* **66,** 4817–4822 (1998).
28. Ravichandran, E. *et al.* Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. *Infect. Immun.* **75,** 3043–3054 (2007).
29. Ultrich, J., Cantrell, J., Gustafson, G., Rudbach, J. & Hiernant, J. *The Adjuvant Activity of Monophosphoryl Lipid A* 133–143 (CRC Press, 1991).
30. Fujihashi, K., Staats, H. F., Kozaki, S. & Pascual, D. W. Mucosal vaccine development for botulinum intoxication. *Exp. Rev. Vaccines* **6,** 35–45 (2007).
31. Ayame, H., Morimoto, N. & Akiyoshi, K. Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery. *Bioconjug. Chem.* **19,** 882–890 (2008).
32. Inoue, K. *et al.* Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect. Immun.* **64,** 1589–1594 (1996).
33. Fujinaga, Y., Matsumura, T., Jin, Y., Takegahara, Y. & Sugawara, Y. A novel function of botulinum toxin-associated proteins: HA proteins disrupt intestinal epithelial barrier to increase toxin absorption. *Toxicon* **54,** 583–586 (2009).
34. Nochi, T. *et al.* A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* **204,** 2789–2796 (2007).
35. Akiyoshi, K. *et al.* Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *J. Control. Release* **54,** 313–320 (1998).
36. Mizuta, T. *et al.* Performance evaluation of a high-sensitivity large-aperture small-animal PET scanner: ClairvivoPET. *Ann. Nucl. Med.* **22,** 447–455 (2008).
37. Yuki, Y. *et al.* Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and proteolipid–protein–peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotechnol. Bioeng.* **74,** 62–69 (2001).
38. Kobayashi, R. *et al.* A novel neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* **174,** 2190–2195 (2005).

Acknowledgements

We thank J. Victor Garcia of The University of North Carolina for editing the manuscript and K. Kubota of the Institute of Medical Science, The University of Tokyo, for his technical support of the radioisotope study. We also thank A. Watanabe and K. Matsuzaki of Mercian Corporation for culturing the *E. coli* for preparation of BoHc/A. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and the Ministry of Health and Labour of Japan (H.K., K.A., Y.Y.); the Global Center of Excellence Program 'Center of Education and Research for Advanced Genome-Based Medicine—For Personalized Medicine and the Control of Worldwide Infectious Diseases' (H.K.); a Research Fellowship of the Japan Society for the Promotion of Science (T.N.); the Research and Development Program for New Bio-industry Initiatives of the Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (Y.Y.); and the Global Center of Excellence Program, 'International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases' (K.A., Ha.T.).

Author contributions

T.N. and Y.Y. designed and carried out the experiments, analysed the results and wrote the manuscript. Hi.T., S. Kozaki, K.A. and H.K. designed the experiments and wrote the manuscript. Ha.T., S-i.S., M.M., T.K., N.H., N.K., I.G.K., A.S., D.T., S. Kurokawa and Y.T. carried out the experiments.

Additional information

The authors declare no competing financial interests. Supplementary information accompanies this paper on www.nature.com/naturematerials. Reprints and permissions information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.K.

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

ERRATUM

Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines

Tomonori Nochi, Yoshikazu Yuki, Haruko Takahashi, Shin-ichi Sawada, Mio Mejima, Tomoko Kohda, Norihiro Harada, Il Gyu Kong, Ayuko Sato, Nobuhiro Kataoka, Daisuke Tokuhara, Shiho Kurokawa, Yuko Takahashi, Hideo Tsukada, Shunji Kozaki, Kazunari Akiyoshi and Hiroshi Kiyono

Nature Materials **9,** 572–578 (2010); published online: 23 June 2010; corrected after print: 2 July 2010.

On the first page of the PDF and printed versions of this Letter originally published, the full list of authors and their affiliations should have been included as shown below:

Tomonori Nochi[1†‡], Yoshikazu Yuki[1†], Haruko Takahashi[2], Shin-ichi Sawada[2], Mio Mejima[1], Tomoko Kohda[3], Norihiro Harada[4], Il Gyu Kong[1], Ayuko Sato[1], Nobuhiro Kataoka[1], Daisuke Tokuhara[1], Shiho Kurokawa[1], Yuko Takahashi[1], Hideo Tsukada[4], Shunji Kozaki[3], Kazunari Akiyoshi[2] and Hiroshi Kiyono[1*]

[1]Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan, [2]Department of Organic Materials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 101-0062, Japan, [3]Laboratory of Veterinary Epidemiology, Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Osaka 599-8531, Japan, [4]PET Center, Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K., Shizuoka 434-8601, Japan. [†]These authors contributed equally to this work. [‡]Present address: Division of Infectious Diseases, Center for AIDS Research, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA. *e-mail: kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp.

This has been corrected in the PDF version of this Letter.

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

分子細胞遺伝学分野

稲澤 譲治

難治疾患研究所・遺伝疾患研究部門
分子細胞遺伝学・教授

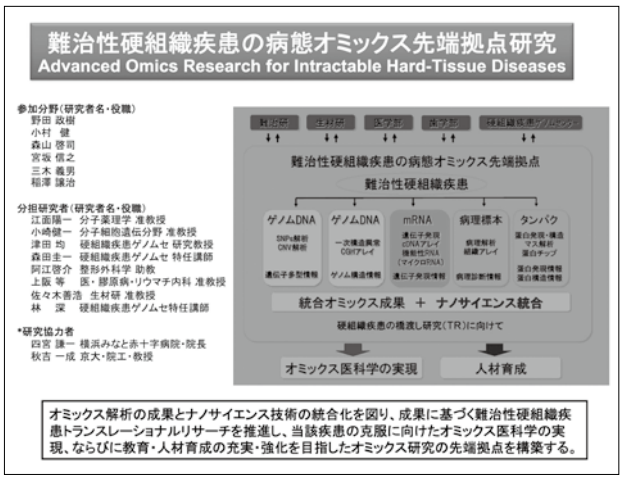
1）研究の課題名

Integrative genomics and epigenomics for personalized medicine in cancer and genetic disorders

癌と遺伝子疾患の個別化医療に向けたゲノム・エピゲノム解析研究

（小村　健教授、森山啓司教授との共同イノベーション研究である）

2)



3）研究内容の英文要約

Innovative techniques for detection of genomic and epigenomic aberrations underlying the pathogenesis in cancer and genetic diseases have been developed and using those techniques numerous disease-related genes or disease-related genomic alterations have been successfully identified during the course of the research program. In particular, we identified 10 candidate oncogenes including PAK4 and SMYD2 up-regulated due to gene amplification, and 10 candidate tumor suppressor genes including PRTFDC1 and PCDH17. Furthermore four tumor-suppressor microRNAs, miR-13 and miR-193a, epigenetically silenced, were successfully identified in OSCC. Furthermore, we constructed a consortium with 23 medical institutes and hospitals in Japan, and recruited 536 patients with clinically uncharacterized MCA/MR, whose karyotypes were normal according to conventional cytogenetics, for two-stage screening using two types of bacterial artificial chromosome-based microarray. The first screening using a targeted array detected pCNV in 54 of 536 cases（10.1%）, whereas the second screening of the 349 cases negative in the first screening using a genome-wide high-density array at intervals of approximately 0.7 Mb detected pCNVs in 48 cases（13.8%）.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

病態不明の顎顔面奇形を伴う先天異常症の潜在的ゲノムコピー数異常解析を集学的に実施して、新しい病態関連ゲノム異常の探索を実施した。X染色体連鎖精神発達遅滞症の解析と併せ総数700症例の解析を終了しデータベースを構築した。さらに日本人健常者のCNV解析を実施して日本人CNVデータベースを構築した。

口腔扁平上皮癌（OSCC）の癌関連遺伝子マイクロRNAの探索を行い、DNAメチル化により遺伝し機能を消失する癌抑制遺伝子型マイクロRNAを見出した。また、OSCC細胞株で見出した新規19q13.12-q13.2増幅領域内に座位する遺伝子の網羅的な発現解析をもOSCC関連遺伝子PAK4を世界に先駆けて同定した。PAK4は、OSCCを含む頭頸部における蛋白発現が独立した予後予測因子となることが示され、また他のグループによる癌細胞におけるキナーゼの網羅的変異解析で点突然変異が報告されていることから、新規の治療標的になる可能性がある。

A（研究拠点体制）

1. 難治性硬組織疾患の病態オミックス先端研究拠点（Advanced Omics Research for Intractable Hard-Tissue Diseases）オミックス解析の成果とナノサイ

エンス技術の統合化を図り、成果に基づく難治性硬組織疾患トランスレーショナルリサーチを推進し、当該疾患の克服に向けたオミックス医科学の実現、ならびに教育・人材育成の充実・強化を目指したオミックス研究の先端拠点を構築する。

【参加教授】野田政樹、小村 健、森山啓司、宮坂信之、三木義男、稲澤譲治

【分担研究者】江面陽一、小崎健一、津田 均、森田圭一、阿江啓介、上阪 等、佐々木善浩、林深

【研究協力】四宮謙一（横浜みなと赤十字病院・院長）、秋吉一成（京大・院工・教授）

2. 口腔がんの国際共同研究拠点:タイ王国チュラロンコン大学Atiphan Pimkamkam博士と「口腔癌のゲノム・エピゲノム解析」に関する国際共同研究体制を構築
3. 先天異常症の病態解明・診断法開発研究拠点:国内23医療機関（大学病院・国立成育医療センターなど）とコンソーシアムを形成し先天異常症の新規診断法開発と病因性CNV探索研究体制を構築

B（研究教育環境）

毎月曜日セミナーにて国際一流誌原著論文、総説論文の抄読会を実施。

毎土曜日研究進捗状況報告会を実施

各研究者は半年に一度、Research in progress報告を行い研究進捗の確認・助言

D（人材育成）

1. 平成22年度は以下の20名の大学院生が在籍して研究を実施している。そのうち6名は歯科医師（下線）である。坂本宙子、本田尚三、白　樺、村松智輝、古田繭子、鶴田智彦、松村　聡、倉沢泰浩、上杉篤史、小野宏晃、岡本奈那、小西博貴、遠藤寛則、宮脇　豊、原園陽介、山本信祐、川原正人、小林淳也、大森逸美、前田誠
2. 井本逸勢准教授が徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人類遺伝学分野教授に就任（平成22年5月1日付）した。
3. 小崎健一硬組織疾患ゲノムセンター特任准教授が東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授に就任（平成22年6月1日付）した。
4. 林深特任助教が硬組織疾患ゲノムセンター特任講師に就任（平成22年8月1日付）した。
5. 春木茂男が「Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.（Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010発表）」の研究成果で平成22年度東京医科歯科大学　田中道子賞を受賞した。

E（国際化）

1. 本田尚三が平成22年度難治疾患研究所国際研究者海外派遣プログラムにて米国派遣された。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

基礎研究成果が医療貢献するよう研究成果の出口を具体的かつ明確に設定してこれを達成するよう努力した。

6）英文原著論文

1. Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y: Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. J Biomed Biotechnol. 2011 [Epub ahead of print]
2. Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y: Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. Carcinogenesis. 2010 [Epub ahead of print]
3. ◎Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. Carcinogenesis. 2010 [Epub ahead of print]
4. ◎Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto No, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto Na, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J: Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 2010 [Epub ahead of print]
5. Xu H, Miki K, Ishibashi S, Inoue J, Sun L, Endo S, Sekiya I, Muneta T, Inazawa J, Dezawa M, Mizusawa H. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. J Neurosci Res. 88:3598-609. 2010
6. Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y: Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and

Korean populations. Nat Genet. 42:893-6. 2010
7. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H: Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. Nat Genet. 42:751-4. 2010
8. Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E: Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. J Gastroenterol. 45:1201-11. 2010
9. ◎Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J: Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. J Hum Genet. 55:590-9.2010
10. Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ: Neuroradiologic Features of CASK Mutations. AJNR Am J Neuroradiol. 31:1619-22. 2010
11. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F, Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S: DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. Oncogene. 29:4671-81. 2010
12. ◎Honda S, Orii K, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation. J Hum Genet. 55:244-7. 2010
13. Saitoh Y, Martínez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S: Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. Lung Cancer. 70:263-70. 2010
14. ◎Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010
15. Prapinjumrune C, Morita KI, Kuribayashi Y, Hanabata Y, Shi Q, Nakajima Y, Inazawa J, Omura K: DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 39:525-32. 2010

7）総説ならびに著書

1. 春木茂男、井本逸勢、稲澤譲治:がんのゲノミクス・エピゲノミクス.医歯薬出版（株）.別冊医学のあゆみ.がんの分子病理診断の新展開:5-12,2010（2010/5/20）（8P）
2. 稲澤譲治:染色体異常-検査の進歩、結果の解釈.日本医師会.日本医師会雑誌.第139巻第3号:562-566,2010（2010/6/1）（5P）
3. 小野宏晃、井本逸勢、稲澤譲治:遺伝子・ゲノム変異と大腸癌発癌~全ゲノムを研究対象としてみえてきたこと~.メディカルレビュー社.大腸癌FRONTIER.26-31,2010（2010/9/20）（6P）

8）特許取得、特許申請

【特許取得】

発明の名称:新規キメラ蛋白質およびそれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段、稲澤譲治、井本逸勢、他、特許第4473870、出願年月日:平成16年2月26日、取得年月日:平成22年3月12日。

【特許出願】

1. 2010.3.3、「癌の検出方法および抑制方法」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢・古田繭子有井滋樹、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、特願2010-046564（P09-034）
2. 2010.2.26「食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・春木茂男、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、特願2010-041825（P09-053）

［海外特許］

1. ［米国］「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.26、12/787,953 特願2009-128162
2. ［EP］「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、10164051.4 特願2009-128162
3. ［CN］「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、201010193364.8 特願2009-128162

9）平成22年度までの自己評価

我が国において、はじめて集学的な通常の染色体検査で衣装を検出することのない先天異常症を対象に536

例において自作BACアレイによる集学的なゲノム異常スクリーニングを実施した。その結果、約24%の症例に病因性のある微細染色体コピー数異常（copy number variation, CNV）を検出した。これらの中で、小頭症、小脳脳幹部低形成を症状とする疾患群にCASK遺伝子の重複を見出すなど、幾つかの新しい疾患単位となる病態を同定した点において特筆すべき成果が上がった。

10）学会発表（英文）

国際シンポジウム

1. Inazawa J: Cancer genomics and epigenomics. Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. ClinicaLasCondes,Chile.10/August/2010
2. Inazawa J: Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. Clinica Las Condes, Chile.10/August/2010
3. Inazawa J: Integrative genomics and epigenomics for identification of cancer–related genes. Linking systems-biology to cancer research. Seoul national university dental hospital.Seoul,Korea.　6 /November/2010

国際学会

1. Imoto I, Haruki S, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
2. Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Imoto I, Inazawa J: Functional screening of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral squamous cell carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
3. Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Inazawa J: Functional significance of potential oncogene YAP and its isoforms in esophageal squamouse cell carcinoma（ESCC）. 101th annual meeting of American Association for CancerResearch2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
4. Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Irie T, Kubo A, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S: Gene expression signature of the non-cancerous liver tissue associated with the early recurrence of hepatocellular carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
5. Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Yoshimura H, Ito K, Imoto I, Inazawa J: ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
6. Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: Lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5 gene（LAPTM5）is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010
   Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010（Washington,DC, USA）17-21/ April/ 2010

11）学会発表（和文）

1. 宇野雅哉、斉藤愛記、井本逸勢、稲澤譲治、山岡昇司:卵巣癌細胞におけるNF-kB inducing kinaseによる恒常的NF-kB活性化調節.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月22日
2. 後藤政広、新井恵吏、若井-牛島抄織、平岡伸介、小菅智男、細田文恵、柴田龍弘、近藤格、横井左奈、井本逸勢、稲澤譲治、金井弥栄:DNAメチル化プロファイルに基づいた膵がんの存在診断・病態診断指標の確率.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月22日
3. 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治:ヒト癌におけるLC3A variant-1の発現低下の意義.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月22日
4. 小崎健一、稲澤譲治:がん細胞においてDNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNA.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月22日
5. 村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、嶋田裕、津田均、稲澤譲治:食道扁平上皮がんにおけるYes-associated protein（YAP）のがん遺伝子としての可能性.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日

6. 井本逸勢、春木茂男、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治:食道扁平上皮癌で高頻度に発現消失する新規癌抑制遺伝子候補protocadherin17.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
7. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、田中真二、有井滋樹、稲澤譲治:肝細胞癌におけるCpGアイランドの過剰メチル化により発現制御される新規がん抑制遺伝子の同定.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
8. 小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、杉原健一、稲澤譲治:発現アレイを用いた大腸癌におけるEMT関連遺伝子の探索.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
9. 遠藤寛則、小崎健一、古田繭子、井本逸勢、天笠光雄、稲澤譲治:腫瘍特異的DNA過剰メチル化によって発現抑制される口腔扁平上皮癌関連癌抑制遺伝子型microRNAの探索.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
10. 古田繭子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤譲治:Functionalスクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性microRNAの同定.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
11. 上杉篤史、小崎健一、鶴田智彦、古田繭子、井本逸勢、小村健、稲澤譲治:口腔癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたDNAメチル化異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの探索.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
12. 鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪埜浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治:子宮体癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの同定.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
13. 倉沢泰浩、小崎健一、小野宏晃、井本逸勢、天笠光雄、稲澤譲治:癌細胞においてDNAメチル化異常により発現抑制されるEMT関連分子の探索.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
14. 田中真二、茂櫛薫、藍原有弘、松村聡、ヤセン・マハムット、稲澤譲治、田中博、有井滋樹:肝細胞癌の肉眼形態が示す特異的遺伝子発現パターンと分子標的EpCAMの意義.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月24日
15. 林深、岡本奈那、本田尚三、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、稲澤譲治:複数のゲノムアレイによる先天異常疾患におけるゲノム評価.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月28日
16. 小林淳也、本田尚三、林深、井本逸勢、折居恒治、今村淳、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治:UBE2Aを含むXq24のゲノム欠失により特徴的な臨床症状を示した男児例.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月28日
17. 岡本伸彦、林深、稲澤譲治、蒔田芳男、羽田明:Xp11.2微細重複症候群の1例.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月28日
18. 本田尚三、林深、小林淳也、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治:BAC-based X-tiling arrayを用いたX連鎖性精神発達遅滞（XLMR）の原因遺伝子探索.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月29日
19. 井本逸勢、春木茂男、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治:食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制を受ける新規癌抑制遺伝子候補Protocadherin 17（PCDH17）.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月29日
20. 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治:ヒト癌におけるLC3A variant 1の発現低下の意義.第68回日本癌学会学術総会.パシフィコ横浜.神奈川.2009年10月1日
21. 石原孝也、井上純、井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治:LAPTM5はHECT型ユビキチンリガーゼITCHの基質である.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
22. 宮脇豊、井本逸勢、春木茂男、村松智輝、松井毅、小崎健一、河内洋、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治:食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制される癌関連抑制遺伝子PCDH-X,Yの同定.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
23. 小西博貴、井本逸勢、春木茂男、小松周平、河野辰幸、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治:食道癌（ESCC）細胞株におけるhomo欠失領域から同定された癌抑

制遺伝子候補の検討.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日

24. 岡本奈那、林深、本田尚三、小栗泉、長谷川知子、小崎里華、井本逸勢、蒔田芳男、羽田明、森山啓司、稲澤譲治:新規症候群の可能性がある10p12.1-p11.23欠失の2症例.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月28日
25. 小西博貴、井本逸勢、春木茂男、小松周平、市川大輔、大辻英吾、稲澤譲治: Frequently silenced putative tumor suppressors identified homozygously deleted region in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines. 平成22年度文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」.がん若手研究者ワークショップ.アートランドホテル蓼科.長野.2010年9月1日
26. 小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治: Exploration of potential EMT-related genes in colorectal cancer by gene expression array analysis. 平成22年度文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」.がん若手研究者ワークショップ.アートランドホテル蓼科.長野.2010年9月2日

12) 受賞

1. 春木茂男が「Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. (Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010発表)」の研究成果で平成22年度東京医科歯科大学　田中道子賞を受賞した。

13) 外部資金の獲得状況

1. 独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)(委託研究費)「染色体プロジェクト　個別化医療の実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技術開発」プロジェクトリーダー・稲澤譲治156,087千円(H18-22)
2. 厚労省 精神・神経疾患研究開発費(後藤班)「精神・神経疾患バイオリソース・レポジトリーの構築及び拡充と病因病態の解明に関する研究」分担者・稲澤譲治、2,000千円(平成22年度)
3. 厚労科研・第3次対がん総合戦略(横田班)「網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階発がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」分担者・稲澤譲治、5,000千円(平成22年度)
4. 厚労学研・肝炎等克服緊急対策研究事業(有井班)「肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発」分担者・稲澤譲治、3,000千円(H20-22)
5. 厚労科研・難治性疾患克服研究事業(林　班)「今後の難病対策のあり方に関する研究」分担者・稲澤譲治、3,000千円(平成22年度)
6. 国立成育医療研究センター成育医療研究開発費(小澤班)「周産期医療における先進的診断技術の開発と応用に関する研究」分担者・稲澤譲治　3,000千円(平成22年度)
7. 文科省科学技術試験研究委託事業(研究代表者・稲澤譲治)「ゲノム網羅的解析情報を基盤とするオーダーメイドがん医療(大腸がんの個別化医療を目指した新規胃がん関連遺伝子の探索と同定)」5,000千円(平成22年度)
8. 文科省科研費補助金(研究代表者・稲澤譲治)　新学術領域研究「がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析と治療標的分子シーズの探索」50,200千円(平成22年度)
9. 独)日本学術振興会科学研究費補助金(研究代表者・稲澤)基盤研究A「がんのゲノム・エピゲノム解析に基づく個性診断法の開発」16,200千円(平成22年度)
10. 独)日本学術振興会科学研究費補助金(研究代表者・有井滋樹)基盤研究A「難治性消化器癌における転移・再発の分子診断と分子標的治療の開発」研究分担者(稲澤譲治)1,000千円(平成22年度)

14) 特別講演、招待講演、シンポジウム

1. Inazawa J: Cancer genomics and epigenomics. Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. ClinicaLasCondes,Chile.10/August/2010
2. Inazawa J: Molecular pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. Clinica Las Condes, Chile.10/August/2010
3. Inazawa J: Integrative genomics and epigenomics for identification of cancer-related genes. Linking systems-biology to cancer research. Seoul national

university dental hospital.Seoul,Korea. 6 / November/2010

4. 稲澤譲治:「腫瘍病理学特論（がんのゲノム・エピゲノム）」.北陸がんプロフェッショナル養成プログラム.金沢大学.金沢.2010年7月18日
5. 稲澤譲治:「先天異常/精神発達遅滞症の潜在的ゲノムコピー数異常解析」.イルミナ主催セミナー¨次世代遺伝子解析ツールの医療分野への展開¨.東京ステーションコンファレンス.東京.2010年9月30日
6. 稲澤譲治、井上純:LAPTM5の蓄積により誘導されるオートファジー障害を伴う細胞死;その神経芽腫の自然退縮への関与.第68回日本癌学会学術総会.パシフィコ横浜.神奈川.2009年10月3日
7. 稲澤譲治:「LAPTM5蓄積で誘導されるリソゾーム細胞死と神経芽腫の自然退縮機構」.がん特定研究5領域合同シンポジウム.学術総合センター・一橋記念講堂.東京.2010年1月14日
8. 稲澤譲治:「口腔癌と先天異常症のゲノム・エピゲノム解析」.第3回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム.東京医科歯科大学講堂.東京.2010年2月16日
9. 稲澤譲治:「神経芽腫自然退縮におけるImpaired autophagyを伴うLAPTM5依存性細胞死」.第19回日本Cell Death学会学術集会.愛知県産業労働センター.愛知.2010年7月31日
10. 井上純、稲澤譲治:癌細胞におけるオートファジー経路の障害.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
11. 稲澤譲治:がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析とがん関連遺伝子の探索.第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル.大阪.2010年9月23日
12. 林深、稲澤譲治:アレイCGHの臨床応用とCNVデータベースの構築.日本人類遺伝学会第55回大会.大宮ソニックシティ.埼玉.2010年10月29日
13. 林深、稲澤譲治:先天異常疾患の原因となるゲノム異常の網羅的探索.国立大学法人東京医科歯科大学第四回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム.東京医科歯科大学講堂.東京.2011年1月31日

15）主催学会

第18回 癌ゲノムサイエンス研究会.
東京医歯大学.2010年2月25日

第19回 癌ゲノムサイエンス研究会.
東京医歯大学.2010年6月17日

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

教授:稲澤譲治、准教授:小崎健一、助教:井上純
MTT特任講師:松井　毅、
硬組織疾患ゲノムセンター特任講師:林　深
財団法人がん研究振興財団リサーチ・レジデント:石原孝也
大学院博士課程:
坂本宙子、本田尚三、○白　樺、○村松智輝、○古田繭子、鶴田智彦、松村聡、倉沢泰浩、上杉篤史、小野宏晃、岡本奈那、小西博貴、遠藤　寛則、宮脇豊、原園陽介、山本信祐
大学院博士課程:川原正人、小林淳也、大森逸美、前田　誠

LETTERS

nature genetics

Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population

Ryo Takata[1,2], Shusuke Akamatsu[1,3], Michiaki Kubo[4], Atsushi Takahashi[5], Naoya Hosono[4], Takahisa Kawaguchi[6], Tatsuhiko Tsunoda[6], Johji Inazawa[7], Naoyuki Kamatani[5], Osamu Ogawa[3], Tomoaki Fujioka[2], Yusuke Nakamura[8] & Hidewaki Nakagawa[1]

© 2010 Nature America, Inc. All rights reserved.

Prostate cancer is one of the most common malignancies in males throughout the world[1], and its incidence is increasing in Asian countries. We carried out a genome-wide association study and replication study using 4,584 Japanese men with prostate cancer and 8,801 control subjects. From the thirty-one associated SNPs reported in previous genome-wide association studies in European populations, we confirmed the association of nine SNPs at $P < 1.0 \times 10^{-7}$ and ten SNPs at $P < 0.05$ in the Japanese population. The remaining 12 SNPs showed no association ($P > 0.05$). In addition, we report here five new loci for prostate cancer susceptibility, at *5p15* (λ-corrected probability $P_{GC} = 3.9 \times 10^{-18}$), *GPRC6A/RFX6* ($P_{GC} = 1.6 \times 10^{-12}$), *13q22* ($P_{GC} = 2.8 \times 10^{-9}$), *C2orf43* ($P_{GC} = 7.5 \times 10^{-8}$) and *FOXP4* ($P_{GC} = 7.6 \times 10^{-8}$). These findings advance our understanding of the genetic basis of prostate carcinogenesis and also highlight the genetic heterogeneity of prostate cancer susceptibility among different ethnic populations.

Asian populations have the lowest incidence and mortality rate of prostate cancer in the world, but the incidence of prostate cancer is rapidly increasing in Japan and other Asian countries[2,3]. Although the mechanisms by which prostate cancer develops and progresses are not clear, there is considerable evidence that genetic factors are important in its etiology[4,5]. A positive family history of prostate cancer is one of the most important risk factors for prostate cancer[4], and twin studies have indicated that the contribution of genetic factors to the development of prostate cancer is larger than in other common human tumors[5].

Recent genome-wide association studies (GWAS) have identified common variants at multiple loci that have moderate effects on prostate cancer risk[6–15]. Nearly 30 independent loci have been indicated to be associated with prostate cancer risk. However, GWAS for prostate cancer have been undertaken exclusively among European populations[16]. Further GWAS of Asian and other ethnic populations are required to identify additional susceptibility loci for prostate cancer and to enhance the understanding of the complex genetic effect on prostate carcinogenesis.

To identify genetic factors that confer risk of prostate cancer in the Japanese population, we carried out a GWAS using 1,583 Japanese men with prostate cancer and 3,386 control subjects (**Supplementary Fig. 1** and **Supplementary Table 1**). These subjects were genotyped using Illumina Human610-Quad BeadChip for the men with prostate cancer and Illumina HumanHap550v3 BeadChip for the control subjects, and the concordance between the genotypes determined by each of these platforms among 182 duplicated samples was 0.99998. We conducted association analysis for 510,687 SNPs that were commonly available on both BeadChips. Principal component analysis (PCA) showed that all cases and controls were clustered in the Asian population (**Supplementary Fig. 2a**). A quantile-quantile plot of the distribution of test statistics for the comparison of genotype frequencies in patients with prostate cancer versus control subjects showed that the genomic inflation factor lambda (λ) was 1.07, and the λ-value adjusted by sample size[17], $\lambda_{1,000}$, was 1.03 (**Supplementary Fig. 2b**). To further exclude the possibility of population substructure for our ethnic specific study and its influence on our GWAS results, we performed PCA again using only HapMap JPT and CHB as the references, and we found that almost all of the subjects fell into the known two main clusters of the Japanese population[18] (**Supplementary Fig. 2c**). Then we evaluated the genomic inflation factor using only the largest cluster on this PCA, but the inflation factor was not improved (**Supplementary Fig. 2d**; $\lambda = 1.06$, $\lambda_{1,000} = 1.03$), indicating that there is unlikely to be population substructure in our GWAS samples. Therefore, genotype misclassification and population substructure could not be the cause of the difference in the inflation factor.

[1]Laboratory for Biomarker Development, Center of Genomic Medicine, RIKEN, Tokyo, Japan. [2]Department of Urology, Iwate Medical University, Morioka, Japan. [3]Department of Urology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. [4]Laboratory for Genotyping Development, Center of Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [5]Laboratory for Statistical Analysis, Center of Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [6]Laboratory for Medical Informatics, Center of Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [7]Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute and School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. [8]Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan. Correspondence should be addressed to H.N. (hidewaki@ims.u-tokyo.ac.jp).

Received 26 February; accepted 6 July; published online 1 August 2010; doi:10.1038/ng.635

nature genetics

Variation in *TP63* is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations

Daiki Miki[1,2], Michiaki Kubo[3], Atsushi Takahashi[4], Kyong-Ah Yoon[5], Jeongseon Kim[5], Geon Kook Lee[5], Jae Ill Zo[5], Jin Soo Lee[5], Naoya Hosono[3], Takashi Morizono[6], Tatsuhiko Tsunoda[6], Naoyuki Kamatani[4], Kazuaki Chayama[2], Takashi Takahashi[7], Johji Inazawa[8], Yusuke Nakamura[1] & Yataro Daigo[1,9,10]

© 2010 Nature America, Inc. All rights reserved.

Lung cancer is the most common cause of death from cancer worldwide, and its incidence is increasing in East Asian and Western countries. To identify genetic factors that modify the risk of lung adenocarcinoma, we conducted a genome-wide association study in a Japanese cohort, with replication in two independent studies in Japanese and Korean individuals, in a total of 2,098 lung adenocarcinoma cases and 11,048 controls. The combined analyses identified two susceptibility loci for lung adenocarcinoma: *TERT* (rs2736100, combined $P = 2.91 \times 10^{-11}$, odds ratio (OR) = 1.27) and *TP63* (rs10937405, combined $P = 7.26 \times 10^{-12}$, OR = 1.31). Fine mapping of the region containing *TP63* showed that a SNP (rs4488809) in intron 1 of *TP63* showed the most significant association. Our results suggest that genetic variation in *TP63* may influence susceptibility to lung adenocarcinoma in East Asian populations.

Primary lung cancer is a leading cause of death from cancer in most countries[1,2]. Lung cancer comprises various types of histology that are often divided into two main types, non–small-cell lung cancer and small-cell lung cancer. Each type has different pathophysiological and clinical features, suggesting that their mechanisms of carcinogenesis differ[3]. Adenocarcinoma accounts for about 50% of all histological types of lung cancer, and its incidence is increasing in East Asian and Western countries[4–14].

Previous studies have suggested that inherited genetic factors have a significant role in lung cancer development[15,16]. Genome-wide association studies (GWAS) of lung cancer in populations of European ancestry have identified the 15q24–25.1 region to be the most significantly associated region; this region contains genes that encode nicotinic acetylcholine receptor subunits (*CHRNA5*, *CHRNA3* and *CHRNA4*)[17–22]. Other GWAS of lung cancer identified two associated risk loci at 5p15.33 (*TERT-CLPTM1L*) and 6p21.33 (*BAT3-MSH5*)[20–22]. These signals at 5p15, 6p21 and 15q25 have been refined in European populations by a GWAS that searched for inherited susceptibility to specific histological types of lung cancer. In this GWAS meta-analysis, rs2736100 (in *TERT*) was indicated to be associated with risk of lung adenocarcinoma, and no additional loci were shown to reach genome-wide significance[23]. Because most of the current GWAS on lung cancer have been conducted in European populations with a full range of different histological types of lung cancer, GWAS that focus on individual histological groups with archived clinicopathological features are required. The allelic frequencies of the strong susceptibility locus at 15q25 in European populations are very rare in Asian populations. The risk-associated SNPs in the 15q25 locus that were found in European populations were not replicated in Chinese populations, whereas other common variants in 15q25 were identified as susceptibility loci[24]. These findings suggest that there may be a significant difference in lung cancer susceptibility loci between European and Asian populations. Here, we investigated susceptibility loci for lung adenocarcinoma in Japanese and Korean populations.

We conducted a GWAS to identify genes related to lung adenocarcinoma susceptibility in 1,004 Japanese individuals with lung adenocarcinoma and 1,900 without cancer. These samples were genotyped using the Illumina Human610-Quad BeadChip in cases and the Illumina HumanHap550v3 BeadChip in controls. Genotype concordance between these two BeadChips was 99.99% among 182 duplicate samples, indicating a low possibility of genotype error. After we applied stringent quality control criteria, we carried out association analysis in 432,024 autosomal SNPs that were available on both BeadChips. Principal component analysis showed no population substructure in our population (**Supplementary Fig. 1a**). In addition, a quantile-quantile plot using the results of a Cochran-Armitage test showed that the inflation factor, λ, was 1.04, indicating a low possibility of false-positive associations resulting from population stratification (**Supplementary Fig. 1b**).

[1]Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. [2]Department of Medical Molecular Science, Hiroshima University, Hiroshima, Japan. [3]Laboratory for Genotyping Development, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [4]Laboratory for Statistical Analysis, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [5]Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Korea. [6]Laboratory for Medical Informatics, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Yokohama, Japan. [7]Division of Molecular Carcinogenesis, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan. [8]Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute and School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. [9]Department of Medical Oncology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Japan. [10]Cancer Center, Shiga University of Medical Science Hospital, Otsu, Japan. Correspondence should be addressed to Y.D. (ydaigo@ims.u-tokyo.ac.jp).

Received 12 March; accepted 26 August; published online 26 September 2010; doi:10.1038/ng.667

MEMO

分子遺伝分野

三木 義男

難治疾患研究所・遺伝疾患研究部門
遺伝子応用医学・教授

1）研究課題名

①新規プロラインキナーゼC δ（PKC δ）アポトーシス標的分子Evi-1の同定

Identification of Evi-1 as a novel PKC δ Apoptosis Regulatory Target

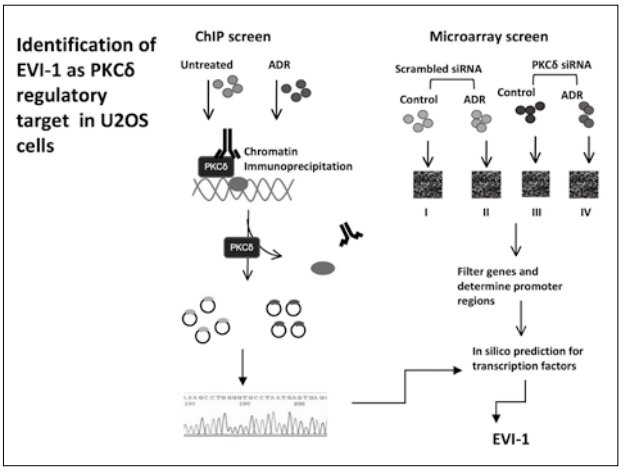
ゲノムの安定性を保持するために、重篤なDNA損傷を受けた細胞はアポトーシスを誘導し、除去される。PKC δはDNA損傷に応答して様々なシグナル伝達機構を制御することから、この制御機構についてこれまでに数多くの研究が進められてきた。そこで、本研究ではPKC δによって引き起こされる細胞死誘導に重要な新規下流制御因子の同定を目標とした。PKC δによって誘導されるアポトーシス制御機構を明らかにするために、ChIP-cloning法とMicroarray解析を組み合わせたスクリーニングを行い、PKC δの新規標的転写因子を探索した。候補転写因子はMicroarray法と同様にin silico解析によって選出した。そして本スクリーニングによって、新規PKC δ標的分子として白血病の癌遺伝子Evi-1を同定することに成功した。また、PKC δがDNA損傷に応答してEvi-1によるPLZFの活性化を制御していることを見出した。更に、Evi-1がDNA損傷性ストレスによるアポトーシス誘導に関与すること明らかにした。これらの結果より、我々は新規PKC δ標的因子Evi-1がDNA損傷下においてPLZFを活性化し、細胞死を誘導することを明らかにした。本研究によって得られる結果は、PKC δによるアポトーシス誘導制御機構の仕組みを理解する上で、重要な知見をもたらすと期待される。

②骨肉腫におけるp53により誘導されるプロアポトーシス遺伝子の探索

Discovery of the pro-apoptotic genes induced by p53 in osteosarcoma

ヒトがんでしばしば変異する腫瘍抑制遺伝子p53遺伝子は、骨肉腫でも高頻度に変異が認められる。p53は種々のストレスへの反応として、アポトーシス、細胞周期停止、DNA修復、老化または分化の誘発に機能する。p53のプロモーターへの特異性はリン酸化によって制御される。例えば、p53のSer15とSer20のリン酸化は、細胞周期停止やDNA修復機能を持つ遺伝子のプロモーターへのp53の結合に影響する。さらに、Ser46のリン酸化は、p53が選択的にプロアポトーシス遺伝子を活性化して、DNA損傷に対してアポトーシスを誘発する。骨肉腫におけるプロアポトーシス遺伝子はほとんど未知である。現在の研究は、ヒト骨肉腫由来の細胞株でp53のSer46リン酸化によって誘導されるプロアポトーシスの遺伝子を探索した。

2)



3）研究内容についての英文要約

● Identification of Evi-1 as a novel PKC δ Apoptosis Regulatory Target

Severe DNA damage causes apoptosis that eliminates affected cells to maintain genome stability. Accumulating studies have revealed that Protein kinase C delta（PKC δ）regulates diverse signal transduction pathways in

response to DNA damage. The projects aim to identify PKC δ downstream regulatory substrates that are responsible for the cell death machinery. To explore the apoptosis mechanism that PKC δ modulates, we sought to uncover transcription factor targets of PKC δ by devising a screening strategy that utilizes ChIP-cloning and microarray analysis. Transcription factor candidates were generated by in silico data-mining of the ChIP as well as the microarray data and this results in the identification of Evi-1, a leukemic oncogene. We later demonstrated that PKC δ regulates Evi-1 to activate PLZF transcription in response to DNA damage. Furthermore, Evi-1 was associated with genotoxic stress-stimulated apoptosis. Taken together, we have discovered a novel regulation of Evi-1, which transactivates PLZF, by PKC δ to induce cell death by genotoxic stress. We hope that the achievement of this project will bring about new knowledge for the understanding of how PKC δ regulates apoptosis.

● **Discovery of the pro-apoptotic genes induced by p53 in osteosarcoma**

Osteosarcoma is the most common bone cancer in children and adolescence. The genetic alterations in p53 that is one of the most frequently mutated tumor suppressor gene in human cancer are constantly observed in osteosarcoma. p53 function in the cellular response to stress by inducing apoptosis, cell cycle arrest, DNA repair, senescence, or differentiation and the tumor suppressor-function of p53 depends on its transactivation function. Recent evidences suggest that promoter selectivity of p53 is regulated by its phosphorylation. For example, phosphorylation of Ser15 and Ser20 influences binding of p53 to gene promoters for cell cycle arrest and DNA repair. Moreover, phosphorylation of Ser46 enables p53 to selectively transactivate pro-apoptotic genes and induce apoptosis in response to DNA damaging stimuli. The pro-apoptotic genes in osteosarcoma are still remained largely unknown. The current study aims to investigate pro-apoptotic genes induced by Ser46 phosphorylation of p53 in human osteosarcoma cell lines.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

研究室におけるスペースの確保、機器の整備および補充、研究推進のためのスケジュール等を作成し研究室内部の体制の整備を継続するとともに、整形外科、口腔外科等の臨床グループと立案した共同研究計画を進めるなど、総合的に研究拠点体制の継続に努めた。

B（研究教育環境）

ジャーナルクラブ、研究進捗ミーティング、GCOEセミナー等研究教育環境の整備を継続した。

C（人材確保）

大学院生2名がGCOE研究を遂行した。

D（人材育成）

新たに入学する大学院生を含め上記体制で人材育成に努めている。

E（国際化）

GCOEプログラムの中で国際セミナーへの参加、海外招聘研究者との議論等を通して国際化を図った。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

GCOE推進研究者間で立案した共同研究計画を積極的に進め、特に臨床グループとの共同研究で患者臨床検体を用いたゲノム研究推進体制の構築及びその継続に努めた。

6）英文原著論文

1. ◎ Wang, H.F., Takenaka, K., Nakanishi, A. and Miki, Y. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2. Cancer Res, 71, 68-7.（2011）
2. Ito, Y., Nagasaki, K., Miki, Y., Iwase, T., Akiyama, F., Matsuura, M., Horii, R., Makita, M., Tokudome, N., Ushijima, M., Yoshimoto, M., Takahashi, S., Noda, T. and Hatake, K. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. Cancer Sci, 102, 130-6.（2011）
3. Kimura, J., Kudoh, T., Miki, Y. and Yoshida, K. Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. Int J Cancer, 128, 1524-31.（2011）
4. Nihira, K., Ando, Y., Yamaguchi, T., Kagami, Y., Miki, Y. and Yoshida, K. Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. Cell Death Differ, 17, 689-98.（2010）
5. Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R.M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., Nakazawa, Y., Niimi, A., Miki, Y., Jaspers, N.G., Mullenders, L.H., Yamashita, S., Fousteri, M.I. and Lehmann, A.R. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. Mol Cell, 37, 714-27.（2010）
6. Taira, N., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. J Biol Chem, 285, 4909-19.（2010）
7. Kudoh, T., Kimura, J., Lu, Z.G., Miki, Y. and Yoshida, K. D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis in response to DNA damage. Exp Cell Res, 316, 2849-58.（2010）
8. Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. The c-Abl

tyrosine kinase stabilizes Pitx1 in the apoptotic response to DNA damage. Apoptosis, 15, 927-35. (2010)

7) 総説ならびに著書

英文:

1. Yoshida, K. and Miki, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. Cancer Sci, 101, 831-5. (2010)
2. Miki, Y. Gene expression-based diagnosis of efficacy of chemotherapy for breast cancer. Breast Cancer, 17, 97-102. (2010)

和文:

1. 三木 義男【乳癌　基礎と臨床の架け橋】発がん・増殖　BRCA遺伝子機能とその機能欠損による乳癌発生機序. 最新医学65巻6月増刊 1307-1317, (2010)
2. 磯村 実, 三木 義男【固形癌の最新治療　癌治療への新たな取り組み】治療の新たな取り組み　個別化治療　ゲノム情報を生かした個別化医療. 日本臨床68巻6号 1117-1120, (2010)
3. 斉藤 広子, 三木 義男【DNA修復とがん治療の分子標的】Interface on Cancer Therapy　DNA修復とがん治療の分子標的　DNA損傷修復機構. がん分子標的治療8巻2号 94-101, (2010)
4. 磯 村 実, 三 木 義 男. What's New in SURGERY FRONTIER（第64回） Non-coding regionにおける遺伝子制御の最近の知見　遺伝子多型解析による疾患遺伝子の同定. Surgery Frontier 17巻1号 50-52, (2010)

8) 平成22年度までの自己評価

GCOE プログラムに参加し、骨軟部腫瘍（骨肉腫、軟骨肉腫、歯肉癌など）を中心に、ゲノム科学を応用した研究を進めてきた。一方、骨肉腫における新規プロラインキナーゼCδ（PKCδ）アポトーシス標的分子Evi-1の同定に成功した。今度は、臨床系グループとの共同研究体制を維持し臨床検体収拾システムを作製、順次癌組織の収集を促進し遺伝子発現プロファイル解析を進める。また、教育等には大きく貢献できたと判断している。

9) 学会発表（英文）

1. Miki Y. Large - scale genomic studies in breast cancer patients for personalized chemotherapy. Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis, Tokyo, Japan, September 12-16, 2010 (oral presentation)
2. Miki Y. Interference with BRCA2, which localized to the centrosome, leads to abnormal nuclear division. The 15th Japan – Korea Cancer Research Workshop - Tumor microenvironment and progress in breast cancer research -, Incheon, Korea, December 21-22, 2010 (oral presentation)

10) 学会発表（和文）

1. 吉村 慶子; 竹内 賢吾; 松浦 正明; 牛島 大; 秋山 太; 三木 義男. 乳癌の新規予後因子の同定-FKBP51とHLA-DR-（Combination of FKBP51 and HLA-DR as a new predict of survival in breast cancer）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
2. 三本 麗; 木村 純子; 三木 義男; 吉田 清嗣. 新規p53応答遺伝子D4S234EはDNA損傷下において小胞輸送を介してアポトーシスを誘導する（D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis via the ER trafficking in response to DNA damage）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
3. 細川 佳那; 中西 啓; 斉藤 広子; 三木 義男. がん細胞における欠損型BRCA2タンパク質の同定とその形成機序（Identification of a cleavage product of BRCA2 in cancer cell lines and its formative mechanism ）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
4. 高岡 美帆; 中西 啓; 三木 義男. S期核内におけるBRCA2の新しい局在部位（The localization of BRCA2 foci in normal S-phase nuclei）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
5. 真利久 サディヤ; 中西 啓; 三木 義男. BRCA2由来中心体移行シグナルの解析（Analysis of centrosome localization signal（CLS）in BRCA2）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
6. 牛島 大; 磯村 実; 三木 義男; 松浦 正明. ゲノムワイドSNPデータからエピスタシスを検出する方法の改良について（Improvement of detection method of epistasis from genome-wide SNP data）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
7. Tiantian Guo; 中西 啓; 斉藤 広子; 大海 忍; 三木 義男. Aktキナーゼによるリン酸化BRCA2と14-3-3-γとの結合（Phosphorylation of BRCA2 Akt kinase promotes its binding to 14-3-3gamma）. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
8. 平 直江; 三本 麗; 倉田 盛人; 北川 昌伸; 三木 義男; 吉田 清嗣. DYRK2は転写因子c-Jun/c-Mycへのリン酸化を介して細胞周期G1/S期の進行を制

御 す る（DYRK2 regulates the G1/S transition by phosphorylation of c-Jun and c-Myc.第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月

9. 長崎 光一; 磯村 実; 松浦 正明; 牛島 大; 宮田 敏; 秋山 太; 野田 哲生; 三木 義男. 遺伝子発現パターンに基づく乳癌の新規分類法の検討（Gene expression classification of human breast cancer）.第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月
10. 三木 義男; 斉藤 広子; 中西 啓. 細胞質分裂におけるMid-bodyでのBRCA2の機能解析. 第16回 日本家族性腫瘍学会、新潟、2010年7月

11）外部資金の獲得状況

● 科学研究費補助金、 基盤C
研究題目:細胞アレイによる卵巣癌抗癌剤効果予測システムの構築と分子標的薬の探索
代表:津田　浩史
期間:平成22年
研究費総額:234万円

● 二国間交流事業共同研究
研究題目:乳癌の易罹患性に係る遺伝子多様性に関する日露比較研究
代表:三木　義男
期間:平成22年～平成23年
研究費総額:500万円

● 文部科学省科学技術試験研究・委託業務・平成20年度～23年
研究題目:ゲノム網羅的解析情報を基盤とするオーダーメイドがん医療
代表:稲澤　譲治
期間:平成20年～平成23年
研究費総額:2,000万円

12）特別講演、招待講演、シンポジウム

1. 三木 義男. Molecular biologyにおける分子解析法（Analytical methods in molecular biology（From basic techniques to the advanced technology））.第69回日本癌学会学術総会、教育口演、大阪、2010年9月
2. 三木 義男; 牛嶋 大; 松浦 正明; 秋山 太; 岩瀬 拓士; 長崎 光一. 今、乳癌の最先端研究はどこまで進んでいるのか 乳がんにおけるgene expression profiling研究の現状と今後の展望. 第18回日本乳癌学会総会、シンポジウム、札幌、2010年6月
3. 三木 義男. 家族性乳癌の特徴とその発生機構. Kyushu Breast Cancer Workshop、福岡、2010年7月
4. 三木 義男. 乳癌の最新情報. Osaka Breast Cancer Workshop、大阪、2010年11月
5. 三木 義男. HBOC総論:BRCA基礎. 第1回 遺伝性乳がん卵巣がん（HBOC）セミナー、東京、2010年1月

13）主催学会

1. The Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis, September 12-16, 2010, Tokyo, Japan（Co-chairperson）
2. The 15th Japan – Korea Cancer Research Workshop - Tumor microenvironment and progress in breast cancer research -, December 21-22, 2010, Incheon, Korea,（Organizer）

14）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授	吉田　清嗣
助　教	竹中　克也
特任助教	平　直江
D 4	Hew Hoi Chin（侯 韋君）
D 3	高岡 美帆
D 3	仁平　啓史
D 2	Wali Nadila（瓦力 娜迪拉）
D 2	Mariku Sadiya（真利久 サディヤ）
D 1	Dashzeveg Nurmaa（ダシュゼヴェゲ ヌルマ）
M 2	伊藤　明泉
M 2	奥　郁美
M 2	細川　佳奈
M 1	Guo Tiantian（郭　甜甜）
M 1	加賀美裕也
M 1	鈴木　一穂

15）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など自由形式で記載

GCOEプログラムに参加した学生の教育、研究推進は大きな前進が認められ、このような活動が財政的支援とともに継続されることを強く希望する。

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

Cancer Research

BRCA2 and Nucleophosmin Coregulate Centrosome Amplification and Form a Complex with the Rho Effector Kinase ROCK2

Hui-Feng Wang, Katsuya Takenaka, Akira Nakanishi, et al.

Cancer Res 2011;71:68-77. Published OnlineFirst November 16, 2010.

Updated Version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/11/17/0008-5472.CAN-10-0030.DC1.html

Cited Articles	This article cites 39 articles, 17 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/1/68.full.html#ref-list-1

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

Molecular and Cellular Pathobiology

Cancer Research

BRCA2 and Nucleophosmin Coregulate Centrosome Amplification and Form a Complex with the Rho Effector Kinase ROCK2

Hui-Feng Wang[1,2], Katsuya Takenaka[1], Akira Nakanishi[1], and Yoshio Miki[1,2]

Abstract

BRCA2 germline mutations account for the majority of heredity breast and ovarian cancer. Besides its role in DNA damage repair, BRCA2 also plays an important role in cytokinesis, transcription regulation, and cancer cell proliferation. Recently, we reported that BRCA2 localizes to centrosomes as well as nuclei and the dysfunction of BRCA2 in a centrosome causes abnormalities in cell division. Here, we identified a nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin (NPM), as a novel BRCA2-associated protein. We also detected the binding of BRCA2 to ROCK2, an effector of Rho small GTPase. Because it is known that ROCK2 binds to NPM at centrosomes, these 3 proteins may form a complex. NPM-binding region was within amino acids 639–1,000 of BRCA2. Exogenous expression of this BRCA2 region resulted in aberrant centrosome amplification and a high frequency of multinucleated cells. Our results suggested that a complex consisting of BRCA2, NPM, and ROCK2 maintains the numerical integrity of centrosomes and accurate cell division and that dysfunction of this regulation might be involved in the tumorigenesis of breast cancer. *Cancer Res; 71(1); 68–77. ©2010 AACR.*

Introduction

BRCA1 and *BRCA2* germline mutations predispose hereditary breast and ovarian cancer, and mutation of *BRCA2* is involved in approximately 50% of hereditary breast cancers (1, 2). Besides its important role in double-strand break repair by homologous recombination (3, 4), BRCA2 also plays a pivotal role in transcriptional regulation (5), cytokinesis (6), cell proliferation (7), and centrosome duplication (8). However, the exact function of BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer has not been well characterized. Recently, we reported that BRCA2 has a centrosomal localization signal and is a substrate of Crm1. BRCA2 localizes to centrosomes as well as nuclei, and the dysfunction of BRCA2 in centrosomes causes abnormalities in cell division (9, 10). It has been intriguing to identify novel BRCA2-associated proteins at centrosomes to elucidate exact roles of BRCA2 in centrosome regulation and cell division, as well as to reveal the function of BRCA2 in the pathogenesis of hereditary breast cancer.

Authors' Affiliations: [1]Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, and [2]Global Center of Excellence Program for International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

Corresponding Author: Yoshio Miki, Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. Phone: 81-3-5803-5825; Fax: 81-3-5803-0242. E-mail: miki.mgen@mri.tmd.ac.jp

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

©2010 American Association for Cancer Research.

The cell cycle is an intricate process, including DNA replication and cell division that lead to the formation of 2 genetically equivalent daughter cells from a bipolar mother cell. In this process, the centrosome duplication occurs once beginning at G_1/S phase and completing within S phase, coinciding with the DNA replication. Disruption of coordination of S-phase events and/or disruption of checkpoints in S and M phases can lead to the genomic instability, and abnormality of centrosome duplication can result in aneuploidy, one of initiation events of carcinogenesis (11, 12).

The centrosome consists of a pair of centrioles and surrounding proteins. Its duplication is tightly controlled and regulated through several mechanisms during cell division. Ran-Crm1 network is involved in this process to ensure the formation of a bipolar spindle (13, 14). It was reported that Plk1 is a parallel activator of centriole disengagement and acts to license centrosome duplication during late G_2 and early M phases (15, 16). Cdk2 and p53 are also required for centrosome duplication. The protein product of p53 localizes to centrosomes and regulates centrosome duplication as a transcription factor (17, 18). Cdk2 is the essential conductor and mediates centrosome amplification by inducing some tumor suppress genes including *p53* and the nucleophosmin (NPM/B23) (19). Especially in p53-null cells, the Cdk2/Cdk4/NPM pathway is a major guardian of centrosome dysfunction and genomic integrity (20).

NPM is a multifunctional nucleolar phosphoprotein that shuttles between the nucleus and cytoplasm during the cell cycle (21, 22). It participates in ribosome assembly, pre-rRNA processing (23, 24), mRNA processing (25, 26), DNA duplication (27), nucleocytoplasmic protein trafficking (28), and molecular chaperoning (29). NPM is also a substrate of

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

Crm1 (30) and is associated with unduplicated centrosome as a target of Cdk2/cyclin E. Most of NPM are dissociated from centrosomes after being phosphorylated upon Thr199 by Cdk2/cyclin E during S phase. Some remain at centrosomes and bind to ROCK2, leading to the initiation of centrosome duplication (31, 32). NPM reassociates with centrosomes in mitosis and regulates centrosome duplication (33).

ROCK2 is a Ser/Thr kinase controlled by the small GTPase Rho (34, 35) and regulates the microfilament bundle and focal adhesion site (36), as well as the acetyltransferase activity of p300 (37). ROCK2 is also a Rho kinase and a centrosomal protein that physically interacts with NPM and promotes centrosome duplication. It is superactivated by Thr199-phosphorylated NPM at a centrosome during late G_1 phase and rapidly targets an unknown protein that plays a key role in the initiation of centrosome duplication (32).

In this report, we identified NPM and ROCK2 as binding proteins of BRCA2 by mass spectrometry and further displayed that NPM and ROCK2 interact with BRCA2 in cells. Moreover, physical inhibition of interaction between endogenous BRCA2 and NPM *in vivo* leads to abnormal amplification of centrosome numbers and a high frequency of multinucleated cells in interphase. We propose that NPM, ROCK2, and BRCA2 may form a complex to coregulate centrosome duplication and deregulation of this process may be involved in the tumorigenesis of breast cancer.

Materials and Methods

Cell culture

COS-7 and HeLa S3 cells were purchased from RIKEN BioResource Center and cultured in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% FBS, penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 μg/mL)] in an atmosphere containing 5% CO_2. These cells were tested and authenticated by the provider. The cumulative culture length of these cells was fewer than 6 months after resuscitation.

Purification of centrosomal proteins and mass spectrometric analysis

Centrosomes were prepared from quiescent HeLa S3 cells as described (38). After centrifugation by a discontinuous gradient consisting of 500 μL of 70%, 300 μL of 50%, and 300 μL of 40% sucrose solutions, fractions (200 μL per fraction) were collected from the bottom (fractions 1–7). The aliquots from each fraction were diluted with 1 mL of PIPES buffer (10 mmol/L of PIPES, pH 7.2) and subjected to centrifugation at 15,000 rpm for 10 minutes. The pellet was subjected to further analysis. To identify the proteins associated with BRCA2 in centrosomes, immunoprecipitates with anti-BRCA2 were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. The bands of interest were excised from the gel and subjected to mass spectrometric (LC/MS/MS) analysis as described (39). The acquired collision-induced dissociation spectra were analyzed by Mascot software.

Plasmid construction and transfection

Human NPM (B23.1) full-length cDNA was isolated by RT-PCR from HeLa S3 total RNA using Pyrobest polymerase (Takara Bio) and subcloned into pME18S-HA-A vector in-frame with appropriate N-terminal tags. Plasmids for FLAG-tagged BRCA2 expression were described previously (9). The FLAG-tagged segments of BRCA2 (FLAG-S1 BRCA2 (1–1,000 amino acids), FLAG-S2 BRCA2 (967–2,133), FLAG-S3 BRCA2 (2,093–3,418), FLAG-R1 BRCA2 (1–157), FLAG-R2 BRCA2 (113–685), FLAG-R3 BRCA2 (639–1,508), and FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000)) were generated by PCR and cloned into pFLAG-CMV-2B or pME18S-FL3-FLAG-B vector. Series of transfection were carried out using TransIT-LT1 reagent (Mirus Bio) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies

The antibodies used in this study were anti-ROCK2 polyclonal antibody (Upstate Biotechnology; 07-443), anti-NPM/B23 mouse monoclonal antibody (Chemicon; MAB4500), anti-NPM/B23 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz; FC-8791), anti-B23 monoclonal antibody (Sigma; B0556), anti–phospho-NPM (anti–p-NPM; Thr199) rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technology; 3541), anti-mouse IgM antibody (Sigma; M8644), anti-BRCA2 mouse monoclonal antibody (Oncogene; Ab-1), anti-BRCA2 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz; H299), anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma; F3165), anti-γ-tubulin rabbit antibody (Sigma; T3559), anti-γ-tubulin monoclonal antibody (Santa Cruz; C-11), anti-centrin2 goat polyclonal antibody (Santa Cruz; N-17), anti-centrin1/2 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz; H-40), and anti-HA rat monoclonal antibody (Roche; clone 3F10).

Immunoprecipitation and immunoblot analysis

Cells were lysed in 1% NP40 lysis buffer (50 mmol/L of Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L of NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mmol/L of NaF, 1 mmol/L of Na_3VO_3, 1 mmol/L of dithiothreitol, 1 mmol/L of phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/mL of leupeptin, and 10 μg/mL of pepstatin) and then incubated on ice for 30 minutes. After centrifugation, cell lysates were immunoprecipitated with anti-NPM, anti-ROCK2, or anti-BRCA2 antibodies bound to Protein A (GE Healthcare) or Protein G (Zymed Laboratories) Sepharose, or anti-HA affinity matrix (Roche Diagnostics) or anti-FLAG M2-agarose (Sigma). The immunoprecipitates were washed 3 times with 0.1% NP40 lysis buffer. Cell lysates or immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose filters (Bio-Rad) or polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). The membranes were then incubated with anti-NPM, anti-BRCA2, anti-ROCK2, anti-FLAG, and anti-HA antibody, respectively. After extensive washing, the blots were incubated with horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit or anti-mouse or anti-rat immunoglobulin antibodies (Santa Cruz). The antibody–antigen complex was visualized by chemiluminescence (PerkinElmer).

Indirect immunofluorescence microscopy

Proliferating cells cultured in chamber slides were fixed with 3.5% formaldehyde in PBS for 10 minutes on ice and

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

permeabilized with 50%, 75%, and 95% cold ethanol on ice for 5 minutes, blocked for 30 minutes, incubated with primary antibody for 1 hour at room temperature, incubated with Alexa Fluor 488– or 594–conjugated secondary antibody (Molecular Probes) for 30 minutes at 37°C, and then preserved in Vectashield (Vector Inc.). DNA was stained with bisbenzimide (Hoechst33258). The samples were examined with an Olympus Power BX51 fluorescence microscope (Olympus).

Results

Identification of NPM and ROCK2 as candidates for BRCA2-associated centrosomal proteins

In an attempt to determine the exact biological significance of BRCA2, we searched candidates for BRCA2-associated centrosomal proteins by mass spectrometry. First, we isolated centrosome fraction from HeLa S3 cells by discontinuous sucrose gradient centrifuge. Immunoprecipitated centrosomal components with anti-BRCA2 antibody were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver staining. The protein bands specific to BRCA2 association were subjected to LC/MS/MS as summarized and identified as NPM (37 kDa), ROCK2 (160 kDa), and others (Fig. 1A, lane 3).

Association of NPM with BRCA2 in cells

We tested the interaction between NPM and BRCA2 *in vivo* by coimmunoprecipitation assay. Full-length FLAG-BRCA2 and HA-NPM were coexpressed in mammalian cultured cells. We utilized COS-7 cells in these experiments, as the expression of exogenous FLAG-BRCA2 was the most significant among various cell lines. Cells were collected 30 hours after transfection in 1% NP40 lysis buffer, and the lysates were immunoprecipitated either with anti-FLAG or anti-HA antibody. FLAG-BRCA2 was specifically coprecipitated with anti-HA antibody (Fig. 1B, the third panel, lane 3). Reversely, HA-NPM was specifically coprecipitated with anti-FLAG antibody (Fig. 1B, the sixth panel, lane 3). These results showed that FLAG-BRCA2 is bound to HA-NPM. To examine the interaction between endogenous BRCA2 and NPM *in vivo*, we immunoprecipitated either BRCA2 or NPM from COS-7 cell lysates. Anti-BRCA2 antibody coprecipitated NPM (Fig. 1C, bottom panel, lane 3), and anti-NPM antibody coprecipitated BRCA2 (Fig. 1D, bottom panel, lane 2). These results showed that the physical interaction of these 2 native proteins *in vivo*.

Association of ROCK2 with BRCA2 in cells

Because ROCK2 was detected as a candidate protein binding to BRCA2 in centrosomes, we also tested binding of these 2 proteins *in vivo*. First, COS-7 cells were transfected with an expression vector of full-length FLAG-BRCA2 or an empty vector, respectively. Cells were collected 30 hours after transfection, and the immunocomplex was precipitated with anti-FLAG or anti-ROCK2 antibody. FLAG-BRCA2 was specifically coprecipitated with anti-ROCK2 antibody (Fig. 2A, bottom panel, lane 1), and native ROCK2 was specifically coprecipitated with anti-FLAG antibody (Fig. 2B, bottom panel, lane 1). This indicated that FLAG-BRCA2 interacts with ROCK2. Next, we investigated the binding of endogenous BRCA2 and ROCK2. COS-7 cells were harvested, and the lysates were immunoprecipitated with anti-BRCA2 or anti-ROCK2 antibody (Fig. 2C and D). BRCA2 was specifically coprecipitated with anti-ROCK2 antibody (Fig. 2C, bottom panel, lane 2), and ROCK2 was specifically coprecipitated with anti-BRCA2 antibody (Fig. 2D, bottom panel, lane 2). These results showed that endogenous ROCK2 interacts with endogenous BRCA2.

Analysis of the NPM-binding region of BRCA2

To find out the NPM-interacting region of BRCA2, we further subcloned different segments of BRCA2 and had FLAG-S1 (1–1,000 amino acids), FLAG-S2 (967–2,133), and FLAG-S3 (2,093–3,418). Each of BRCA2 segment was coexpressed with HA-NPM in COS-7 cells. Immunoprecipitation with anti-FLAG or anti-HA antibody was carried out. FLAG-S1 BRCA2 was specifically coprecipitated with anti-HA antibody (Fig. 3B, bottom panel, lane 3), and HA-NPM was specifically coprecipitated with anti-FLAG antibody (Fig. 3C, bottom panel, lane 3). However, FLAG-S2 (967–2,133) or FLAG-S3 BRCA2 (2,093–3,418), and HA-NPM were not coprecipitated each other (Supplementary Fig. S1). These results showed that amino acids 1–1,000 of BRCA2 bind to NPM.

This segment was further separated into 3 smaller fragments: FLAG-R1 (1–157), FLAG-R2 (113–685), and FLAG-R3-1 (639–1,000). To investigate which fragment would bind to NPM, each was expressed in COS-7 cells, and immunoprecipitation with anti-FLAG antibody was carried out. NPM was specifically coprecipitated with FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000; Fig. 3D, bottom panel, lane 5). Therefore, it was suggested that NPM-binding region of BRCA2 is within the amino acid residues 639–1,000.

Inhibition of the association of endogenous NPM and BRCA2

In an attempt to clarify the significance of NPM–BRCA2 association further, we tried to inhibit the endogenous binding by physical competition. FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) was expressed in COS-7 cells, and the lysates were immunoprecipitated with anti-NPM or anti-BRCA2 antibody. Endogenous BRCA2 was not coprecipitated with anti-NPM antibody (Fig. 4A, bottom panel, lane 1), and endogenous NPM was not coimmunoprecipitated with anti-BRCA2 antibody (Fig. 4B, bottom panel, lane 1). These results suggested that exogenous expression of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) could prevent NPM from binding to BRCA2.

It was reported that NPM and ROCK2 have physical interaction (32), and our results discussed earlier showed that ROCK2 binds to BRCA2 (Fig. 2). We examined whether these interactions might be abrogated in the presence of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000). In summary, both association between NPM and ROCK2, and that between ROCK2 and BRCA2, were not inhibited by the expression of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000; Fig. 4C–F).

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

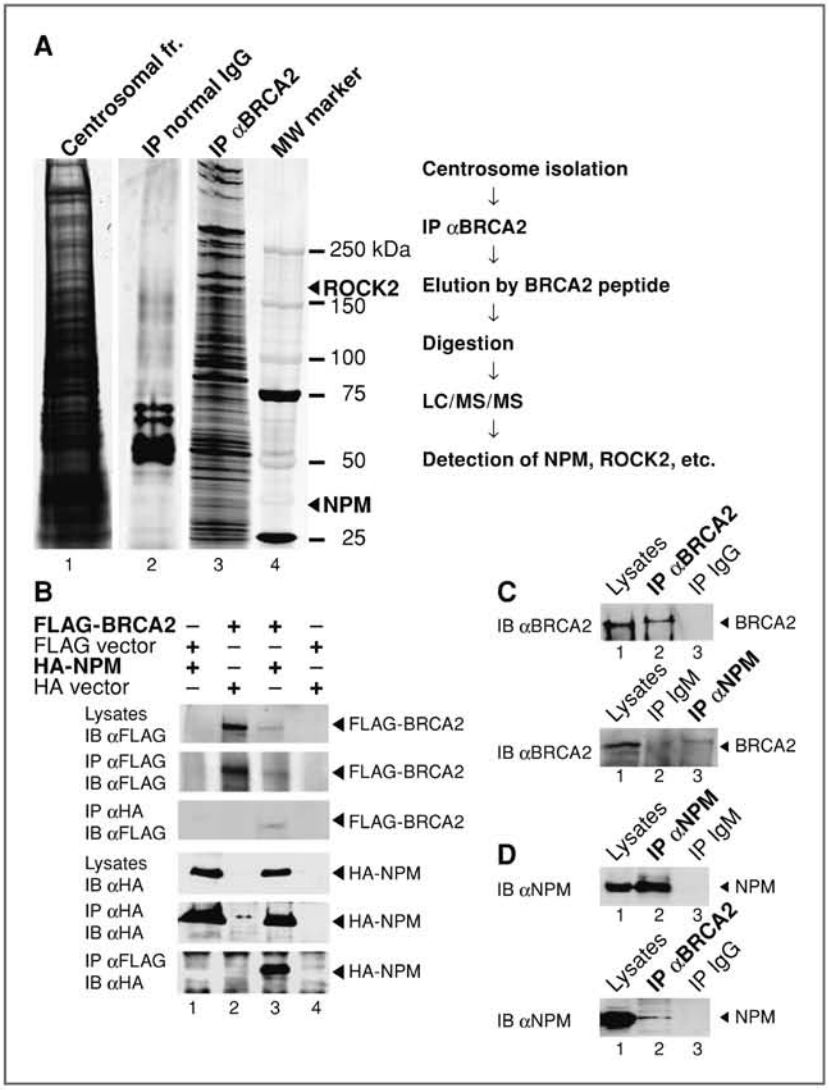


Figure 1. Identification of NPM and ROCK2 as candidates for BRCA2-associated centrosomal proteins and binding of NPM to BRCA2 *in vivo*. A, identification of NPM and ROCK2 as candidates for BRCA2-associated centrosomal proteins by immunoprecipitation and mass spectrometric screening. Centrosomes from HeLa S3 cells were isolated (lane 1), and the centrosomal components were immunoprecipitated with anti-BRCA2 antibody. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and visualized by silver staining (lane 3). The protein bands specific to BRCA2 association were analyzed with LC/MS/MS as summarized. Normal IgG did not precipitated NPM or ROCK2 (lane 2). B, *in vivo* physical interaction between exogenously expressed NPM and BRCA2. COS-7 cells were transiently cotransfected with the combinations of either a FLAG-BRCA2 expression vector or the empty one, and either an HA-NPM expression vector or the empty one. The cell lysates were immunoprecipitated with either anti-HA or anti-FLAG antibody, and the immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with either anti-FLAG (the top 3 panels) or anti-HA antibody (the bottom 3 panels). C and D, binding of endogenous NPM and BRCA2. C, the immunoprecipitates were detected with anti-BRCA2 antibody. Top, lysates from COS-7 cells (lane1) were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 antibody (lane 2) or normal mouse IgG (lane 3). Bottom, lysates (lane 1) were immunoprecipitated with either normal mouse IgM (lane 2) or anti-NPM antibody (lane 3). D, The immunoprecipitates were detected with anti-NPM antibody. Top, lysates from COS-7 cells (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-NPM antibody (lane 2) or normal mouse IgM (lane 3). Bottom, lysates (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 antibody (lane 2) or normal mouse IgG (lane 3). IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

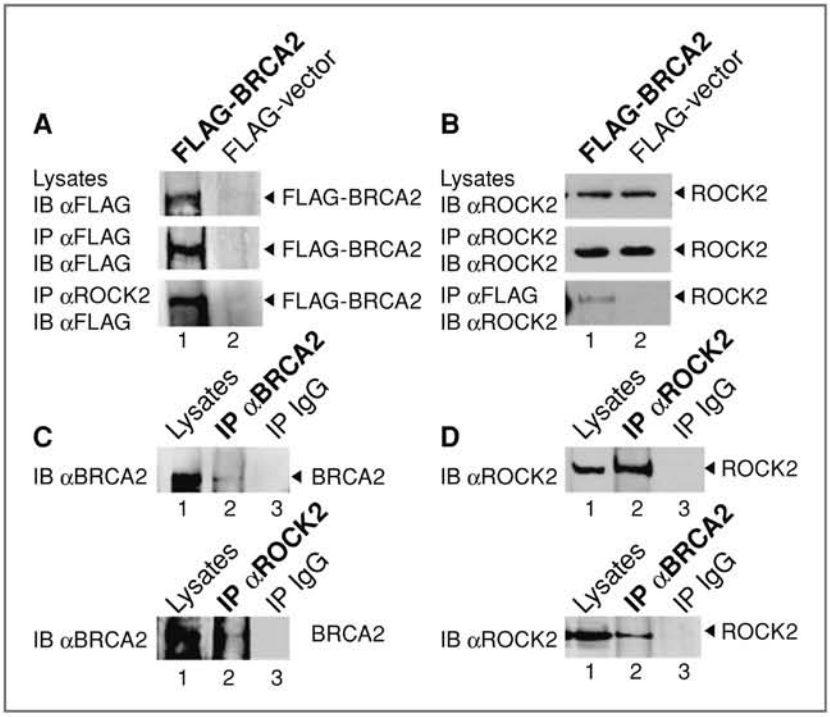


Figure 2. Binding of ROCK2 to BRCA2. A and B, binding of exogenous FLAG-BRCA2 and endogenous ROCK2. COS-7 cells were transiently transfected with either full-length FLAG-BRCA2 expression vector (lane 1) or the empty one (lane 2), respectively. A, The cell lysates (top), the immunoprecipitates with anti-FLAG (middle) and anti-ROCK2 antibodies (bottom) were analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. B, the cell lysates (top), the immunoprecipitates with anti-ROCK2 (middle) and anti-FLAG antibodies (bottom) were analyzed by immunoblotting with anti-ROCK2 antibody. C and D, binding of endogenous BRCA2 and ROCK2. C, the immunoprecipitates were detected with anti-BRCA2 antibody. Top, lysates from COS-7 cells (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 antibody (lane 2) or the normal mouse IgG (lane 3). Bottom, lysates (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-ROCK2 antibody (lane 2) or normal mouse IgG (lane 3). D, the immunoprecipitates were detected with anti-ROCK2 antibody. Top, lysates from COS-7 cells (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-ROCK2 antibody (lane 2) or the normal mouse IgG (lane 3). Bottom, lysates (lane 1) were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 antibody (lane 2) or normal mouse IgG (lane 3). IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

NPM is a substrate of Cdk2/cyclin E and its target is Thr199 (40). We tested whether NPM phosphorylation was changed by inhibiting NPM binding to BRCA2. Expression of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) did not affect NPM phosphorylation on Thr199 (Fig. 4G).

This NPM phosphorylation occurs in early S phase and causes NPM release from the centrosome (31). Costaining studies with NPM and γ-tubulin showed that NPM was absent in centrosomes in all S-phase cells expressing FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) as well as in those transfected with an empty vector (Supplementary Fig. S2A). NPM reassociates with centrosomes in M phase (33). It is apparently localized at centrosomes either in the presence or the absence of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000; Supplementary Fig. S2B). These results suggested that NPM localization in the cell cycle might not necessarily be affected by the interaction with BRCA2.

The NPM–BRCA2 interaction is required for the numerical integrity of centrosome

To see if the NPM–BRCA2 interaction is required for centrosome amplification, cells were observed by immunofluorescence microscopy when that interaction was inhibited (Fig. 5A). More cells had 3 or more centrosomes in 1 cell when NPM–BRCA2 interaction was abrogated, whereas the control cells had 2 centrosomes at maximum in 1 cell as in the untreated cells (Fig. 5Am–p). We investigated how the amplified centrosomes were generated by the inhibition of NPM–BRCA2 binding. Centrosomes were stained for both γ-tubulin and centrin. A normal centrosome has both γ-tubulin and centrin staining (Fig. 5Am–p). While the all abnormally amplified centrosomes in some cells had both γ-tubulin and centrin staining as a normal centrosome has (Fig. 5Ai–l), some centrosomes in more cells had γ-tubulin staining alone, without centrin (Fig. 5Aa–h, arrows). These results

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

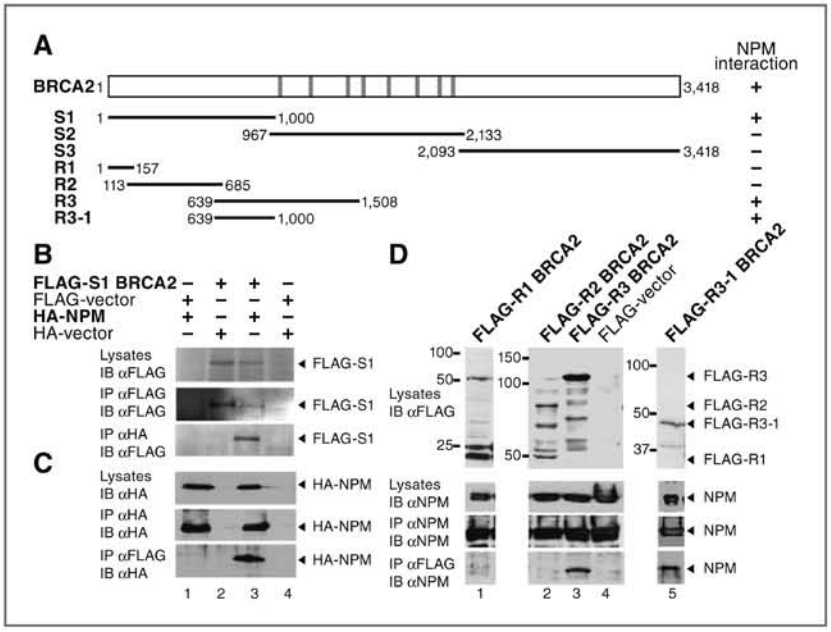


Figure 3. Identification of the binding regions of BRCA2 to NPM. A, diagram of the tested deletion mutants of BRCA2 (1–3,418 amino acids). Abilities to interact with NPM were examined in the following and summarized. The 8 shaded regions stand for BRC repeats, which are responsible for RAD51 binding. S1 BRCA2 (1–1,000) does not contain any BRC repeats. B and C, binding of exogenous FLAG-S1 BRCA2 to HA-NPM. COS-7 cells were cotransfected with the combinations of either a FLAG-S1 BRCA2 expression vector or the empty one, and either a HA-NPM expression vector or the empty one. B, the cell lysates (top) were immunoprecipitated with either anti-FLAG (middle) or anti-HA antibody (bottom). The samples were immunoblotted with anti-FLAG antibody. C, the cell lysates (top) were immunoprecipitated with either anti-HA (middle) or anti-FLAG antibody (bottom). The samples were immunoblotted with anti-HA antibody. D, binding of exogenous deletion mutants of BRCA2 to endogenous NPM. COS-7 cells were transiently transfected with expression vectors for either 4 segments (R1, R2, R3, and R3-1) of FLAG-BRCA2 or the empty one. Immunoprecipitates with anti-FLAG antibody were immunoblotted with anti-NPM antibody (bottom). The arrowheads (top) indicate FLAG-R1 (1–157; lane 1), FLAG-R2 (113–685; lane 2), FLAG-R3 (639–1,508; lane 3), and FLAG-R3-1 (639–1,000; lane 5) BRCA2, respectively. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

suggested that inhibition of NPM–BRCA2 association abrogated the numerical integrity of centrosome and the amplified centrosomes were generated by centrosome fragmentation and to lesser degrees by centrosome overduplication (Fig. 5B).

The NPM–BRCA2 interaction is critical for genomic stability

We further examined the nucleus profiles by immunofluorescence microscopy (Supplementary Fig. S3). A significantly higher fraction of multinucleated cells was observed when NPM–BRCA2 interaction was abrogated (Fig. 5C). These findings suggested that the inhibition of NPM binding to BRCA2 leads to supernumerary centrosomes, which could induce the formation of multipolar spindles and aneuploidy.

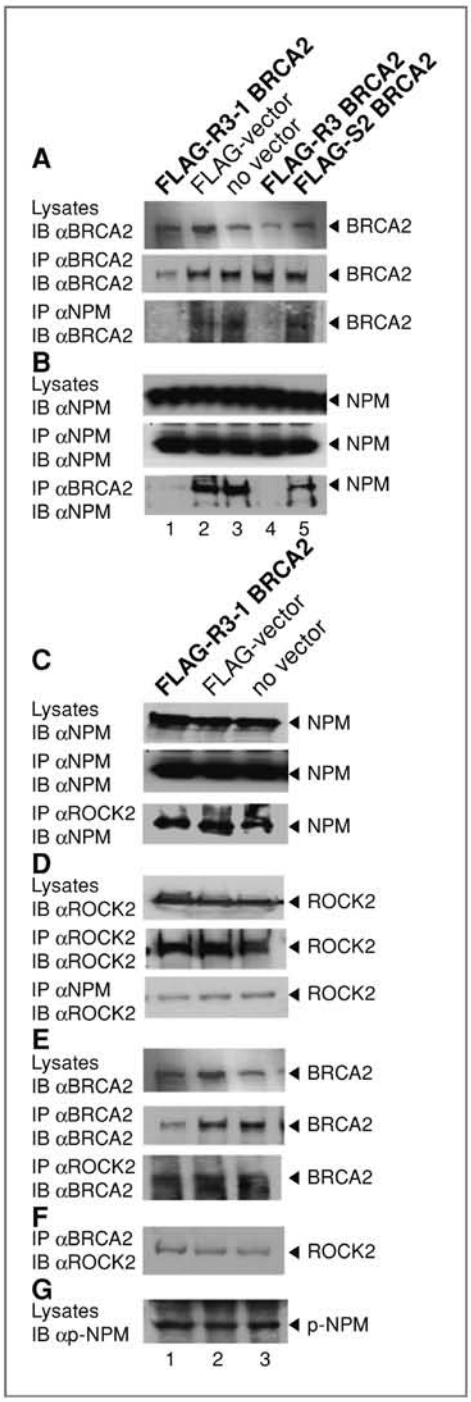
Discussion

In an attempt to determine the biological significance of BRCA2 on centrosomal duplication and hereditary breast cancer, we isolated centrosomes and identified NPM and ROCK2 as BRCA2-associated proteins. Among many candidates coimmunoprecipitated with BRCA2, we selected these 2 candidates for further analyses, as we have shown that BRCA2 has a function in centrosomes (9) and NPM and ROCK2 were also already shown to have a function in the regulation of centrosome duplication (32). We showed that endogenous NPM and ROCK2 bind to BRCA2 *in vivo*. While the association of BRCA2 with NPM and ROCK2 has not been previously reported, some functions of NPM and ROCK2 in centrosomes were shown to overlap with those of BRCA2. For example, BRCA2 is a substrate of Crm1 and localizes to centrosomes during G_1 phase to early M phase. Dysfunction of BRCA2 in centrosomes causes abnormal cell division, leading to multicentrosomal and multinucleated cells (9, 10). NPM is also a substrate of Crm1 (30) and is associated with unduplicated centrosome (31). ROCK2 is a Rho effector kinase and a centrosomal protein that physically interacts with NPM and copromotes centrosome duplication (32).

How BRCA2 regulates centrosome duplication together with NPM remained to be elucidated. We attempted to inhibit NPM binding to endogenous BRCA2 to show the functional significance of this binding. Because interference by RNAi

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030



usually leads to the depletion of mRNA expression and suppression of all functions of a target gene in cells, it is difficult to see which ability of the target gene is responsible for the aberrant centrosome amplification. Therefore, we employed physical competition to prevent NPM from binding to endogenous BRCA2 by exogenous expression of a small region of BRCA2 that interacts with NPM. We first determined that NPM-binding site localized to a region between amino acid resides 639–1,000 of BRCA2. Because negative control fragment of 967–2,133 did not bind to NPM (Supplementary Fig. S1A and B) and its expression could not interfere with NPM–BRCA2 binding (Fig. 4A and B, lane 5), actual binding region might be narrowed to 639–966. An exogenous overexpression of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) suppressed NPM–BRCA2 association but did not disturb the interactions between NPM–ROCK2 or BRCA2–ROCK2. This would suggest that the binding sites on NPM to BRCA2 and ROCK2 as well as those on BRCA2 to NPM and ROCK2 might be located in different regions. It also implies that BRCA2, NPM, and ROCK2 might form trimers, though a single-molecule analysis may be required to prove this hypothesis. The numerical integrity of centrosomes was observed by immunofluorescence microscopy. The results showed that physical inhibition of NPM–BRCA2 interaction in cells could lead to an amplification of centrosome numbers and a high frequency of multinucleated cells. This showed that NPM–BRCA2 interaction is required for maintenance of numerical integrity of centrosomes, whose abrogation could result in supernumerary centrosomes. Unrestricted centrosome amplification would induce genomic instability, which could facilitate tumorigenesis. Loss of association between NPM and BRCA2 might play an important role in familial breast carcinogenesis.

Detailed molecular mechanism of NPM and BRCA2 for centrosome regulation remains undefined. Centrosome duplication is also controlled by Ran-Crm1 network and their substrates, such as BRCA1, BRCA2, NPM, p53, and other NES-containing proteins (30). It would be hypothesized that NPM and/or BRCA2 could not associate with Crm1 when NPM–BRCA2 interaction was abrogated.

Figure 4. Inhibition of binding between endogenous NPM and BRCA2 by FLAG-R3-1 BRCA2. A and B, COS-7 cells were transiently transfected with expression vectors for either 3 segments (R3-1, R3, and S2) of FLAG-BRCA2 or the empty one. A, the cell lysates were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 or anti-NPM antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-BRCA2 antibody. B, the cell lysates were immunoprecipitated with either anti-NPM antibody or anti-BRCA2 antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-NPM antibody. C–G, COS-7 cells were transiently transfected with either FLAG-R3-1 BRCA2 or the empty vector. C, the cell lysates were immunoprecipitated with either anti-NPM antibody or anti-ROCK2 antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-NPM antibody. D, the cell lysates were immunoprecipitated with either anti-ROCK2 or anti-NPM antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-ROCK2 antibody. E, the cell lysates were immunoprecipitated with either anti-BRCA2 or anti-ROCK2 antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-BRCA2 antibody. F, the cell lysates were immunoprecipitated with anti-BRCA2 antibody, and the immunoprecipitates were immunoblotted with anti-ROCK2 antibody. G, the cell lysates were immunoblotted with anti–p-NPM (Thr199) antibody. IB, immunoblotting; IP, immunoprecipitation.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

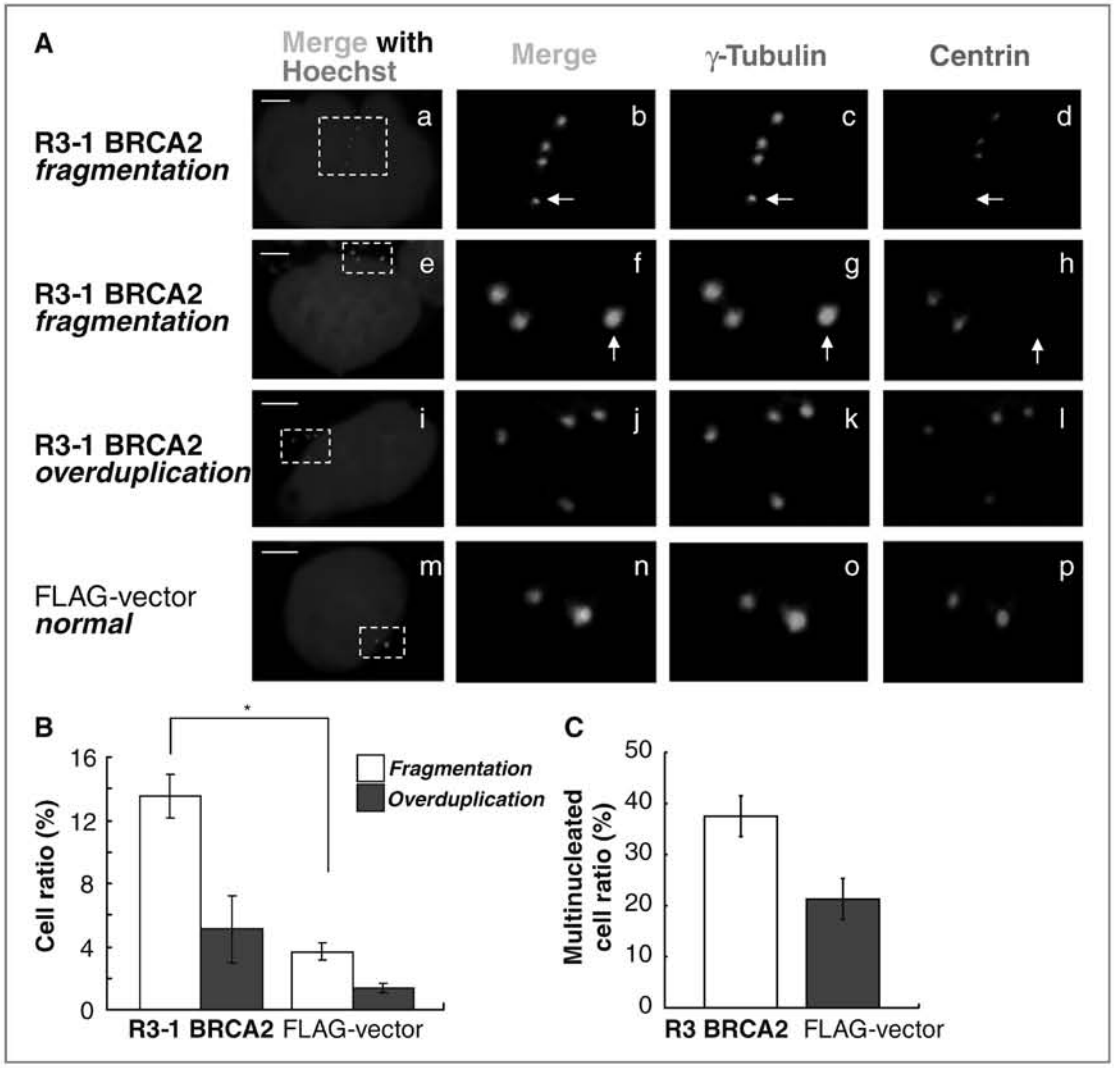


Figure 5. Types of abnormal amplification of centrosomes by inhibiting interaction between endogenous BRCA2 and NPM. A and B, COS-7 cells were transfected with a FLAG-R3-1 BRCA2 expression vector or the empty one. A, the cells were stained for γ-tubulin (green), centrin (red), and DNA (blue). The arrows indicate γ-tubulin staining without centrin. Bar, 5 μm. B, the percentage of the transfected cells that had either centrosome fragmentation or overduplication was plotted. At least 325 cells were quantified. Columns, averages ± standard errors from 3 independent experiments. *, $P = 0.034$ (Mann–Whitney *U* test). C, COS-7 cells were transfected with either a FLAG-R3 BRCA2 expression vector or the empty one. The percentage of multinucleated cells was plotted. At least 321 cells were quantified. Columns, averages ± standard errors from 3 independent experiments.

It was reported that ROCK2 has a high affinity with NPM in centrosomes in late G_1 phase and coregulates the initiation of centrosome duplication (32). NPM is associated with unduplicated centrosome as a target of Cdk2/cyclin E. BRCA2 localizes to the centrosome during G_1 phase to early M phase (12). Taken together with our present data, it would be hypothesized that NPM, ROCK2, and BRCA2 form a complex to maintain integrity of centrosome duplication and genomic stability (Fig. 6).

We showed that NPM-binding region of BRCA2 localized within 639–1,000 amino acids. Other molecular function of this region has not been reported, whereas a lot of missense mutations in this region in the hereditary breast and/or ovarian cancer families were reported (Breast Cancer Information

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

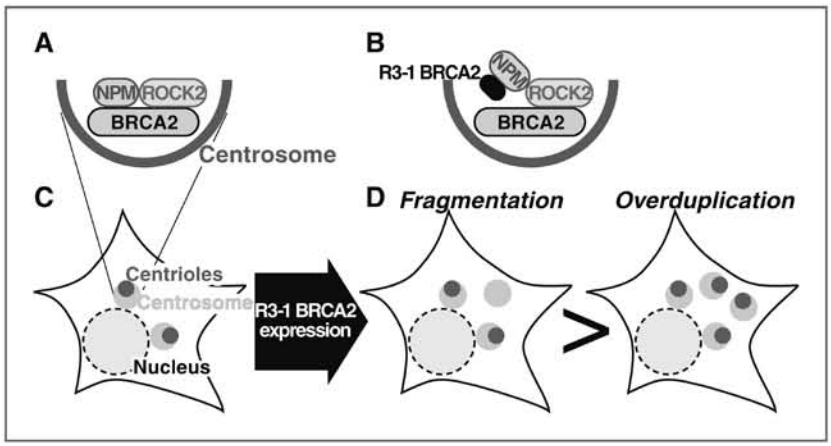


Figure 6. Model of abnormal centrosome amplification by abrogation of NPM–BRCA2 interaction. An exogenous overexpression of FLAG-R3-1 BRCA2 (639–1,000) dissociates endogenous NPM from BRCA2 (B). Under this condition, centrosome duplication is not correctly regulated and centrosome fragmentation and overduplication occur (D). The former happens more.

Core). Interactions between NPM and BRCA2 might be suppressed by these mutations. Our findings would help to elucidate the molecular mechanism of carcinogenesis in these cancers.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgment

We thank Dr. Kiyotsugu Yoshida for providing comments on this work.

Grant Support

Japan Society for the Promotion of Science and Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (no. 17013027, Y. Miki; no. 21790311, K. Takenaka).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must, therefore, be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 8, 2010; revised October 22, 2010; accepted November 4, 2010; published OnlineFirst November 16, 2010.

References

1. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994;266:66–71.
2. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 1995;378:789–92.
3. Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. Nature 1997;386:804–10.
4. Chen J, Silver DP, Walpita D, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. Mol Cell 1998;2:317–28.
5. Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltmann M, Kouzarides T. Transcriptional activation functions in BRCA2. Nature 1997;386:772–3.
6. Daniels MJ, Wang Y, Lee M, Venkitaraman AR. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. Science 2004;306:876–9.
7. Tian XX, Rai D, Li J, et al. BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1. Cancer Res 2005;65:4747–53.
8. Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D, et al. Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. Curr Biol 1999;9:1107–10.
9. Nakanishi A, Han X, Saito H, et al. Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. Biochem Biophys Res Commun 2007;355:34–40.
10. Han X, Saito H, Miki Y, Nakanishi A. A CRM1-mediated nuclear export signal governs cytoplasmic localization of BRCA2 and is essential for centrosomal localization of BRCA2. Oncogene 2008;27:2969–77.
11. Doxsey S. Duplicating dangerously: linking centrosome duplication and aneuploidy. Mol Cell 2002;10:439–40.
12. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? Nat Rev Cancer 2002;2:815–25.
13. Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP, et al. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. Mol Cell Biol 2003;23:5282–92.
14. Keryer G, Di Fiore B, Celati C, et al. Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. Mol Biol Cell 2003;14:4260–71.
15. Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. J Biol Chem 2004;279:35726–34.
16. Tsou MF, Wang WJ, George KA, Uryu K, Stearns T, Jallepalli PV. Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. Dev Cell 2009;17:344–54.
17. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. Science 1996;271:1744–7.
18. Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G. Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. Science 1999;283:851–4.
19. Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. Nat Cell Biol 1999;1:88–93.
20. Adon AM, Zeng X, Harrison MK, et al. Cdk2 and Cdk4 regulate the centrosome cycle, and are critical mediators of centrosome amplification in p53-null cells. Mol Cell Biol 2010;30:694–710.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst November 16, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030

21. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell 1989;56:379–90.
22. Yun JP, Chew EC, Liew CT, et al. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. J Cell Biochem 2003;90:1140–8.
23. Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. Nucleic Acids Res 1995;23:3974–9.
24. Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. Biochim Biophys Acta 1985;826:167–73.
25. Palaniswamy V, Moraes KC, Wilusz CJ, Wilusz J. Nucleophosmin is selectively deposited on mRNA during polyadenylation. Nat Struct Mol Biol 2006;13:429–35.
26. Tarapore P, Shinmura K, Suzuki H, et al. Thr199 phosphorylation targets nucleophosmin to nuclear speckles and represses pre-mRNA processing. FEBS Lett 2006;580:399–409.
27. Okuwaki M, Iwamatsu A, Tsujimoto M, Nagata K. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for *in vitro* replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. J Mol Biol 2001;311:41–55.
28. Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A, Adam SA, Wingfield PT, Olson MO. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. Biochemistry 1997;36:3941–9.
29. Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. Protein Sci 1999;8:905–12.
30. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. Nat Cell Biol 2005;7:823–30.
31. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. Cell 2000;103:127–40.
32. Ma Z, Kanai M, Kawamura K, Kaibuchi K, Ye K, Fukasawa K. Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. Mol Cell Biol 2006;26:9016–34.
33. Zatsepina OV, Rousselet A, Chan PK, Olson MO, Jordan EG, Bornens M. The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. J Cell Sci 1999;112:455–66.
34. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROKα is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. Mol Cell Biol 1996;16:5313–27.
35. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. EMBO J 1996;15:2208–16.
36. Yoneda A, Multhaupt HA, Couchman JR. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. J Cell Biol 2005;170:443–53.
37. Tanaka T, Nishimura D, Wu RC, et al. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. J Biol Chem 2006;281:15320–9.
38. Moudjou M, Bornens M. Isolation of centrosomes from cultured animal cells. In: Celis JE, editor. Cell Biology: A Laboratory Handbook. San Diego, CA: Academic Press; 1994. p. 595–604.
39. Nishikawa H, Ooka S, Sato K, et al. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. J Biol Chem 2004;279:3916–24.
40. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr199 by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. J Biol Chem 2001;276:21529–37.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on February 8, 2011
Copyright © 2011 American Association for Cancer Research

MEMO

分子生物学分野

石野 史敏

難治疾患研究所・ゲノム応用医学研究部門
分子生物学・教授

1） 研究の課題名

レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群の個体発生・生殖機構における役割

Functions of mammalian-specific retrotransposon-derived genes in mammalian development and reproduction

哺乳類はヒトおよびマウスを含む真獣類、カンガルーやコアラなどの有袋類、カモノハシなどの単孔類の3つのグループに分かれる。そのうち、前二者が胎生、後者が卵生の生殖機構を採用している。われわれはレトロトランスポゾン由来で胎盤形成を介して個体発生に必須の役割をはたすPeg10は真獣類と有袋類のみに共通して保存される、新規獲得遺伝子であることを報告してきた（Ono et al. Genomics 2001, Nat Genet 2006）。また、これと同じsushi-ichiレトロトランスポゾンに由来すると考えられるPeg11/Rtl1も胎盤機能に必須の獲得遺伝子であり（Sekita et al. Nat Genet 2008）、他の研究者の解析からこれは真獣類特異的遺伝子であると考えられている。

哺乳類のゲノムの更なる解析から、sushi-ichiレトロトランスポゾンに由来すると考えられる遺伝子群が、Peg10、Peg11以外に9個存在することがわかり、それらをSirh family（sushi-ichi retrotransposon homologues）遺伝子群と命名し、ノックアウトマウスの解析から哺乳類の個体発生や生殖機構への関与を解析している。これまでにSirh3、Sirh7、Sirh11のノックアウトマウスが完成し、Sirh7に関しては胎盤の3層構造の形成に必須な機能をもつことを明らかにしている。胎盤以外に母親側の機能に関係するかどうかを現在解析している（Naruse et al. 論文準備中）。

体細胞クローニング技術の低い成功率の原因はX染色体不活性化の異常にある

Abnormal gene expression from X chromosome leads to early embryonic lethality in somatic cloned mice.

体細胞クローン技術はiPS細胞作製技術どうよう将来の再生医療を大きく変える可能性を秘めている。この技術をヒトに応用するためには、女性から採取した未受精卵を必要とすることから大きな倫理的な問題はあるが、少なくともヒトクローンES細胞を作る事に関しては、法的な整備は済んでいる。一方、技術的な問題としてあげられるのが、2〜3%という低い成功率の問題であり、トリコスタチンを加えて成功率が上昇したという報告以外に、大きな進展はみられていなかった。今回、理化学研究所バイオリソースセンターの小倉淳郎室長のグループとの共同研究で、この低い成功率の原因が性染色体であるX染色体の全域に渡る遺伝子発現低下にあることを明らかにした（図）。これは、メスで2本あるX染色体のうち片側を不活性化する機構であるX染色体不活性化が、メスでは2本ともに起こり、1本しかないオスにおいてもそれが起きていることを推測させた。そこでX染色体不活性化をひき起すXist遺伝子をノックアウトしたマウスから体細胞クローンマウスを作製したところ、成功率を約8倍上昇させることに成功した（Inoue et al. Science 2010）。X染色体不活性化は哺乳類特異的なエピジェネティック機構であり、これが体細胞クローン作製に大きな影響を与えていたことが明らかになった。

2)

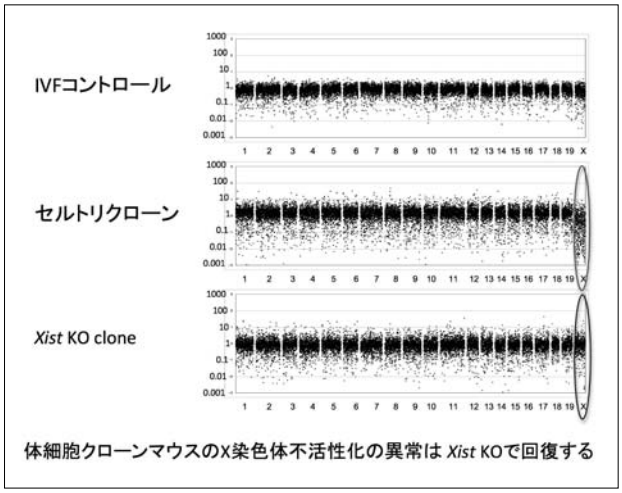


図　: 体細胞クローンのX染色体不活性化異常はXist KOで回復する
説明: 着床前の胚における網羅的遺伝子解析。常染色体1-19上およびX染色体上に存在する遺伝子の発現量の比を表している。中央の1のラインが正常値。セルトリ細胞から作製したクローンではX染色体上の遺伝子の発現が全体的に低下している（赤の囲い）。一方、Xist遺伝子をKOしたマウスのセルトリ細胞から作製したクローンでは、それらの発現は回復している（青の囲い）。
上段: 体外受精（IVF）のコントロール。
中段: セルトリ細胞から作製したクローン
下段: Xist遺伝子をKOしたマウスのセルトリ細胞から作製したクローン

3) 研究内容についての英文要約

The X-linked imprinted gene family Fthl17 shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos

Differences between male and female mammals are initiated by embryonic differentiation of the gonad into either a testis or an ovary. However, this may not be the sole determinant. There are reports that embryonic sex differentiation might precede and be independent of gonadal differentiation, but there is little molecular biological evidence for this. To test for sex differences in early-stage embryos, we separated male and female blastocysts using newly developed non-invasive sexing methods for transgenic mice expressing green fluorescent protein and compared the gene-expression patterns. From this screening, we found that the Fthl17 (ferritin, heavy polypeptide-like 17) family of genes was predominantly expressed in female blastocysts. This comprises seven genes that cluster on the X chromosome. Expression analysis based on DNA polymorphisms revealed that these genes are imprinted and expressed from the paternal X chromosome as early as the two-cell stage. Thus, by the time zygotic genome activation starts there are already differences in gene expres- sion between male and female mouse embryos. This discovery will be important for the study of early sex differentiation, as clearly these differences arise before gonadal differentiation.

Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals

The evolution of two mammalian-specific traits, viviparous reproduction with a placenta and genomic imprinting, have been addressed by multiple studies of two retrotransposon derived, mammalian-specific genes. These gene targeting experiments in mice, together with recent comparative genomic analyses among three mamma- lian groups, suggest that extremely rare events; namely exaptations from retrotransposons, made crucial contri- butions to the establishment and diversification of mammals via placental formation. We propose that nearly neutral evolution, as well as Darwinian evolution (natural selection), plays an important role in the exaptation pro- cess. Comparative genomic analysis of various imprinted regions has also revealed that an imprinting control element essential for parent-of-origin specific monoallelic expression of imprinted genes emerged in each of the imprinted regions, possibly by the insertion of exogenous DNAs, such as retrotransposons. In both cases, DNA methylation in germ cells must have been of critical importance to repress the exogenous DNAs inserted into the genomes of mammalian ancestors. We propose that the ability of germ line DNA methylation enabled the emergence of certain mammalian-specific features during the course of evolution.

Impeding Xist Expression from the Active X Chromosome Improves Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer

Cloning mammals by means of somatic cell nuclear transfer (SCNT) is highly inefficient because of erroneous reprogramming of the donor genome. Reprogramming errors appear to arise randomly, but the nature of nonrandom, SCNT-specific errors remains elusive. We found that Xist, a noncoding RNA that inactivates one of the two X chromosomes in females, was ectopically expressed from the active X (Xa) chromosome in cloned mouse embryos of both sexes. Deletion of Xist on Xa showed normal global gene expression and resulted in about an eight- to ninefold increase in cloning efficiency. We also identified an Xist-independent mechanism that specifically down-regulated a subset of X-linked genes through somatic-type repressive histone blocks. Thus, we have identified nonrandom reprogramming errors in mouse cloning that can be altered to improve the efficiency of SCNT methods.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

拠点内の共同研究の推進により、研究に新たな展開を盛り込む事が可能になった。

B（研究教育環境）

独立した研究者をめざす優秀なポスドク（GCOE特任講師）が研究室におり頑張っている姿をみせることは、大学院生に自分の将来を考える上で重要なロールモデルとなっている。

C（人材確保）

将来性の高い研究者をGCOE特任講師として採用できた。さきがけ研究にも選ばれており、若い大学院生に良い影響をあたえている。

D（人材育成）

採用したGCOE特任講師には、施設、機器などの利用に便宜をはかり、自身の研究に専念してもらえる環境を提供している。また、将来、独立して研究室を運営できるよう、研究の将来構想や学生の指導法や研究室運営の仕方などについても相談にのっている。

E（国際化）

博士課程の大学院生には、国際共同研究で1－3ヶ月海外に滞在して研究できる機会を与えていた。また、相手国からも大学院生を受け入れていた。本拠点には外国人大学院生が多くいるため、国際化はスムーズに展開できるようになると考えている。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

指導している大学院生にとって自分の研究者としての将来を考える上で良い経験を得られる環境を作ること。大学院生のそれぞれの個性を伸ばすため、個別研究指導をすることは当然として、研究者としての経歴にはいろいろな選択肢が存在することを理解させる事は重要である。本制度GCOEのポスドク、テニュアトラック（MTT）のポスドク、大型研究費によるポスドクなどが、研究所内にいることで、大学の正規の助教ポストだけでなく自分の将来の選択の幅を知ることが可能になった。

6）英文原著論文

Kobayashi, S., Fujihara, Y., Mise, N., Kaseda, K., Abe, K., Ishino, F. and Okabe, M. The X-linked imprinted gene family Fthl17 shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos. Nuc Acids Res 38（11）, 3672-3681（2010）.

Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F. Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals. Develop Growth Differ 52（6）, 533-543（2010）.

Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., Sawai, K., Otte, A. P., Tian,X. C., Yang, X., Ishino, F. Abe, K. and Ogura, A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell cloning. Science 330（6003）, 496-499（2010）.

7）著書

石野史敏　ゲノムインプリンティング　炎症と免疫 18（1）109-111（2010）.

石野史敏、金児-石野知子　インプリンティングとその分子機構　Frontier in Gynecology 17（4）11-16（2010）.

石野史敏　哺乳類の体の大きさ 細胞工学　29（12）, 1272-1275（2010）.

8）特許取得、特許申請

発明の名称:クローン動物の作出方法
出願番号:特願2010-197583（出願日:2010年9月3日）
出願人:独立行政法人理化学研究所、国立大学法人岩手大学、国立大学法人東京医科歯科大学

9）平成22年度までの自己評価

体細胞クローニングにおける成功率の低さが、X染色体上のインプリント遺伝子Xistの異所発現によるX染色体全体に渡る遺伝子発現異常が原因であることを示せたことは、エピジェネティクス研究の中で重要な意味を持っていると考えている。また、Peg11/Rtl1の発現量の増減による胎盤形成異常や骨格形成異常を胎盤経由の遺伝子導入により制御する実験系が確立しつつあり、将来の遺伝子治療の糸口が見えてきている。

10）学会発表（英文）

1. Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of mammalian viviparity and genomic imprinting by retrotransposons. NAIST Global COE International Symposium 2010 Plasticity in Development and Evolution November 11-12, 2010（NAIST Millennium

Hall）.

2. Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Contribution of Retrotransposons to Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals. The 8th Okazaki Bioloby Conference "Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics -" March 25-29（Okazaki, Aichi）.

11）学会発表（和文）

1）岩崎佐和、幸田尚、金児—石野知子、石野史敏　レトロトランスポゾン由来の遺伝子群Pnma-familyにおけるインプリンティングの検証 BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

2）遠藤大輔、関田洋一、金児—石野知子、石野史敏　Peg11/Rtl1とそのアンチセンスRNAにコードされるmicroRNAは独立した経路で協調的に働きマウスの発生に必須な役割を果たす　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

3）岩舩浩孝、入江将仁、成瀬美衣、幸田尚、小野竜一、石野史敏、金児—石野知子　sushi-ichiレトロトランスポゾン由来の遺伝子Sirh11の個体での役割　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

4）入江将仁、成瀬美衣、幸田尚、小野竜一、石野史敏、金児—石野知子　sushi-ichiレトロトランスポゾン由来の遺伝子Sirh3の機能解析　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

5）成瀬美衣、日野敏昭、赤塚明、幸田尚、中村健司、横山峯介、小野竜一、金児—石野知子、石野史敏　レトロトランスポゾン由来の遺伝子Sirh7の胎盤発生における役割　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

6）幸田尚、越後貫成美、井上貴美子、古瀬民生、金田秀貴、鈴木智広、金児—石野知子、若山照彦、若菜茂晴、小倉淳郎、石野史敏　顕微授精によって誘導されるマウスの遺伝子発現変化　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

7）渡辺久子、小野由美子、幸田尚、石野史敏、入江将仁、金児—石野知子　胎仔期低栄養暴露が与える遺伝子発現への影響　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポートアイランド）。

12）外部資金の獲得状況

1. 日本学術振興会 学術創成研究
研究課題「ゲノム刷込みに関連する哺乳類特異的遺伝子群の個体発生・系統発生における役割」
研究期間　平成18年度～平成22年度（5年間）
総額　415,090千円

2. 日本学術振興会　日豪二国間共同研究
研究課題「有袋類におけるゲノムインプリンティングの解析」
研究期間　平成21年度～平成22年度（2年間）
平成22年度分　2,450千円

13）特別講演、招待講演

1）石野史敏　哺乳類における胎生・ゲノムインプリンティングの獲得とレトロトランスポゾンの寄与について　北海道大学グローバルCOE物質科学イノベーション講演会　　平成22年5月11日　（北海道大学）.

2）石野史敏　体細胞クローニング技術や生殖補助医療におけるエピジェネティックな課題　　東大医科研大学院セミナー　　平成22年6月14日（東京大学医科学研究所）.

3）石野史敏　哺乳類における胎生とゲノムインプリンティングの進化とレトロトランスポゾン　首都大学東京セミナー　平成22年6月25日（首都大学東京）.

4）石野史敏、金児—石野知子　哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン　第19回三木成夫記念シンポジウム　平成22年7月21日（鶴見大学講堂）.

5）石野史敏　哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン　第18回日本胎盤学会・第28回絨毛性疾患研究会　教育講演　平成22年10月1日（ホテル日航熊本）.

6）石野史敏　体細胞クローン動物とエピジェネティクス　Human Science財団勉強会　平成22年10月13日（Human Science財団本部）.

7）Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of mammalian viviparity and genomic imprinting by retrotransposons. NAIST Global COE International Symposium 2010 Plasticity in Development and Evolution November 11-12, 2010（NAIST Millennium Hall）.

8）石野史敏　ゲノムインプリンティング制御　大阪大学蛋白研セミナー　平成22年11月19－20日（大阪大学）

9）石野史敏　ゲノムインプリンティング:ほ乳類におけるその生物学的意義　　第21回フォーラム・イン・ドージン　エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ　平成22年11月26日　（ホテルキャッスル熊本）

10）Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Contribution of Retrotransposons to Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals. The 8th Okazaki Bioloby Conference "Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics -" March 25-29（Okazaki, Aichi）.

14）主催学会

The 8th Okazaki Biology Conference "Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics -" March 25-29, Institute of Basic Biology, Okazaki, Aichi.

15）GCOE総合講義

近年急速に発展しているエピジェネティクス分野は、多くの分野を取り込むことによって、その意味するところも大きく広がってきている。そこでエピジェネティクス研究の歴史を解説しながら、新旧のエピジェネティクスの定義、遺伝学から見た定義と発生生物学からの定義の違いなどについて説明することにより、現在のエピジェネティクスの全体像と方向性を理解してもらうことを試みた。また、哺乳類の体細胞クローン技術において、成功率の低さが哺乳類特異的なエピジェネティック機構であるX染色体の不活性化機構の乱れであるという最先端の内容について解説した。

エピジェネティクスは遺伝学の観点から見れば、メンデルの遺伝法則の例外事項となるDNA配列の変化を伴わない遺伝学を扱う学問分野のことである。一方、発生生物学的には、個体発生にみられるように、一つの受精卵から多様な細胞が生み出されてくる、すなわち同一の遺伝子組成をもつ細胞の示す形態的・機能的多様性を扱う学問分野である。どちらもその分子機構はDNAメチル化、ヒストンの修飾、染色体構造の変化、RNAi機構などの共通性をもち、ゲノム情報からゲノム構造の変化を介して遺伝子発現（ゲノム機能）を制御する機構の一つとしてとらえることができる。

16）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには　○印）のリスト

准教授	幸田　尚
助教	小野　竜一
MTT特任講師	小林　慎
GCOE特任講師	李　知英
特任助教	遠藤　大輔
特任助教	成瀬　美衣
特任助教	岩舩　浩孝
大学院生D3	松本　和也
大学院生D2	岩崎　佐和
大学院生D2	石井　雅之
大学院生D1	○山口　祐季
大学院生M2	及川　真実
大学院生M2	高橋　沙央里

17）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など

英語での講義が、日本人大学院生にはまだ負担になっているように思うが、英語でのプレゼンテーションの演習などが準備されたことにより、積極的に関わっている学生には良い環境が整ってきたと感じている。また、若手研究者支援としてGCOEで雇用した特任講師の将来のキャリアーについては、今後充分考えて行く必要があると考えている。

Development, Growth & Differentiation
The Japanese Society of Developmental Biologists

Develop. Growth Differ. (2010) **52**, 533–543 doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01194.x

Review Article

Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals

Tomoko Kaneko-Ishino[1] and Fumitoshi Ishino[2,*]

[1]*School of Health Sciences, Tokai University, Bohseidai, Isehara-shi, Kanagawa, 259-1193, Japan,* [2]*Department of Epigenetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8510, Japan*

The evolution of two mammalian-specific traits, viviparous reproduction with a placenta and genomic imprinting, have been addressed by multiple studies of two retrotransposon derived, mammalian-specific genes. These gene targeting experiments in mice, together with recent comparative genomic analyses among three mammalian groups, suggest that extremely rare events; namely exaptations from retrotransposons, made crucial contributions to the establishment and diversification of mammals via placental formation. We propose that nearly neutral evolution, as well as Darwinian evolution (natural selection), plays an important role in the exaptation process. Comparative genomic analysis of various imprinted regions has also revealed that an imprinting control element essential for parent-of-origin specific monoallelic expression of imprinted genes emerged in each of the imprinted regions, possibly by the insertion of exogenous DNAs, such as retrotransposons. In both cases, DNA methylation in germ cells must have been of critical importance to repress the exogenous DNAs inserted into the genomes of mammalian ancestors. We propose that the ability of germ line DNA methylation enabled the emergence of certain mammalian-specific features during the course of evolution.

Key words: genomic imprinting, mammalian evolution, placenta, retrotransposon, viviparity.

Introduction: uniqueness of mammals

Viviparity

Viviparity is one of the most familiar characteristics of therian mammals, eutherians and marsupials, which diverged from oviparous prototherian mammals, the monotremes, an estimated 166 million years ago (Warren *et al.* 2008; Renfree 2010). The placenta is a novel evolutionary organ essential for viviparous reproductive systems: it supplies nutrients and oxygen to developing fetuses. The eutherians and the marsupials adopt different reproductive strategies: the former usually give birth to precocial young after a long gestation, while the latter deliver relatively tiny altricial young after a short gestation. Marsupial young then continue to develop attached to the teat in the mother's pouch during a long lactation (Renfree *et al.* 2009). Interestingly, the placental structure differs between eutherians and marsupials: a chorioallantoic placenta and a choriovitelline placenta (yolk sac placenta), respectively. It is reasonable to hypothesize that the difference in placental performance (such as efficiencies of nutrient and gas exchange) led to the diversification of the two viviparous mammalian groups during evolution. The question then arises: What essential mechanisms played roles in the emergence of the placenta and placental diversification? Placental evolution, in addition to its relation with emergent reproductive systems, may be the key to understanding the evolutionary history of mammals.

Genomic imprinting

Genomic imprinting is an epigenetic mechanism that regulates parent-of-origin specific monoallelic expressions of a certain set of genes, known as "imprinted genes." Among vertebrates it appears to be unique to therian mammals (Lewis & Reik 2006, Barlow &

*Author to whom all correspondence should be addressed.
Email: fishino.epgn@mri.tmd.ac.jp
Received 21 February 2010; revised 23 May 2010; accepted 23 May 2010.
© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

Bartolomei 2007). Genomic imprinting results in functional differences between paternally- and maternally-inherited chromosomes (genomes) in diploid somatic cells. More than 80 imprinted genes, both paternally expressed genes (*Peg*) and maternal expressed genes (*Meg*), have been identified in humans and mice. They usually form imprinted gene clusters on certain chromosomal regions, known as imprinted regions. More than 10 imprinted regions exist in mice and their paternal and/or maternal duplications (disomies) induce unique and differential imprinting effects in a region-specific manner, such as lethality at various developmental stages, as well as growth and/or behavior abnormalities (Beechey *et al.* 2005).

Genomic imprinting also causes parthenogenetic and androgenetic death: parthenogenetic embryos that have two maternally-inherited genomes exhibit early embryonic lethality with severe placental defects, and androgenetic embryos with two paternally-inherited genomes exhibit early embryonic lethality with abnormal overgrowth of the placenta (McGrath & Solter 1984; Surani *et al.* 1984). Thus, certain imprinted genes are hypothesized to be essential for the development and growth of the placenta. Another important issue is the origin of the genomic imprinting mechanisms. Why have such unique mechanisms evolved only in viviparous mammals, given that most genes and their functions are highly conserved in the vertebrates?

Retrotransposons

The abundance of retrotransposon-derived DNA sequences is another unique characteristic of the mammalian genome. The non-long terminal repeat (LTR) type of retrotransposons, short interspersed repetitive elements (SINEs) and long interspersed repetitive elements (LINEs), are enriched in all of the three mammalian groups. In addition, LTR retrotransposons as well as DNA transposons have accumulated in the therian mammals. This suggests that a massive integration and expansion of the LTR retrotransposons occurred in the therian lineages. The retrotransposon-derived DNA sequences have long been recognized as being ''junk DNA'' and potentially harmful. Their random integration results in mutations in endogenous genes, and they can also lead to the reconstruction (or deletion) of genomes by homologous recombination. In 2001, two retrotransposon-derived genes that are conserved in the eutherian species were discovered as paternally expressed imprinted genes, *PEG10* (Ono *et al.* 2001) and *PEG11/RTL1* (Charlier *et al.* 2001). Are they real genes? Do they play certain roles in eutherian development and growth, especially placenta formation? What is the evolutionary role of retrotransposons, if any, for eutherian mammals?

Mammalian-specific genomic functions link development to evolution

In this review, we will take on the challenge of the current understanding of the history of mammalian evolution. A key concept is mammalian-specific genomic function that links development to evolution in mammals (Fig. 1). The mammalian-specific genomic functions are comprised of two parts, mammalian-specific genetic and epigenetic mechanisms. As a result of studies on these two sets of functions, one can appreciate the uniqueness and specificity of the mammalian developmental system. In turn, these investigations can also provide a clue as to how mammalian evolution unfolded. For the reconstitution of placental evolution and diversification in the two viviparous mammalian groups, we introduce *PEG10* and *PEG11/RTL1* as key players in these events. *PEG10* and *PEG11/RTL1* are retrotransposon-derived imprinted genes with essential functional roles in placenta formation and maintenance, respectively. Comparative genetics studies reveal that they are mammalian-specific genes: *PEG10* exists only in the eutherians and the marsupials, while *PEG11/RTL1* exists only in the eutherians. They provide very good examples of ''exaptation,'' the generation of new genetic traits or functions from other genetic materials

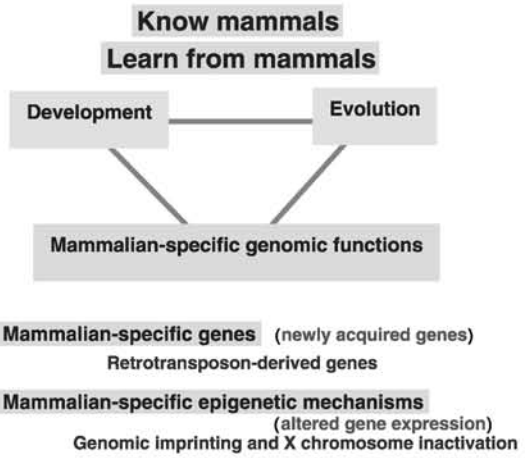


Fig. 1. Mammalian-specific genomic functions. The concept of mammalian-specific genome functions that link development to evolution in mammals. Both Mammalian-specific genetic and epigenetic mechanisms contributed to give rise to certain unique characteristics of mammals.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

for novel purposes, as originally proposed by Gould and his colleagues (Brosius & Gould 1992).

The discoveries of imprinted genes essential for the formation and maintenance of the placenta

According to the mouse genomic imprinting map produced by Cattanach and colleagues, three regions are linked to embryonic lethality (Beechey *et al.* 2005). Therefore, we will focus on these three regions, proximal chromosome 6, distal chromosome 7 and distal chromosome 12. Maternal duplication of the proximal chromosome 6 (MatDp[prox6]) leads to early embryonic lethality, while PatDp(prox6) has no effect. Paternal duplication of the distal chromosome 7 (PatDp[dis7]) also leads to early embryonic lethality, while MatDp(dis7) causes mid-fetal lethality. Mice with MatDp(dis12) exhibit late-fetal/neonatal lethality, while mice with PatDp(dis12) display late-fetal lethality with different morphological abnormalities than the MatDp(dis12) mice. The different phenotypes observed between PatDp and MatDp mice are well explained by the lack or overexpression of a single responsible imprinted gene, or the combined effects of two or three different *Pegs* and *Megs*.

Mash2/Ascl2 (mammalian *achaete scute* homologue 2/*achaete scute* complex like 2), one of the maternally expressed genes, is responsible for the early embryonic lethal phenotype caused by the PatDp(dis7). In 1995, Guillemot *et al.* reported that *Mash2* KO mice exhibited severe placental abnormalities, such as a lack of labyrinth and spongiotrophoblast layers and an overgrowth of trophoblast giant cells, and fetal death on day 10 of gestation (Guillemot *et al.* 1995). *Mash2/Ascl2* encodes a basic helix-loop-helix transcription factor specifically expressed in the placenta. Thus, *Mash2/Ascl2* is an essential placenta-specific gene expressed maternally in mice.

MatDp(dis7) causes mid-fetal lethality, probably due to the combined effect of absent paternally expressed *Igf2* (insulin-like growth factor 2) expression and overexpression of two maternally expressed genes, *Cdkn1c* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, also known as $p57^{Kip2}$) and *H19*. *Igf2* plays a role as one of major growth factors in fetal development. Its absence leads to severe growth retardation but does not cause lethality alone (DeChiara *et al.* 1991). Conversely, *Cdkn1c* functions as a growth inhibitor. Its functional loss in addition to the overexpression of *IGF2* leads to the fetal overgrowth observed in Beckwith-Widemann syndrome in humans (Hatada *et al.* 1996; Sun *et al.* 1997). *Cdkn1c* also affects the growth of placental trophoblast giant cells (Hattori *et al.* 2000). *H19* encodes an untranslated RNA with unknown function and is highly expressed in both embryos and placentas (Bartolomei *et al.* 1991), therefore, its overexpression may disturb the gene expression profiles of other genes (Kawahara *et al.* 2009).

In 2001, we identified *PEG10* on human chromosome 7q21, which corresponds to the mouse proximal chromosome 6 (Ono *et al.* 2001). Its mouse homologue, *Peg10*, is one of the genes responsible for the early embryonic lethal phenotype of the MatDp(prox6) mice: in 2006 we demonstrated that *Peg10* KO mice exhibited early embryonic lethality due to severe placental abnormality similar to the *Mash2* KO mice (Fig. 2a) (Ono *et al.* 2006). A lack of labyrinth and spongiotrophoblast layers was also observed (Fig. 3). *Peg10* encodes a protein with homology to the Gag and Pol proteins of certain LTR retrotransposons (see below), but its biochemical function is as yet unknown. *Peg10* is another essential placenta-specific gene expressed paternally in mice. It is very interesting that the *Mash2* KO and *Peg10* KO mice exhibit similar phenotypes, despite *Mash2* being maternally expressed, while *Peg10* is paternally expressed.

The labyrinth layer is an essential part of the mouse placenta through which crucial feto-maternal interaction occurs (Fig. 3). There is an abundance of fetal capillaries in the labyrinth layer bathed in maternal blood. The fetal capillaries are surrounded by three layers of trophoblast cells. The innermost and the intermediate layers consist of syncytiotrophoblast cells (layer III and II in Fig. 3, respectively), and the outermost layer consists of cytotrophoblast cells (layer I in Fig. 3). Nutrient and gas exchange between fetal and maternal blood cells occurs across these four layers (the three trophoblast cell layers in addition to the fetal capillary endothelial cells). Embryos require a nutrient and gas supply from the placenta after day 9.5 of gestation, around which time the *Mash2* KO and *Peg10* KO mice die. It should be noted that *Mash2/Ascl2* and *Peg10* are genes involved in androgenetic and parthenogenetic death, as well as early embryonic lethality in the PatDp(dis7) and MatDp(prox6) mice, respectively.

The mouse distal chromosome 12 is another important imprinted region for placental function that is associated with late embryonic and neonatal lethality. In 2001, Charlier *et al.* reported the comparative data on human-ovine large imprinting clusters corresponding to the mouse distal chromosome 12 and identified six novel imprinted transcripts, including *PEG11* (Charlier *et al.* 2001). In 2008, we demonstrated that one half of *Peg11* (also called *Rtl1*) KO mice exhibited late fetal lethality and the remaining half neonatal lethality associated with late fetal growth retardation, almost

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

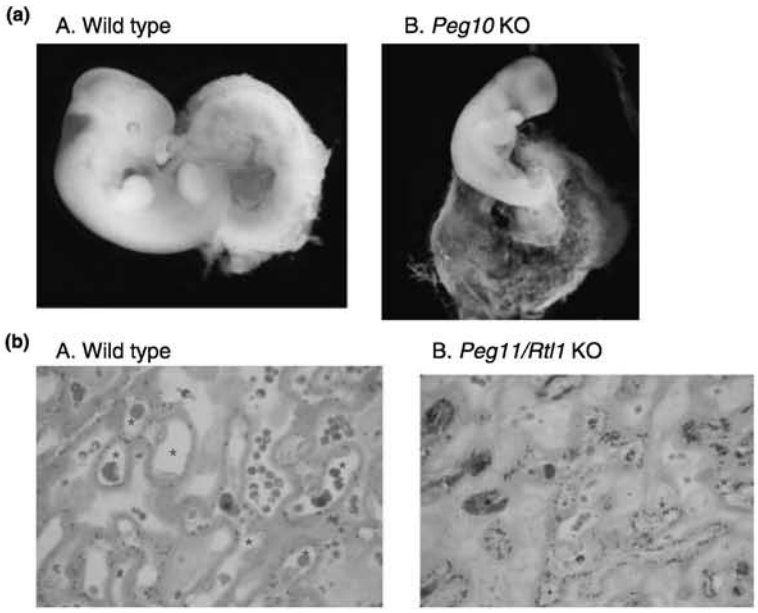


Fig. 2. (a) Early embryonic lethality of *Peg10* KO mice at day 9.5. Severe placental defects, a lack of labyrinth and spongiotrophoblast layers, occurred in *Peg10* KO mice leading to early embryonic lethality (see also Fig. 3). (b) Abnormal placenta function of *Peg11/Rtl1* KO mice. Normal placenta at day 15.5 (left) (see also Fig. 3). In *Peg11/Rtl1* KO mice, defects in fetal capillaries are observed at many sites (right). The fetal capillaries are indicated by red stars.

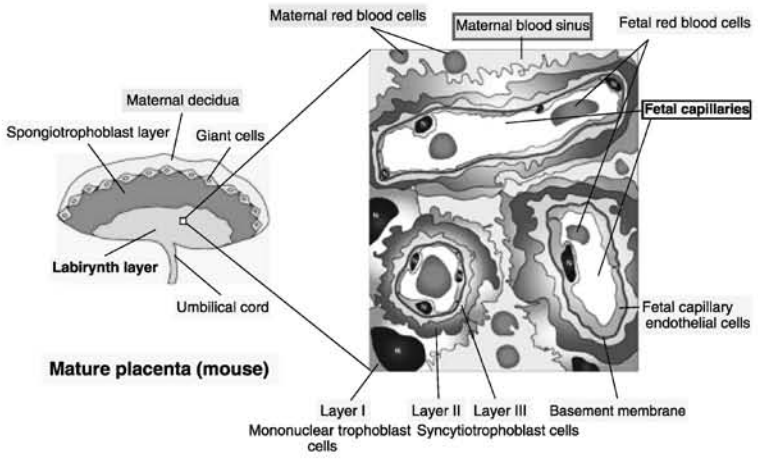


Fig. 3. Placenta: Feto-maternal interface. Schematic view of mouse placenta (left) and magnified view of the labyrinth layer, where the fetal capillaries play essential placental functions in nutrient and gas exchange between fetal and maternal blood cells (right).

the same phenotypes as the mice with MatDp(dis12) (Sekita *et al.* 2008). *Peg11/Rtl1* KO placenta displayed abnormal morphology of the fetal capillaries (Fig. 2b) as they were clogged at many sites in the labyrinth layer. Under electron microscopy, the endothelial cells appear to have been phagocytosed by abnormally proliferating trophoblast cells (not shown). The resulting disruption of blood supply from the placenta seems to be the main cause of their death and growth retardation at the late fetal stage. Thus, it is concluded that *Peg11/Rtl1* is essential for maintenance of the feto-maternal interface of the placenta during gestation.

Overexpression of *Peg11/Rtl1* in the mice with PatDp(dis12) causes placental enlargement with different structural abnormality in the fetal capillaries (Sekita *et al.* 2008). In humans, both the lack and overexpression of human *PEG11/RTL1*are also responsible for the various phenotypes observed in patients with maternal and paternal disomies of chromosome 14, respectively, including placental abnormalities (Kagami *et al.* 2008).

Genetic origin of the placental genes essential in mammals

The *Ascl2* (*Mash2*) gene is a conserved mammalian cognate of the *Drosophila Achaete Scute* complex that is essential for neuroblast formation due to its regulation of the Notch/Delta lateral inhibition mechanism. It encodes

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

a basic loop-helix-loop transcription factor, as well as another mammalian homologue, the *Ascl1* (*Mash1*) gene. It is reported that both of their chicken homologues are expressed in the brain (Yokomine *et al.* 2005). In mice and humans, *Ascl1/ASCL1* expression is retained in the brain and plays an essential role in specification of subset of neuronal cells like *Drosophila Achaete Scute* complex (Sommer *et al.* 1995). However, *Ascl2/ASCL2* expression is restricted to the placenta (Guillemot *et al.* 1994; Miyamoto *et al.* 2002). Therefore, the *Ascl2* gene is a good example of the recruitment of pre-existing functional gene into a novel organ over the course of eutherian mammal evolution (i. e., the same function, but a different location).

Gcm1 (*glial cell missing* homologue 1), another example of gene recruitment of essential functions in the placenta, was also first identified as a neuronal differentiation factor in *Drosophila melanogaster* (Hosoya *et al.* 1995). *Gcm1* functions as binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*, while in the mouse *Gcm1* regulates branching of the chorioallantoic interface. Gene targeting of *Gcm1* in mice results in embryonic lethality by day 10 due to the absence of the placental labyrinth, similar to the *Mash2* knockout mice (Anson-Cartwright *et al.* 2000). *Gcm1* and another mammalian homologue *Gcm2* also encode the basic helix-loop helix transcription factors as *Ascl1* and *Ascl2* (Kim *et al.* 1998). The two homologues in *Drosophila*, *gcm/glide* (*glial cell deficient*) and *glide2* play important roles in gliogenesis; however, the functions of their vertebrate homologues have diverged. A chicken GCM homologue exhibits extraembryonic tissue-specific expression, suggesting that a conserved extraembryonic function exists for GCM proteins in birds and mammals (Hashemolhosseini *et al.* 2004). In mice, *Gcm2* has been proposed to be a master regulator of parathyroid development, and to mediate the effect of calcium on parathyroid hormone expression and secretion in parathyroid cells (Liu *et al.* 2007).

Interestingly, *Peg10* and *Peg11/Rtl1* are derived from one of the sushi-ichi-related retrotransposons; the Peg10 and Peg11/Rtl1 proteins exhibit the highest reported amino acid homology (approximately 20–30%) to the Gag and Pol proteins of the sushi-ichi retrotransposons among the LTR retrotransposons, respectively (Charlier *et al.* 2001; Ono *et al.* 2001). Although the biological functions of *Peg10 and Peg11/Rtl1* remain unknown, all of the information below suggests that they each possess unique functions. The Peg10 protein retains an RNA binding motif of the Gag protein and a protease domain of the Pol protein, while the Peg11/Rtl1 protein only possesses the latter motif. The Peg10 protein locates in both the nucleus and cytoplasm in cells of extraembryonic ectoderm lineage (Ono *et al.* unpubl. data), while the Peg11/Rtl1 protein localizes at inside surface of cytoplasmic membrane and the periphery of the nucleus in fetal capillary endothelial cells (extraembryonic mesoderm lineage) (Sekita *et al.* 2008). As mentioned, *Peg10* and *Peg11/Rtl1* play essential roles as endogenous genes for placenta formation and maintenance, respectively, with certain modifications of their structure and function for these novel purposes.

The insertion events of the original retrotransposons and the ensuing conversion to the current endogenous genes must have occurred during mammalian evolution, because they are mammalian-specific genes that do not exist in the other higher vertebrates, such as birds and fish. When did mammals obtain these two genes? Recent comparative genome studies among three mammalian groups, including our own, have demonstrated that (i) the original *PEG10* and *PEG11/RTL1* retrotransposon insertions occurred after diversification of the monotremes and the therians 166 million years ago, (ii) the exaptation of *PEG10* occurred before the split of the marsupials and the eutherians 148 million years ago, because *PEG10* is conserved in both groups, and (iii) *PEG11/RTL* was exapted only in the eutherian lineage and became a remnant of the retrotransposon in the marsupial genome (Hore *et al.* 2007; Suzuki *et al.* 2007; Edwards *et al.* 2008) (Fig. 4a,b).

The mode of evolution: nearly neutral evolution preceded the Darwinian evolution

In general, retrotransposon insertion occurs randomly. There is little chance, or it is only a very rare event, that two independent retrotransposons become integrated into the same chromosomal site in two different individuals. As the chromosomal position of *PEG10* is conserved in all of the marsupial and the eutherian species examined, it can be assumed that all of the therian mammals propagated from an individual that had the original *PEG10* retrotransposon insertion (indicated by a pink circle and arrow in Fig. 4a, common therian ancestor 1). The amino acid homology between the original retrotransposon proteins and the PEG10 protein is only 20–30%, thus, multiple mutations (black arrowheads) must have been occurred to form the preliminary *PEG10*.

Mutation is, of course, a random process. Therefore, it is probable that the exaptation of *PEG10* occurred either in a single organism or in a limited number of its descendants and would be the direct common ancestor(s) of the therian mammals (indicated by a red circle and arrow in Fig. 4a, common therian ancestor 2). Subsequent to its exaptation, *PEG10* spread

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

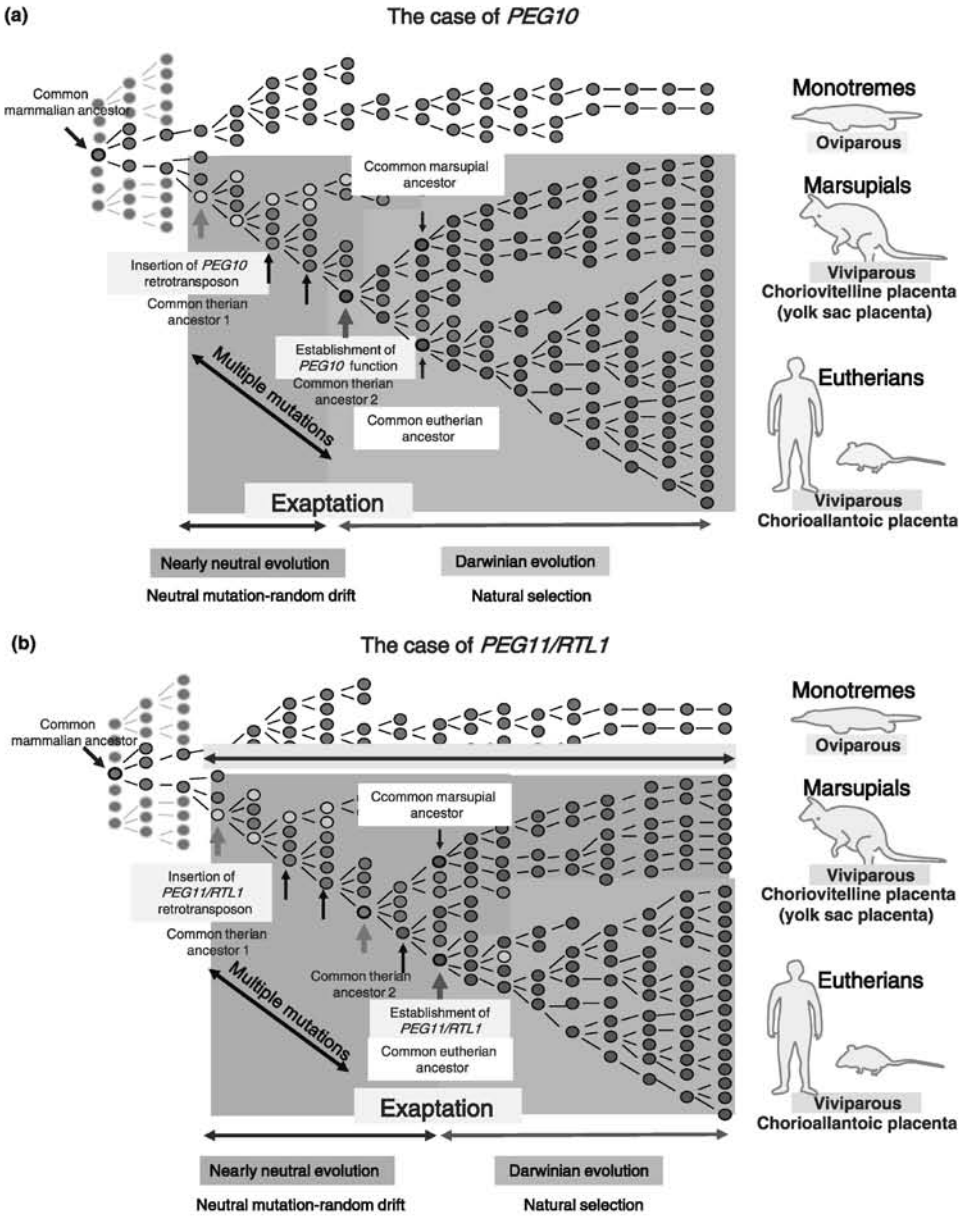


Fig. 4. Exaptations of *PEG10* and *PEG11/RTL1*. (a) In case of *PEG10*, integration of the original *PEG10* retrotransposon (a pink arrow) occurred after divergence of the protherian and therian mammals and its domestication (a red arrow) completed before the split of the eutherians and the marsupials. (b) In case of *PEG11/RTL1*, integration of the original *PEG11/RTL1* retrotransposon (the first pink arrow) occurred after divergence of the protherian and therian mammals but its domestication (a red arrow) occurred only in the eutherians. Multiple mutations are shown by black arrows. Nearly neutral evolution process (shaded in pale blue) lasted until the Darwinian evolution process (shaded in pale pink) began.

throughout the extant therian species, possibly due to the developmental advantage it has conferred (shaded in pink in Fig. 4a). Thus, *PEG10* seems to be one of the key players in mammalian evolution, and a very good example of the Darwinian theory of evolution: an advantageous mutation which spontaneously occurred in an individual was transmitted to his or her offspring, the mutant allele then prevailed among the

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

descendants and finally led to the constitution of a novel species. In this case, the newly exapted *PEG10* may have contributed to the formation of a novel infraclass, the therian mammals.

The question arises as to what happened to the mammalian ancestors before the exaptation of *PEG10*. A newly integrated original retrotransposon itself would be more likely to be harmful rather than advantageous. Therefore, something must have happened to the retrotransposon-derived sequence, otherwise, it would have been eliminated from the population soon after its integration. Given that the current mammalian species possess the ability to repress the integrated retrotransposons or retroviruses by DNA methylation, our ancestors might have already possessed such a capacity to inactivate the original *PEG10* retrotransposon. If so, it would have been modified so as to be made into a neutral gene.

According to the ''nearly neutral theory'' by Tomoko Ohta (2002), an extended version of ''the neutral mutation-random drift theory'' proposed by Motoo Kimura (1968), neutral or even ''less harmful'' genes can become established in a population to some extent if the population size is small enough. Such neutral genes are subjected to mutation at the highest rate. In addition, DNA methylation promotes rapid mutation, because methylated cytosine residues are subject to a spontaneous deamination reaction and a change to thymine residues (C to T transition).

Another key issue may be placenta-specific DNA undermethylation (Chapman *et al.* 1984; Rossant *et al.* 1986). It has recently been shown that methylation levels at transposable elements genome-wide are considerably lower (40%) in the placenta compared with those in the embryo (80%) (Popp *et al.* 2010). Certain transposable elements are more actively transcribed specifically in the human placenta, but not in other somatic tissues, and these retroelements are thought to play certain roles in cell fusion and immunosuppression during placental formation (Mi *et al.* 2000; Rote *et al.* 2004; Dupressoir *et al.* 2009; Sugimoto & Schust 2009). Leaky expression of the original *PEG10* retrotransposon or its subsequent mutated forms in the placenta might have been ''less harmful'' to our ancestors. However, it enabled the natural selection to come into play via the emergence of a slightly advantageous preliminary form of *PEG10*. In this sense, the placenta might serve as an ''evolutionary laboratory'' for mammalian evolution, a site where a massive amount of mutations can be tested and selected. Recently, variable DNA methylation in early transposons was reported in mice (Reiss *et al.* 2010). Such a stochastic DNA methylation mechanism of the transposable elements might also contribute to the exaptation process of *PEG10*. Therefore, it is possible that *PEG10* emerged from the original retrotransposon within the approximate 20 million years that elapsed between the diversification from the monotremes (166 MYA) and the split of the therian mammals (148 MYA).

In this scenario, the emergence of *PEG10* was pure chance, but its impact on the mammalian evolution was profound. The exaptation of *PEG10* seems to comprise two subsequent steps. First, nearly neutral evolution played the essential background role of inactivating integrated retrotransposons by DNA methylation and preparing certain novel essential placental genes by multiple mutations, and second, Darwinian evolution (natural selection) promoted placental evolution because of the developmental advantage it conferred. Thus, we propose that nearly neutral evolution precedes but is linked to Darwinian evolution, in the case of exaptation. This entire process resembles ''the punctuated equilibrium'' proposed by Eldredge and Gould in 1972 (Gould & Eldredge 1993): A long lasting silent period was interrupted by sudden change of phenotypes. It should be pointed out that the Darwinian evolution process (shaded in pale pink in Fig. 4a), is so overwhelming that it tends to wipe out evidence for nearly neutral evolution, because no living therian mammals with different (non-functional) types or different variations of *PEG10* exist at present (shaded in pale blue in Fig. 4a).

In this regard, *PEG11/RTL1* provides further crucial information. As already mentioned, according to Edwards *et al.* (2008), the *PEG11/RTL1* original retrotransposon integration also occurred in a common ancestor of the therian mammals. It was then exapted as *PEG11/RTL1* in the eutherian lineage, but not in the marsupial lineage (Fig. 4b). If this is indeed true, the emergence of the marsupial mammals lends strong support to our hypothesis that nearly neutral evolution precedes the Darwinian evolution in the case of exaptation (shaded in pale blue and pale pink in Fig. 4b, respectively). However, as numerous mutations led to the integrated retrotransposons in the eventual marsupial genome, it is difficult to conclusively demonstrate that it is of the same origin as *PEG11/RTL1* in the eutherians, due to the limitations of the computer programs available at present. Further analysis of additional and more suitable exaptation cases will thus have to be conducted in the future.

Diversification of marsupials and eutherians by placental type

As mentioned, the marsupials and the eutherians use placentas of different developmental origin types, yolk sac and chorioallantoic placentas, respectively.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

However, some eutherian species, such as dogs and cats, are known to use the yolk sac placenta in the very early developmental stages. In the case of bandicoots, an Australian marsupial species, the chorioallantoic placenta is used in addition to the yolk sac placenta over the last one and half days just before birth in the 17 day period of gestation. The chorioallantoic placenta works more efficiently than the yolk sac placenta, leading to the rapid growth of the fetus in this limited period. Considering the placental variety in marsupials and eutherians, the chances appear to be equal for both of the groups either to develop the chorioallantoic placenta. But why does the chorioallantoic placenta function for such a very short time in bandicoots? We suggest that it is due to the absence of *PEG11/RTL1* in the marsupials, because the function of *PEG11/RTL1* is essential for maintaining the chorioallantoic placenta over a long period of gestation. In the context of the absence of *PEG11/RTL1,* the chorioallantoic placenta might not have a distinct advantage over the yolk sac placenta in the marsupial reproduction system. Thus, we propose that the presence or absence of *PEG11/RTL1* has exerted an effect on the destiny of the two viviparous mammalian groups, and the different reproductive strategies diverged during the course of evolution because of the placentas.

The emergence of novel imprinted regions

The comparison of the three groups of mammals gave additional information on the origin of novel imprinted regions during the course of evolution. Marsupial *PEG10* is also imprinted and exhibits paternal expression as is the eutherian *PEG10*. Importantly, its imprinted expression is controlled by an imprinting control element, DMR (differentially methylated region), that regulates the entire set of imprinted genes within each imprinting cluster (Fig. 5a) (Suzuki *et al.* 2007). This is the first conserved DMR identified between the eutherians and the marsupials, giving strong evidence that the DNA methylation-dependent genomic imprinting mechanism has a common origin in these two viviparous mammalian groups. From a comparison of the monotreme genome, having no genomic imprinting, and the imprinted marsupial and eutherian genomes, it became clear that the *PEG10*-DMR was

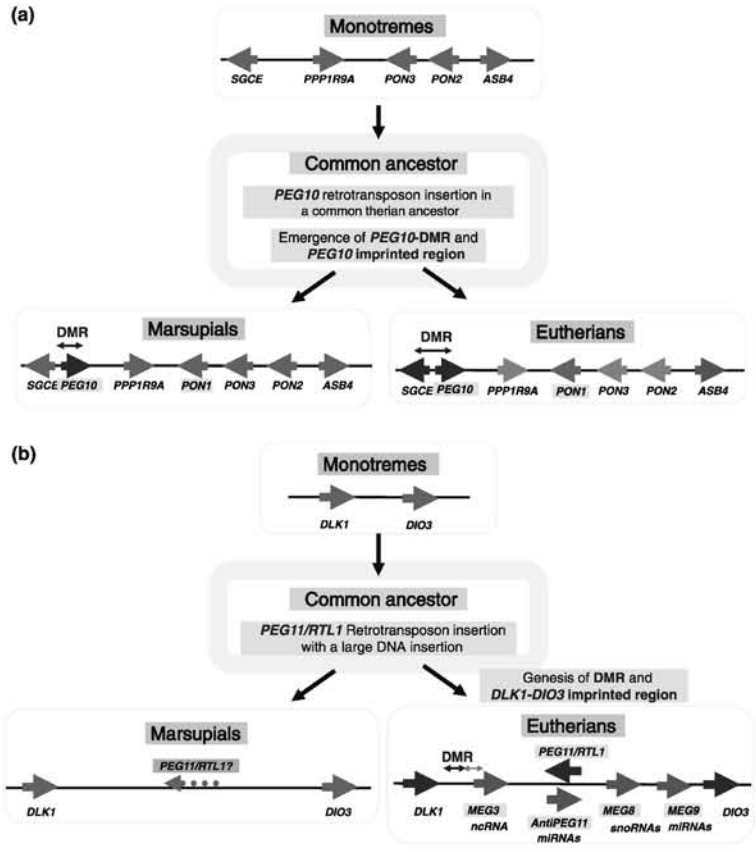


Fig. 5. Formation of novel imprinted regions during mammalian evolution. (a) *PEG10* imprinted region; *PEG10* and *PON1* (shown in yellow boxes) were added as well as *PEG10*-DMR in common therian ancestor(s). (b) *DLK1-DIO3* imprinted region: *PEG11/RTL1* and other maternally expressed non-coding transcripts were added in the eutherians as well as IG-DMR, but no such additions occurred in the marsupials. Blue arrows: paternally expressed genes. Red arrows: maternally expressed genes. Grey arrows: non-imprinted genes. Adapted from figure 2 in Hore *et al.* 2007 (modified).

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

also derived from the inserted DNA sequence (Fig. 5a). Comparative genome research of several additional imprinted regions also confirmed that the DMRs emerged in such novel imprinted regions, possibly by the insertion of exogenous DNA, such as retrotransposons. Smits *et al.* (2008) reported that marsupial *IGF2* imprinting is associated with the insertion of maternally expressed *H19* as well as *H19*-DMR. The *H19*-DMR is also conserved between the eutherians and the marsupials. On the other hand, the *DLK1-DIO 3* region, where *PEG11/RTL1* is located, and the *CDKN1C* region, where *ASCL2* is located, are imprinted only in the eutherians, not in the marsupials (Fig. 5b and Table 1). In these cases, IG-DMR and *KCNQ1*-DMR emerged in the eutherian genomes (Ager *et al.* 2008; Edwards *et al.* 2008). Interestingly, no insertion of genes occurred in the latter region and only the *KCNQ1*-DMR sequence was newly added. All these data indicate that DMRs are derived from newly integrated DNA sequences, such as retrotransposons and other exogenous CpG rich sequences. Novel genomic imprinting regions may have arisen as a response to such inserted DMR sequences by DNA methylation, supporting ''the self defense hypothesis'' of genomic imprinting proposed by Barlow (1993) and by Bestor and his colleagues (Yoder *et al.* 1997).

Conclusions: the importance of epigenetic as well as genetic mechanisms in the course of evolution

In this review, we would like to emphasize that the combined approach using epigenetics and genetics together has great potential to provide unique, distinct and effective means of investigation in the field of biology. We propose the hypothesis that the evolution and diversification of mammals have been driven by a series of chance events, retrotransposon integration and exaptation, so as to produce two novel essential placental genes, *PEG10* and *PEG11/RTL1*. To test this hypothesis, the following questions will need to be addressed using the marsupials as a genetic model. (i) Does *PEG10* play an essential role in the formation of the yolk sac placenta in both marsupials and eutherians? (ii) Is the short lifetime of the chorioallantoic placenta in the bandicoot due to the absence of *PEG11/RTL1*? We also suggest that nearly neutral evolution played an essential background role via retrotransposon domestication before Darwinian evolution shaped mammalian evolution to its current form. Finally, we have addressed the origin of novel imprinted regions and pointed out an association with the emergence of novel DMR sequences.

In both cases, DNA methylation in germ cells appears to have had a critical role. In the exaptation of *PEG10* and *PEG11/RTL1*, the ability to suppress the retrotransposons integrated into the germ lines by DNA methylation might have been essential for their gradual conversion to novel genes for novel purposes. Placenta-specific DNA undermethylation might also play an important role to allow the natural selection process. Novel genomic imprinting regions would be produced by the DNA methylation against integrated DNA sequences that presumably possess gene regulatory activities around the integration sites. Therefore, we speculate that germ line DNA methylation was one of the key mechanisms that gave rise to certain mammalian-specific features, including placentation and genomic imprinting, as well as predictable germ line specific histone modification mechanisms.

The coincidental emergence of *DNMT3L* in therian mammals is suggestive of retrotransposon domestication and exaptation (Yokomine *et al.* 2006). *DNMT3L* plays an essential functional role in DMR methylation in the female germ line associated with *DNMT3A*, and in retrotransposon methylation in the paternal germ line (Bourc'his *et al.* 2001; Hata *et al.* 2002; Bourc'his & Bestor 2004).

Therefore, we believe the evidence suggests that epigenetic mechanisms are important not only for present mammalian developmental systems, but also to their emergence in the course of evolution. Evolution is one of the frontiers of the latest advances in biology based on genome science. DNA methylation is widely observed in a range of organisms from bacteria to plants and animals, although certain model organisms do lack this ability. We propose DNA methylation has exerted an impact on genomic evolution that has helped to lead the diversification of the organisms on the earth. Mammalian evolution in this regard is

Table 1. Emergence of imprinted regions by insertion of differentially methylated regions (DMRs)

Imprinted regions	Newly inserted genes	Newly inserted DMRs	Imprinting
PEG10	*PEG10*, *PON1*	*PEG10*-DMR	Therians
IGF2	*H19*	*H19*-DMR	Therians
DLK1-DIO3	*PEG11/RTL1*, *antiPEG11/antiRTL1*, *MEG3/GTL2*, *MEG8*, *MEG9*	IG-DMR	Eutherians
CDKN1C	None	*KCNQ1*-DMR	Eutherinas

PEG10 and *IGF2* regions are imprinted in both marsupials and eutherians. Their imprinting control elements, *PEG10*- and *H19*-DMRs, emerged in therian genomes, respectively. *DLK1-DIO3* and *CDKN1C* regions are imprinted only in eutherians and IG- and *KCNQ1*-DMRs emerged in eutherian genomes, respectively.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

especially fascinating, because it sheds light on the emergence of human beings, and thus is an essential part of our biological history.

Acknowledgments

We thank all the collaborators, especially, Azim Surani, Marilyn Renfree, Jennifer Graves, Minesuke Yokoyama, Kenji Nakamura and Atsuo Ogura for their fruitful collaboration. We also thank all the laboratory members attending this project, especially, Yoshimi Kuroiwa and Naoki Miyoshi for systematic identification of imprinted genes, *Pegs* and *Megs*, and Ryuichi Ono, Yoichi Sekita, Sunsuke Suzuki and Takashi Kohda for analyzing the functions of *Peg10* and *Peg11/Rtl1*. This work has been long supported by a series of scientific grants of PRESTO and CREST from Japan Science and Technology Agency (JST), Creative Science Research from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT), Uehara Memorial Science foundation, Mitsubishi foundation, Kanagawa Academy of Science and Asahi Glass Foundation. We thank Jessica Stringer and Pacific Edit who reviewed the manuscript prior to submission.

References

Ager, E. I., Pask, A. J., Gehring, H. M., Shaw, G. & Renfree, M. B. 2008. Evolution of the *CDKN1C-KCNQ1* imprinted domain. *BMC Evol. Biol.* **8**, 163.

Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S. J., Lazzarini, R. A. & Cross, J. C. 2000. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* **25**, 311–314.

Barlow, D. P. 1993. Methylation and Imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* **260**, 309–310.

Barlow, D. P. & Bartolomei, M. S. 2007. Genomic imprinting in Mammals. In: *Epigenetics* (eds C. D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg & M-L. Caparros), pp. 357–375, Cold Spring Harbor Press, New York.

Bartolomei, M. S., Zemel, S. & Tilghmann, S. M. 1991. Paternal imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature* **351**, 153–155.

Beechey, C. V., Cattanach, B. M., Blake, A. & Peters, J. 2005. Mouse Imprinting data and references (http://www.har.mgu.mrc.ac.uk/research/genomic_imprinting/).

Brosius, J. & Gould, S. J. 1992. On "genomenclature": a comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other "junk DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 10706–10710.

Bourc'his, D., Xu, G. L., Lin, C. S., Bollman, B. & Bestor, T. H. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprinting. *Science* **294**, 2536–2539.

Bourc'his, D. & Bestor, T. H. 2004. Transposon Silencing and Imprint Establishment in Mammalian Germ Cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **69**, 381–388.

Chapman, V., Forrester, L., Sanford, J., Hastie, N. & Rossant, J. 1984. Cell lineage- specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature* **307**, 284–286.

Charlier, C., Segers, K., Wagenaar, D., Karim, L., Berghmans, S., Jaillon, O., Shay, T., Weissenbach, J., Cockett, N., Gyapay, G. & Georges, M. 2001. Human–Ovine Comparative Sequencing of a 250-kb Imprinted Domain Encompassing the Callipyge (*clpg*) Locus and Identification of Six Imprinted Transcripts: *DLK1*, *DAT*, *GTL2*, *PEG11*, *antiPEG11*, and *MEG8*. *Genome Res.* **11**, 850–862.

DeChiara, T. M., Robertson, E. J. & Efstraiadis, A. 1991. Paternal imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849–859.

Dupressoir, A., Vernochet, C., Bawa, O., Harper, F., Pierron, G., Opolon, P. & Heidmann, T. 2009. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 12127–12132.

Edwards, C. A., Mungall, A. J., Matthews, L., Ryder, E., Gray, D. J., Pask, A. J., Shaw, G., Graves, J. A. M., Rogers, J., the SAVOIR consortium, Dunham, I., Renfree, M. B. & Ferguson-Smith, A. C. 2008. The Evolution of the *DLK1-DIO3* Imprinted Domain in Mammals. *PLoS Biol.* **6**, e135.

Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J. & Joyner, A. L. 1994. Essential role of *Mash-2* in extraembryonic development. *Nature* **371**, 333–336.

Guillemot, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Anderson, D. J., Joyner, A. L., Rossant, J. & Nagy, A. 1995. Genomic imprinting of *Mash2*, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat. Genet.* **9**, 235–242.

Gould, S. J. & Eldredge, N. 1993. Punctuated equilibrium comes of age. *Nature* **366**, 223–227.

Hata, K., Okano, M., Lei, H. & Li, E. 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferase to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983–1993.

Hatada, I., Ohashi, H., Fukushima, Y., Kaneko, Y., Inoue, M., Komoto, Y., Okada, A., Ohishi, S., Nabetani, A., Morisaki, H., Nakayama, M., Niikawa, N. & Mukai, T. 1996. An imprinted gene $p57^{KIP2}$ is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat. Genet.* **14**, 171–173.

Hattori, N., Davies, T. C., Anson-Cartwright, L. & Cross, J. C. 2000. Periodic expression ofo the cyclin-dependent kinase inhibitor $p57^{Kip2}$ in trophoblast Giant Cells difines a G2-like gap phase of the endocyle. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1037–1045.

Hore, T. A., Rapkins, R. W. & Graves, J. A. M. 2007. Construction and evolution of imprinted loci in mammals. *Trends Genet.* **23**, 440–448.

Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. & Hotta, Y. 1995. *glial cells missing*: a binary switch between neuronal and glial determination in drosophila. *Cell* **82**, 1025–1036.

Hashemolhosseini, S., Schmidt, K., Kilian, K., Rodriguez, E. & Wegner, M. 2004. Conservation and variation of structure and function in a newly identified GCM homolog from chicken. *J. Mol. Biol.* **336**, 441–451.

Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., Yamamori, S., Kishimoto, H., Nakayama, M., Tanaka, Y., Matsuoka, K., Takahashi, T., Noguchi, M., Tanaka, Y., Masumoto, K., Utsunomiya, T., Kouzan, H., Komatsu, Y., Ohashi, H., Kurosawa, K., Kosak, K., Ferguson-Smith, A. C., Ishino, F. & Ogata, T. 2008. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat. Genet.*. **40**, 237–242.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

Kawahara, M., Morita, S., Takahashi, N. & Kono, T. 2009. Defining contributions of paternally methylated imprinted genes at the *Igf2-H19* and *Dlk1-Gtl2* domains to mouse placentation by transcriptomic analysis. *J. Biol. Chem.* **284**, 17751–17765.

Kim, J., Jones, B. W., Zock, C., Chen, Z. & Anderson, D. J. 1998. Isolation and characterization of mammalian homologs of the Drosophila gene glial cells missing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 12364–12369.

Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**, 624–626.

Lewis, A. & Reik, W. 2006. How imprinted centres work? *Cytogenet. Genome Res.* **113**, 81–89.

Liu, Z., Yu, S. & Manley, N. R. 2007. *Gcm2* is required for the differentiation and survival of parathyroid precursor cells in the parathyroid/thymus primordia. *Dev. Biol.* **305**, 333–346.

McGrath, J. & Solter, D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179–183.

Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith Jr, J. C.. & McCoy, J. M. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**, 785–789.

Miyamoto, T., Hasuike, S., Jinno, Y., Soejima, H., Yun, K., Miura, K., Ishikawa, M. & Niikawa, N. 2002. The human *ASCL2* gene escaping genomic imprinting and its expression pattern. *J. Assist. Reprod. Genet.* **19**, 240–244.

Ono, R., Kobayashi, S., Wagatsuma, H., Aisaka, K., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T. & Ishino, F. 2001. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics* **73**, 232–237.

Ono, R., Nakamura, K., Inoue, K., Naruse, M., Usami, T., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Ogonuki, N., Miki, H., Kohda, T., Ogura, A., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. & Ishino, F. 2006. Deletion of *Peg10,* an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat. Genet.* **38**, 101–106.

Ohta, T. 2002. Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 16134–16137.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E. & Reik, W. 2010. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* **463**, 1101–1105.

Reiss, D., Zhang, Y., Rouhi, A., Reuter, M. & Mager, D. L. 2010. Variable DNA methylation of transposable elements: The case study of mouse Early Transposons. *Epigenetics* **5**, 68–79.

Renfree, M. B., Hore, T. A., Shaw, G., Graves, J. A. M. & Pask, A. J. 2009. Evolution of Genomic Imprinting: insights from Marsupials and Monotremes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 241–262.

Renfree, M. B. 2010. Marsupials: Placental Mammals with a Difference. *Placenta* **24**, S21–S26.

Rossant, J., Sanford, J. P., Chapman, V. M. & Andrews, G. K. 1986. Undermethylation of structural gene sequences in extraembryonic lineages of the mouse. *Dev. Biol.* **117**, 567–573.

Rote, N. S., Chakrabarti, S. & Stetzer, B. P. 2004. The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta* **25**, 673–683.

Sekita, Y., Wagatsuma, H., Nakamura, K., Ono, R., Kagami, M., Wakisaka-Saito, N., Hino, T., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Ogura, A., Ogata, T., Yokoyama, M., Kaneko-Ishino, T. & Ishino, F. 2008. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1,* in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat. Genet.* **40**, 243–248.

Smits, G., Mungall, A. J., Griffiths-Jones, S., Smith, P., Beury, D., Matthews, L., Rogers, J., Pask, A. J., Shaw, G., VandeBerg, J. L., McCarrey, J. R., the SAVOIR Consortium, Renfree, M. B., Reik, W. & Dunham, I. 2008. Conservation of the *H19* noncoding RNA and *H19-IGF2* imprinting mechanism in therians. *Nat. Genet.* **40**, 971–976.

Sommer, L., Shah, N., Rao, M. & Anderson, D. J. 1995. The cellular function of *MASH1* in autonomic neurogenesis. *Neuron* **15**, 1245–1258.

Sugimoto, J. & Schust, D. J. 2009. Review: human endogenous retroviruses and the placenta. *Reprod. Sci.* **16**, 1023–1033.

Sun, F. L., Dean, W. L., Kelsey, G., Allen, N. D. & Reik, W. 1997. Transactivation of *Igf2* in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **389**, 809–815.

Surani, M. A., Barton, S. C. & Norri, M. L. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**, 548–550.

Suzuki, S., Ono, R., Narita, T., Pask, A. J., Shaw, G., Wang, C., Kohda, T., Alsop, A. E., Graves, J. A. M., Kohara, Y., Ishino, F., Renfree, M. B., & Kaneko-Ishino, T. 2007. Retrotransposon Silencing by DNA Methylation Can Drive Mammalian Genomic Imprinting. *PLoS Genet.* **3**, e55.

Warren, W. C., Hillier, L. W., Graves, J. A. M., Birney, E., Ponting, C. P., Grützner, F., Belov, K., Miller, W., Clarke, L., Chinwalla, A. T., Yang, S-P., Heger, A., Locke, D. P., Miethke, P., Waters, P. D., Veyrunes, F., Fulton, L., Fulton, B., Graves, T., Wallis, J., Puente, X. S., López-Otín, C., Ordóñez, G. R., Eichler, E. E., Chen, L., Cheng, Z., Deakin, J. E., Alsop, A., Thompson, K., Kirby, P., Papenfuss, A. T., Wakefield, M. J., Olender, T., Lancet, D., Huttley, G. A., Smit, A. F. A., Pask, A., Temple-Smith, P., Batzer, M. A., Walker, J. A., Konkel, M. K., Harris, R. S., Whittington, C. M., Wong, E. S. W., Gemmell, N. J., Buschiazzo, E., Jentzsch, I. M. V., Merkel, A., Schmitz, J., Zemann, A., Churakov, G., Kriegs, J. O., Brosius, J., Murchison, E. P., Sachidanandam, R., Smith, C., Hannon, G. J., Tsend-Ayush, E., McMillan, D., Attenborough, R., Rens, W., Ferguson-Smith, M., Lefèvre, C. M., Sharp, J. A., Nicholas, K. R., Ray, D. A., Kube, M., Reinhardt, R., Pringle, T. H., Taylor, J., Jones, R. C., Nixon, B., Dacheux, J-L., Niwa, H., Sekita, Y., Huang, X., Stark, A., Kheradpour, P., Kellis, M., Flicek, P., Chen, Y., Webber, C., Hardison, R., Nelson, J., Hallsworth-Pepin, K., Delehaunty, K., Markovic, C., Minx, P., Feng, Y., Kremitzki, C., Mitreva, M., Glasscock, J., Wylie, T., Wohldmann, P., Thiru, P., Nhan, M. N., Pohl, C. S., Smith, S. M., Hou, S., Nefedov, M., de Jong, P. J., Renfree, M. B., Mardis, E. R. & Wilson, R. K. 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* **453**, 175–183.

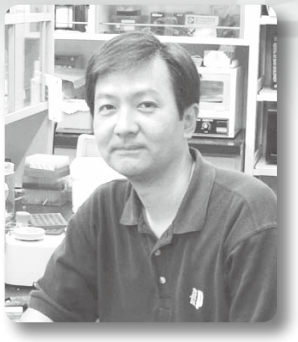
Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**, 335–340.

Yokomine, T., Shirohzu, H., Purbowasito, W., Toyoda, A., Iwama, H., Ikeo, K., Hori, T., Mizuno, S., Tsudzuki, M., Matsuda, Y., Hattori, H., Sakaki, Y. & Sasaki, H. 2005. Structural and functional analysis of a 0.5-Mb chicken region orthologous to the imprinted mammalian *Ascl2/Mash2–Igf2–H19* region. *Genome Res.* **15**, 154–165.

Yokomine, T., Hata, K., Tsudzuki, M., & Sasaki, H. 2006. Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of *DNMT3L* and genomic imprinting. *Cytogenet. Genome Res.* **113**, 75–80.

© 2010 The Authors
Journal compilation © 2010 Japanese Society of Developmental Biologists

分子細胞生物学分野



澁谷 浩司

医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻
細胞機能調節学・教授

1）研究課題名

p38-NLK経路によるXenopus前頭部形成の制御機序

NLKがツメガエルの頭部前方領域の形成に関与していることが示唆されていたことから、前頭部の形成におけるNLKの機能を検討するために、NLKと相互作用する分子群を検索し、MAPキナーゼファミリーの一つであるp38を単離した。ツメガエルにおいて、NLKに関してはこれまでに知られていたNLK（xNLK1）以外にxNLK2（ほ乳類のNLKにより相同性が高い）が存在すること、p38に関してはp38 α、p38 βが頭部形成に関する機能の相違が確認されたことを含めて、下記のような新たな知見を得ることができた。

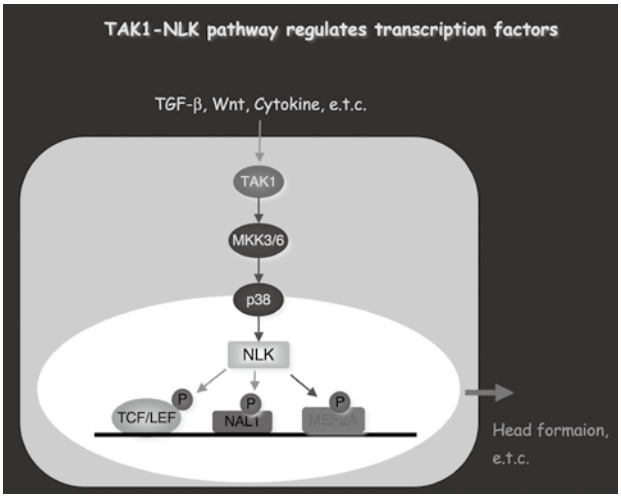
1）ツメガエル胚において、神経形成期でのxNLK1、xNLK2、p38 α、p38 βの4つの遺伝子の発現は全て頭部前方領域において重なっており、MOを用いてそれぞれの遺伝子の機能を消失させると、xNLK1、xNLK2、p38 βの3つの遺伝子に関して頭部前方領域の形成不全が確認された。p38 αの機能消失は頭部形成に影響を与えなかった。

2）p38 βはxNLK1のN末端付近のセリン残基をリン酸化していたが、xNLK2ではほ乳類のNLKと同様にC末端付近のセリン残基を特異的にリン酸化した。p38 βの機能消失による表現型は、野生型xNLK1と同様に、xNLK2の強制発現では回復されたが、p38 βによるリン酸化部位をアラニンに置換した変異型xNLK2では回復されなかった。

3）xNLK1の機能消失による表現型は、野生型xNLK2の強制発現で、xNLK2の機能消失による表現型は、野生型xNLK1の強制発現で回復された。xNLK1とxNLK2の機能の重複が確認された。

今回得られた新たな知見は、ツメガエルに存在するxNLK1及びxNLK2の両遺伝子のp38 βによるリン酸化修飾を介した機能制御が頭部前方領域の形成過程に重要であることを示唆した。

2）



3）研究内容についての英文要約

NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase

NLK is known to function as a MAPK-like kinase. However, the upstream molecules and molecular mechanisms that regulate NLK activity remain unclear. In the present study, we identified p38 MAPK as an upstream kinase and activator of NLK. p38 regulates the function of NLK via phosphorylation, and this modification can be abrogated by depletion of endogenous p38. In Xenopus embryos, depletion of either p38 β or NLK by antisense morpholino oligonucleotides results in a severe defect in anterior development and impaired expression of endogenous anterior markers. It is notable that morphants of Xenopus p38 α, another isoform of the p38 MAPK family, exhibited no obvious defects in anterior development. Defects in head formation or expression of anterior marker genes caused by suppression of endogenous p38 β expression

could be rescued by expression of wild-type NLK, but not mutant NLK lacking the p38 β phosphorylation site. In contrast, defects in head formation or expression of anterior marker genes caused by suppression of endogenous NLK expression could not be rescued by expression of p38. These results provide the first evidence that p38 specifically regulates NLK function required for the anterior formation in Xenopus development.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

事業推進担当者である萩原正敏教授（難治疾患研究所形質発現分野）との共同研究を推進し、その成果がNature Communicationに掲載された。

E（国際化）

分野内でのセミナーを英語で実施している。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

将来の優秀な研究者に成るべく大学院生の育成

6）英文原著論文

◎ Ohnishi, E., Goto, T., Sato, A., Kim, M., Iemura, S., Ishitani, T., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. Mol. Cell. Biol. 30, 675-683.

Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., Satoh, K., Wiercinska, E., Yang, W., Shi, L., Tanaka, A., Nakano, N., Mommaas, A M., Shibuya, H., ten Dijke, P. and Kato, M. TMEPAI, a transmembrane TGF-β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-β signaling. Mol. Cell 37, 123-134.

Nifuji, A., Ideno, H., Ohyama, Y., Takanabe, R., Araki, R., Abe, M., Noda, M. and Shibuya, H.（2010）. Nemo-like kinase（NLK）expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. Exp. Cell Res. 316, 1127-1136.

Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. and Ichijo, H.（2010）. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation2 required for proper hyperosmotic response. EMBO J. 29, 2501-2514.

Ogawa, Y., Nonaka1, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N. and Hagiwara, M.（2010）. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. Nature Communications 1, 1090.

Goto, T., Fukui1, A., Shibuya, H., Keller, R. and Asashima, M.（2010）. Xenopus furry contributes to release of microRNA gene silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 19344-19349.

Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A. and Matsumoto, K.（2011）. Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. Nat Commun. 2, 158.

7）平成22年度までの自己評価

着実に研究が進行し、論文としてまとまりつつある状況である。また、本GCOE国際PIシャペロン教員であった後藤利保を准教授に迎え、研究の質も向上し、今後、数年以内で良い研究成果が得られるものと思われる。

8）学会発表（和文）

後藤利保、清水幹容、足立俊吾、佐藤清敏、家村俊一郎、石谷太、夏目徹、澁谷浩司 IQGAP1 functions as a modulator for the nuclear localization of Dishevelled and β-catenin in Wnt signaling. 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会2010年12月7日、神戸。

9）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授	後藤利保
助　教	佐藤淳
大学院生	清水幹容、田雅文、松澤純平

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Feb. 2010, p. 675–683 Vol. 30, No. 3
0270-7306/10/$12.00 doi:10.1128/MCB.00576-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Nemo-Like Kinase, an Essential Effector of Anterior Formation, Functions Downstream of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase▽†

Eriko Ohnishi,[1]‡ Toshiyasu Goto,[1,2]‡ Atsushi Sato,[1,3]‡ Mi-sun Kim,[1] Shun-ichiro Iemura,[4] Tohru Ishitani,[5] Tohru Natsume,[4] Junji Ohnishi,[1] and Hiroshi Shibuya[1,2]*

Department of Molecular Cell Biology, Medical Research Institute and School of Biomedical Science,[1] Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases,[2] and Medical Top Track Program, Medical Research Institute,[3] Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, National Institutes of Advanced Industrial Science and Technology, Biological Information Research Center (JBIRC), Kohtoh-ku, Tokyo 135-0064,[4] and Division of Cell Regulation Systems, Post-Genome Science Center, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582,[5] Japan

Received 2 May 2009/Returned for modification 22 June 2009/Accepted 10 November 2009

Nemo-like kinase (NLK) is known to function as a mitogen-activated protein kinase (MAPK)-like kinase. However, the upstream molecules and molecular mechanisms that regulate NLK activity remain unclear. In the present study, we identified p38 MAPK as an upstream kinase and activator of NLK. p38 regulates the function of NLK via phosphorylation, and this modification can be abrogated by depletion of endogenous p38. In *Xenopus laevis* embryos, depletion of either p38β or NLK by antisense morpholino oligonucleotides results in a severe defect in anterior development and impaired expression of endogenous anterior markers. It is notable that morphants of *Xenopus* p38α, another isoform of the p38 MAPK family, exhibited no obvious defects in anterior development. Defects in head formation or in the expression of anterior marker genes caused by suppression of endogenous p38β expression could be rescued by expression of wild-type NLK but not by expression of mutant NLK lacking the p38β phosphorylation site. In contrast, defects in head formation or in the expression of anterior marker genes caused by suppression of endogenous NLK expression could not be rescued by expression of p38. These results provide the first evidence that p38 specifically regulates NLK function, which is required for anterior formation in *Xenopus* development.

Nemo-like kinase (NLK) is an evolutionarily conserved serine-threonine protein kinase that was originally isolated as a murine orthologue of *Drosophila melanogaster* Nemo, which is involved in diverse signaling processes (3). Studies of Nemo-null mutants in *Drosophila* revealed that Nemo plays a role in head development and in the pathway governing epithelial planar cell polarity during eye development by controlling programmed cell death (19). In our previous studies, we demonstrated that NLK is involved in the suppression of the Wnt/β-catenin signaling pathways. NLK inactivates a transcriptional unit composed of β-catenin/T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer-binding factor (LEF) by phosphorylation of TCF/LEF, which inhibits the binding of this complex to its target gene sequences (10, 28). NLK functions downstream of transforming growth factor β-activated kinase 1 (TAK1), a member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK or MAP3K) family (10, 22), Wnt1 (9), and Wnt5a (8). Loss of NLK/Nemo function results in an embryonic lethal phenotype in *Drosophila* (19), *Caenorhabditis elegans* (24), and mice (15), strongly implicating NLK/Nemo as a very important regulator of cell growth, patterning, and death. We previously demonstrated that in *Xenopus laevis* embryos, expression of NLK is restricted to the central nervous system, eye field, and anterior neural crest cell populations. *Xenopus* NLK is involved in anterior formation and the expression of anterior neural marker genes (6). Our recent data indicate that, in addition to TCF/LEF, NLK associates with and modulates the activities of other transcription factors, including xSox11, STAT3 (22), HMG2L1 (27), and MEF2A (26). This suggests that NLK contributes to various signaling pathways via its ability to interact with a diverse collection of transcription factors.

The activation of p38 in response to a wide range of extracellular stimuli is reflected in the diverse range of MAP3Ks (TAK1, ASK1, DLK, and MEKK4, etc.) that participate in p38 activation, illustrating the complexity of this signaling pathway (16, 17). The MAP3Ks phosphorylate and activate the MAPK kinases (MAP2Ks) MKK6 and MKK3, which in turn phosphorylate the p38 MAPKs. In vertebrates, there are four isoforms of p38: p38α, p38β, p38γ, and p38δ. These isoforms are characterized by a Thr-Gly-Tyr (TGY) dual-phosphorylation motif (11). Once activated, p38s phosphorylate their substrates on serine/threonine residues. The list of reported downstream substrates of p38 continues to expand and includes other protein kinases and many transcription factors, suggesting its pos-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Cell Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. Phone and fax: 81-3-5803-4901. E-mail: shibuya.mcb@mri.tmd.ac.jp.

† Supplemental material for this article may be found at http://mcb.asm.org/.

‡ E.O., T.G., and A.S. contributed equally to this work.

▽ Published ahead of print on 23 November 2009.

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

sible role in regulating gene expression at the transcriptional level. Analysis of several of the downstream targets of p38 that are lineage specific or that play an essential role in development have indicated a central role of the p38 pathway in various developmental and differentiation processes (21).

In the present study, we report the novel finding that the p38β isoform is a functional partner of NLK. NLK was found to associate with, and to be specifically phosphorylated by, p38β. Depletion of either *Xenopus* p38β (xp38β) or xNLK resulted in defects in anterior neural development in *Xenopus* embryos, including the loss of eye and head structures. The phenotypes induced by depletion of endogenous xp38β were rescued by overexpression of wild-type xNLK but not by a nonphosphorylatable mutant of xNLK. These results reveal a new role of p38β in the phosphorylation and regulation of NLK function during anterior formation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction. The *Xenopus* and human p38α and β MAPK isoforms were amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) from cDNA templates prepared from *Xenopus* embryos and 293 cells, respectively, and were subcloned into the pCS2+ and pRK5 vectors. Each kinase-negative (KN) mutant was constructed by replacing the lysine residue with methionine: K53M in xp38β, K155M in murine NLK (mNLK), K89M in xNLK1, and K173M in xNLK2.

Embryo handling and morpholino oligonucleotides. Capped mRNAs were synthesized from linearized vectors using the mMessage Machine kit (Ambion). The morpholino oligonucleotides (MOs) (Gene Tools, LLC) used here were 5′-GCCCTTCCCTACACGGATGTCCCCC-3′ (xNLK1-MO) (22), 5′-GTAGATGTGCCGCAAAGAGACATTC-3′ (xNLK2-MO), 5′-CGCCCGCTCATCTTGCCCCGACCGG-3′ (xp38β-MO), and 5′-GACGTAAGATTGATTGGATGACATA-3′ (xp38α-MO). MOs and mRNAs were then injected into two animal blastomeres at the 2-cell stage for dissection of animal caps or into two animal dorsal blastomeres at the 8-cell stage for RT-PCR analysis and observation of embryo phenotypes. Animal cap explants or head regions of the injected embryos were dissected at the late blastula stage (stage [st.] 9) or tailbud stage (st. 25), respectively. The specificities of xp38β-MO, xp38α-MO, and xNLK2-MO were confirmed by their abilities to inhibit the translation of FLAG-tagged mRNAs (see Fig. S1 in the supplemental material).

RT-PCR analysis. Total RNA was prepared using TRIzol (Invitrogen). cDNA synthesis was carried out using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The sequences of the primer pairs have been described previously (6, 26) and are as follows: xp38β, 5′-GACAGCAGCATCACCCTCCTCA-3′ and 5′-TATCTGCTATGTATCCCGTGCCTTTTC-3′; xp38α, 5′-CATGCGACTGACGGGGACTC-3′ and 5′-GCTATCGGCTCATCATCAGG-3′; xNLK1, 5′-ATGCTGCTGTTTGACCCGCTGAAGCG-3′ and 5′-AGGGCACTCATGGCAGAAGGTT-3′; xNLK2, 5′-GCTGTGCAGGTTGGCGAGGGATTG-3′ and 5′-GCGGCGGCAGCTGAAGAGGAA-3′. *Xenopus* embryonic ornithine decarboxylase (ODC) or histone H4 (His) was used for normalization of cDNA samples.

Antibodies and cell lines. The following antibodies were used for immunoprecipitation and/or Western blot analysis: horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG (GE), horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (GE), horseradish peroxidase conjugated anti-rat IgG (GE), anti-T7 (Novagen), anti-hemagglutinin (anti-HA) (3F10; Roche), anti-FLAG (M2; Sigma), anti-p38β2 (Zymed), anti-p38α (Cell Signaling), anti-NLK (8), anti-p38 (Cell Signaling), anti-ph-p38 (Cell Signaling), and anti-ph-mNLK-S510 (Sigma). Also, we used following cell lines: HEK 293 cells, Neuro2A cells, PC12 cells, COS1 cells, and C2C12 cells. The growth medium of each cells is described by the American Type Culture Collection and Evangelopoulos et al. (4).

Protein identification by LC-MS/MS analysis. FLAG-mouse NLK was expressed in 293 cells, and NLK and associated proteins were recovered from cell extracts by immunoprecipitation with an anti-FLAG antibody. The NLK-associated complexes were digested with *Achromobacter* protease I (Takara), and the resulting peptides were analyzed using a nanoscale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system, as described previously (20).

In vitro kinase assay. 293 cells, COS-1 cells, or PC12 cells were transfected with the FLAG-NLK or FLAG-p38 expression plasmid. The lysates were prepared from the transfected cells using lysis buffer and were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody M2. Immunoprecipitates were incubated with bacterially expressed glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins in 30 μl kinase buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM $MgCl_2$, and 5 μCi of [γ-^{32}P]ATP at 30°C for 15 to 30 min. Phosphorylated substrates were subjected to SDS-PAGE and quantitated using a BAS 2500 image analyzer (Fujifilm).

RNA interference. For differentiation experiments, PC12 cells were subjected to 50 ng/ml nerve growth factor (NGF) treatment with fresh serum-free Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and were further incubated for 20 min. We designed small interfering RNAs (siRNAs) against mouse p38α (sense, 5′-GAAUAUCCGCUAAGGAUGC-3′) and p38β (sense, 5′-GCACGAGAACGUCAUAGGA-3′) mRNAs along with their corresponding antisense RNA oligonucleotides with two thymidine residues (dTdT) at the 3′ end of the sequence (Dharmacon). A commercial control siRNA (si*CONTROL* Non-Targeting siRNA #2; Dharmacon) was used for the negative-control siRNA. These siRNAs were transfected into PC12 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 48 h posttransfection, the medium was replaced with fresh serum-free DMEM to induce the differentiation of PC12 cells.

Whole-mount *in situ* hybridization. pBluescript vectors containing a cDNA fragment of xNLK1 encoding the C-terminal region (nucleotides 780 to 1344; GenBank accession no. AB071285), xNLK2 encoding the C-terminal region (nucleotides 2437 to 3280; GenBank accession no. AB490416), xp38β encoding the 3′ untranslated region (nucleotides 2275 to 2864; GenBank accession no. AB490414), or xp38α encoding the 3′ untranslated region (nucleotides 1257 to 1816; GenBank accession no. AB490415) were used as templates to generate digoxigenin (DIG)-labeled RNA probes using a DIG RNA labeling kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Whole-mount *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled RNA probes was performed on staged embryos essentially as described by Hemmati-Brivanlou et al. (5) with the following modifications. After manual removal of the vitelline membranes, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS), followed by dehydration by gradual methanol washing. Embryos were rehydrated with PBS containing 0.01% Triton X-100 and were then treated with proteinase K (2 μg/ml) for 10 min at ambient temperature, followed by postfixation with 4% PFA for 20 min. Hybridization was performed at 68°C with 50% formamide, 5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), 2× Denhardt's solution, 200 μg/ml tRNA, 0.01% Triton X-100, and 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1- propanesulfonate (CHAPS), containing 200 ng/ml of the digoxigenin-labeled RNA probe. Color detection was carried out with BM purple (Roche).

RESULTS

p38β MAPK associates with NLK. Our previous studies have shown that NLK is involved in forebrain development and neural differentiation in *Xenopus* (6, 26). However, there is no information about direct upstream regulators of NLK that may function in these processes. To explore potential regulators of NLK function, we initially performed a high-throughput analysis of proteins that coimmunoprecipitated with FLAG-tagged NLK in 293 cells using direct nanoflow liquid chromatography-coupled tandem MS (20). We identified the p38β MAPK isoform as a candidate protein that may physically interact with NLK (data not shown). Both p38β and NLK belong to the MAPK family; however, we have found no reports of direct regulation of a MAPK by another MAPK family member. The interaction between ectopically expressed p38β and NLK was confirmed in 293 cells (Fig. 1A and B). p38β could also be coimmunoprecipitated with a kinase-negative mutant of NLK, NLK-KN (Fig. 1C). This indicates that the association between NLK and p38β does not require NLK kinase activity. Immunoprecipitation analysis using an anti-NLK antibody confirmed the existence of an endogenous NLK and p38β complex in the mouse neuroblastoma cell line Neuro2A (Fig. 1D). Moreover, analysis of both ectopically expressed and endogenous molecules showed that p38α also

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

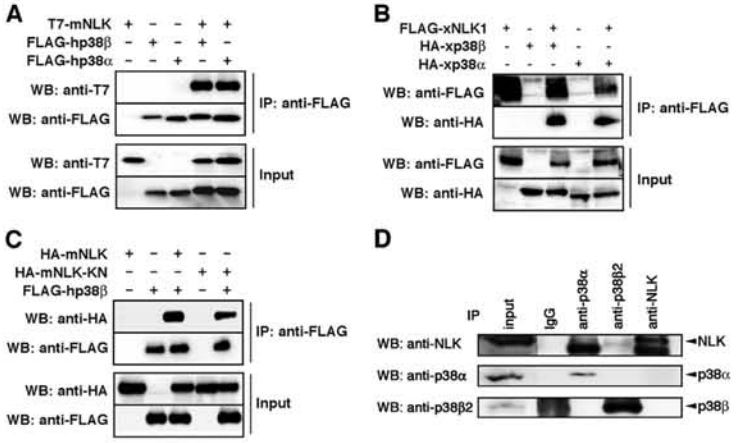


FIG. 1. p38 MAPK associates with NLK. (A to C) Interactions among ectopically expressed genes. 293 cells were transfected as indicated. Immunoprecipitates (IP) obtained using an anti-FLAG antibody were subjected to Western blotting (WB) with the indicated antibodies. +, present; −, absent. (A) Interaction between mNLK and human p38 (hp38β or hp38α). (B) Interaction between xNLK1 and xp38 (xp38β or xp38α). (C) Interaction between xp38 and kinase-negative mNLK (mNLK-KN). (D) Interactions among endogenous genes. Immunoprecipitates obtained from mouse neuroblastoma Neuro2A cells using the indicated antibodies were subjected to Western blotting with the indicated antibodies. Each specific antibody detected the respective endogenous protein, and the anti-NLK antibody detected NLK protein in immunoprecipitates using anti-p38β and anti-p38α.

associates with NLK (Fig. 1A, B, and D). Thus, these results suggest that p38α and β indistinguishably associate with NLK.

p38 phosphorylates a specific site in NLK. To examine whether p38 phosphorylates NLK or vice versa, we performed *in vitro* kinase assays using a catalytically inactive mutant of NLK-KN as a substrate. Figure 2A shows that p38β was barely phosphorylated by NLK. On the other hand, good phosphorylation of NLK by p38β was obtained in a kinase activity-dependent manner (Fig. 2C, lanes 1 to 4). There are two NLK species in *Xenopus* and zebrafish: NLK1 and NLK2 (6). Three of four putative p38 phosphorylation motifs, Ser-Pro or Thr-Pro, are conserved between these two NLKs. The putative phosphorylation site of NLK2 in the C terminus is conserved among many different species, including mice and humans (Fig. 2B; see also Fig. S2 in the supplemental material). We thus tested whether p38β phosphorylates either of these putative phosphorylation residues using NLK S/A or T/A mutants, in which the serine or threonine residues are replaced with alanine. A single amino acid replacement of Ser^{42} in xNLK1 with alanine (S42A) significantly abrogated phosphorylation of xNLK1 (Fig. 2D, lanes 5 to 8) *in vitro*, indicating that Ser^{42} is the specific site of xNLK1 phosphorylation by p38β. On the other hand, replacement of Ser^{510} of mNLK with alanine (GST-mNLK S510A) also caused a reduction in NLK phosphorylation by p38β (Fig. 2C). Moreover, Ser^{528} of xNLK2 was also specifically phosphorylated by p38β. (Fig. 2E). We confirmed that the same Ser residues were phosphorylated by p38α (Fig. 2F). These results indicate that the phosphorylation of the conserved Ser residue in different species is involved in the p38-mediated reaction.

We then asked whether NLK is activated by p38. Flag-mNLK was coexpressed in COS1 cells together with increasing amounts of TAK1/TAB1, an upstream MAPKKK of NLK (10, 18), or together with the constitutively active MKK6 (MKK6EE), an upstream MAPKK of p38 (1, 7). Flag-mNLK protein was immunoprecipitated from the cell lysates with an anti-Flag antibody, and kinase activities in the immunoprecipitates were measured. The NLK immunoprecipitates were assayed using bacterially expressed GST–LEF-1, which is a specific substrate for NLK (9). Both TAK1/TAB1 and MKK6EE enhanced NLK-mediated phosphorylation of GST–LEF-1 in a dose-dependent manner (Fig. 2G). When *in vitro* kinase assays were performed in the presence of SB203580 or SB20219, specific inhibitors of p38 (7), phosphorylation of GST-Lef1 by NLK was weak (Fig. 2H), suggesting that p38 is required for the observed activation of NLK. To evaluate the physiological relevance of p38 to activate NLK in the signaling pathway, we used siRNA to suppress expression of the endogenous p38 proteins in PC12 cells treated with NGF. We examined the effect of p38 siRNA on the phosphorylation level of STAT3, another substrate of NLK (22). As shown in Fig. 3A (left panels), NGF treatment enhanced the phosphorylation of STAT3. When endogenous p38 expression was suppressed with a p38 siRNA (sip38), NGF-induced phosphorylation of STAT3 was reduced compared with that in the control (si-Control) (Fig. 3A, right panels). We also confirmed that endogenous NLK expression was not affected with or without the p38 siRNA pretreatment (Fig. 3B). These data suggest that p38 is physiologically required for the activation of NLK.

p38β functions in anterior neural development. To assess the possible involvement of p38 in *Xenopus* embryonic development, we first examined the temporal and spatial expression patterns of xp38α, xp38β, xNLK1, and xNLK2 by RT-PCR analysis and whole-mount *in situ* hybridization (Fig. 4A and B; see also Fig. S3 in the supplemental material). We found that the expression of both xp38α and xNLK1 was relatively constant level throughout embryogenesis. On the other hand, xp38β was expressed from maternally deposited mRNA, and

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

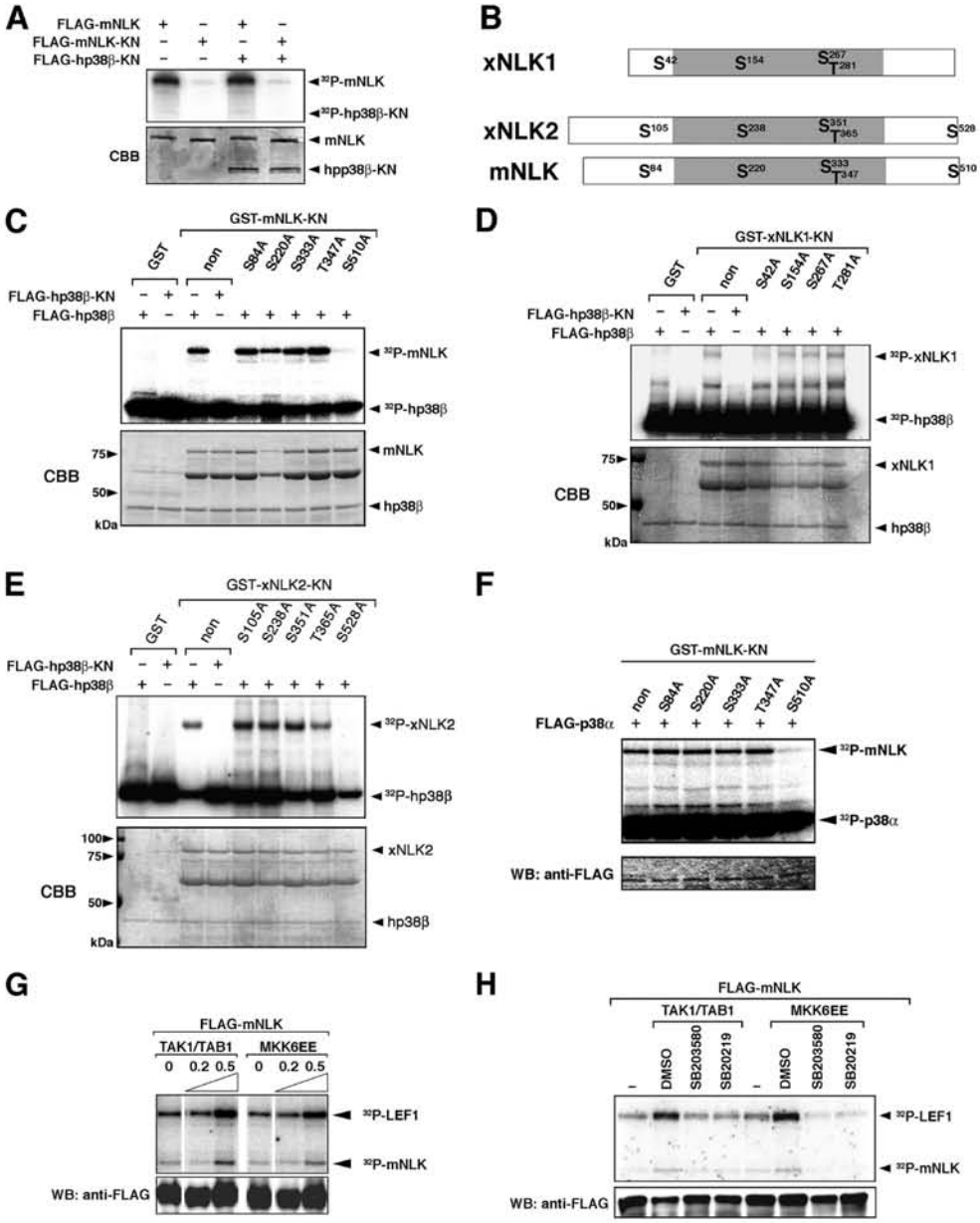


FIG. 2. p38β phosphorylates a specific site in NLK. (A) Phosphorylation of p38 by NLK. 293 cells were transfected with Flag-tagged genes and a constitutively active form of MKK6 (MKK6EE). Immunoprecipitates obtained with an anti-FLAG antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP. (B) Schematic of NLK genes. The putative p38 phosphorylation motifs are indicated as S and T. The kinase domain is shaded. (C to E) Phosphorylation of NLK by p38β. 293 cells were transfected with FLAG-tagged hp38β or hp38β-KN, together with MKK6EE. Immunoprecipitates obtained with an anti-FLAG antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP and bacterially expressed mNLK-KN and its mutants (C), xNLK1-KN and its mutants (D), or xNLK2-KN and its mutants (E). Phosphorylation and Coomassie brilliant blue (CBB) staining of each protein are indicated by arrowheads. (F) Phosphorylation of NLK by p38α. 293 cells were transfected with FLAG-tagged p38α. Immunoprecipitates obtained with an anti-FLAG antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP and bacterially expressed mNLK-KN and its mutants. The phosphorylation of mNLK and p38α is indicated by arrowheads. (G and H) COS1 cells were transfected with FLAG-tagged mNLK, together with TAK1/TAB1 or MKK6EE. Immunoprecipitates obtained with an anti-FLAG antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP and bacterially expressed LEF1 as a substrate. (G) Enhancement of phosphorylation by TAK1/TAB1 or MKK6 (MKK6EE). Numbers indicate amounts of transfected genes (μg). (H) Preincubation with SB203580 and SB20219, specific inhibitors of p38 activity, reduced phosphorylation of LEF1.

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

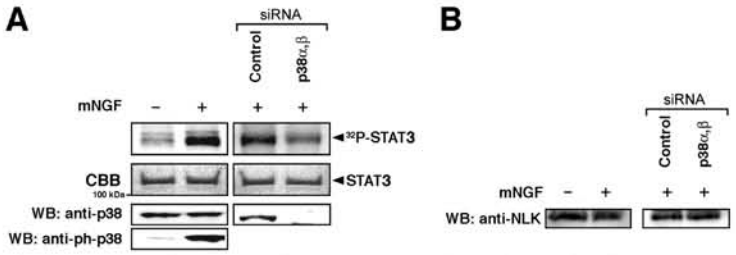


FIG. 3. p38 is required for the activation of NLK. (A) PC12 cells were treated with 50 ng/ml mNGF. Immunoprecipitates obtained with an anti-NLK antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP and bacterially expressed STAT3 as a substrate of NLK. anti-ph-p38, anti-phospho-antibody for p38. (Left lanes) Phosphorylation of STAT3 and endogenous p38 following NGF treatment. (Right lanes) PC12 cells were pretreated with the control siRNA or a p38α, β siRNA. Phosphorylation and Coomassie brilliant blue (CBB) staining of STAT3 are indicated by arrowheads. (B) Effects of p38 siRNAs on NLK expression. p38-siRNAs did not alter NLK expression.

its zygotic expression was induced after the neurula stage, especially in the head region of the embryo. The expression of xNLK2 was relatively weak compared to the expression of xNLK1. As shown in Fig. 4B, symmetrical expression of these genes was detected in both the anterior and posterior neural tubes (two stripes along the lateral neural plate, two eye primordial, forebrain, cement gland, and posterior neural tubes) at the late neural stage (stage 19). To address the physiological relationship between NLK and p38, we synthesized antisense morpholino oligonucleotides (MOs) against xNLK1, xNLK2, xp38β, and xp38α (see Materials and Methods). By Western blot analysis, we confirmed that injection of the xNLK1-, xNLK2-, xp38β- and xp38α-MOs specifically reduced the expression of these proteins (22) (see Fig. S1 in the supplemental material). When xp38β-MO was injected into the anterior region, which develops mainly into neuroectodermal tissues and head structure, the resulting phenotype was similar to that resulting from injection of the xNLK1- or xNLK2-MO, namely, incomplete formation of the eyes (Fig. 4C; see also Fig. S4 and S5 in the supplemental material) and reduced expression of anterior markers such as Otx2, Pax6, Lhx2, Rx, and Six3 (Fig. 4D; see also Fig. S4 and S5 in the supplemental material). On the other hand, no apparent phenotype was detected following injection of as much as 20 ng of xp38α-MO or a control MO. The anterior defects induced by xp38β-MO were rescued by coinjection of wild-type xp38β mRNA, but not by kinase-inactive or wild-type xp38α mRNA (Fig. 5). These results suggest that xp38β is specifically involved in anterior formation in *Xenopus* embryos.

p38 regulates NLK function through Ser phosphorylation. To further examine the phosphorylation of specific Ser residues in NLK by p38, we generated polyclonal antibodies against mouse NLK phospho-Ser^{510}. Wild-type mNLK or mutant mNLK-S510A was expressed in C2C12 cells together with p38β and the constitutively active MKK6 (MKK6EE), and cell lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-Ser^{510}. A band corresponding to wild-type mNLK could be detected in cells expressing wild-type mNLK, but not in those expressing mNLK-S510A (Fig. 6A). Significantly smaller amounts of phospho-Ser^{510} mNLK were detected in *Xenopus* embryos treated with xp38β-MO, whereas phospho-Ser^{510} mNLK amounts were unaffected in embryos treated with xp38α-MO or a control MO (Fig. 6B). These results demonstrate that endogenous p38β phosphorylates the specific Ser residue of NLK.

We next examined whether xp38β functions upstream of xNLK. We found that anterior defects induced by xp38β-MO could be rescued by coinjection with wild-type xNLK1 or xNLK2 mRNA (Fig. 7A, lanes 3 and 5), but not with mRNA encoding nonphosphorylatable mutants (xNLK1-S42A or xNLK2-S528A) (Fig. 7A, lanes 4 and 6), indicating that anterior formation depends on the phosphorylation of xNLK. In addition, anterior defects induced by xNLK1- or xNLK2-MO were not rescued by either nonphosphorylatable xNLK-SA mutant (Fig. 7B, lanes 4 and 9). In contrast, coinjection with xp38β mRNA failed to rescue the defects in anterior formation caused by depletion of xNLK1 but could rescue those caused by depletion of xNLK2 (Fig. 7B, lanes 5 and 10). We also confirmed that the anterior defect caused by xNLK1- or xNLK2-MO was redundantly rescued by xNLK2 or xNLK1 mRNA, respectively (Fig. 7C, lanes 3 and 5). These results suggest that xNLK1 is necessary for inducing anterior formation downstream of xp38β signaling in *Xenopus*. We examined this further using the xNLK1-S42D, xNLK2-S528D, and mNLK-S510D mutants, in which the Ser residues of NLK were replaced with an aspartic acid, mimicking the phosphorylated serine. We found that the anterior defects induced by xNLK1-MO or xNLK2-MO could be rescued by coinjection with small amounts of xNLK1-S42D or xNLK2-S528D mRNA, respectively, but not by coinjection with wild-type NLK mRNA (Fig. 7D, lanes 2 to 7). The anterior defects caused by xp38β-MO were also rescued by coinjection with NLK SD mutant mRNA (Fig. 7D, lanes 8 to 12). It is noteworthy that mutation of each phosphorylation site in mNLK and xNLK1 to Ala resulted in reduced kinase activity in the cultured cells (Fig. 7E). These results suggest that the sites of p38 phosphorylation in NLK are essential for its function and catalytic activity.

DISCUSSION

Our previous studies have shown that NLK induces the expression of anterior neural markers in animal pole explants (6). In the present study, we identified the MAPK family member p38 as a novel activator of the serine/threonine kinase NLK, and we show that p38-NLK signaling controls anterior

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

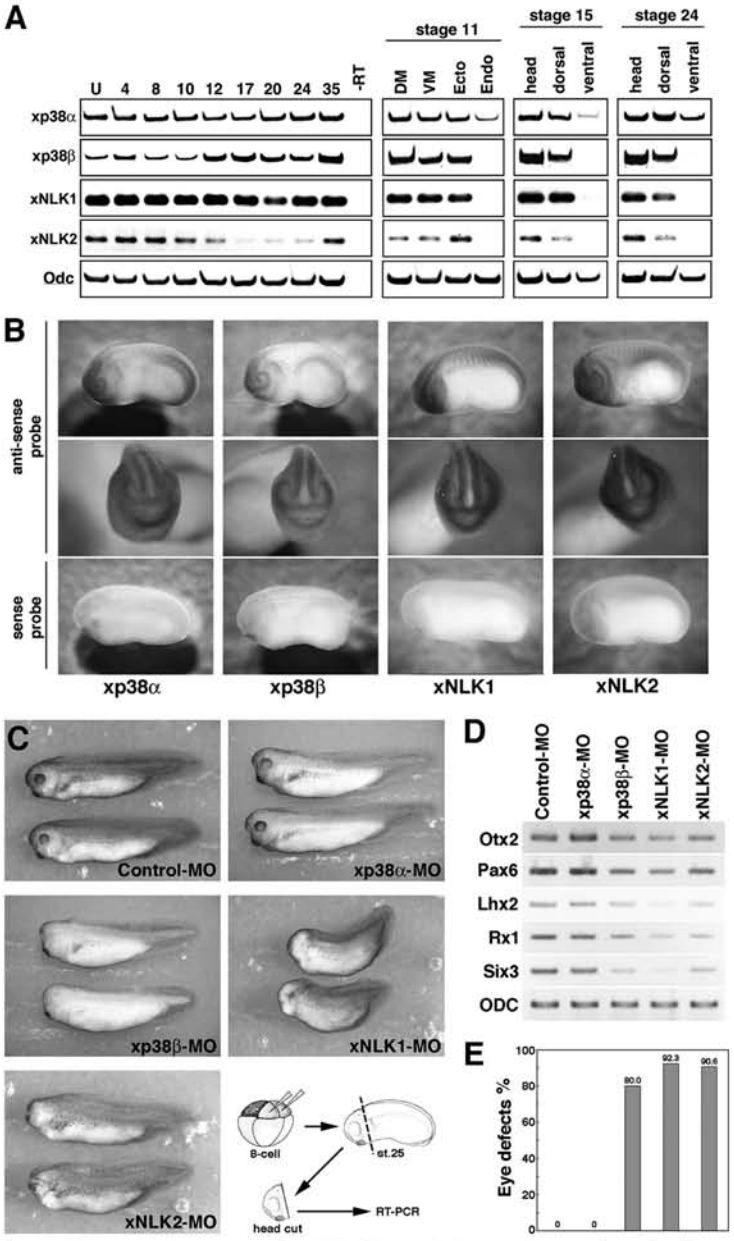


FIG. 4. p38β functions in anterior neural development. (A) RT-PCR revealed temporal expression of xp38α, xp38β, xNLK1, and xNLK2. Numbers above lanes indicate developmental stages; U, unfertilized eggs. Semiquantitative RT-PCR to determine spatial expression was also performed using different dissections of embryos at several stages (stages 11, 15, and 24). DM, dorsal marginal zone; VM, ventral marginal zone; Ecto, ectoderm; Endo, endoderm. (B) Whole-mount *in situ* hybridization showed that these genes are similarly expressed in the head and on the dorsal side (stage 19). The sense RNA probe for each gene was used as a negative control (bottom panels). Images are lateral views, with the anterior ends toward the left (top and bottom panels), and front views (center panels) of head regions. (C to E) Characterization of each morphant. A control morpholino oligonucleotide (Control-MO) (20 ng), xp38α-MO (20 ng), xp38β-MO (20 ng), xNLK1-MO (10 ng), and xNLK2-MO (40 ng) were injected into two animal dorsal blastomeres of 8-cell-stage embryos. (C) Phenotypes of injected embryos at stage 35. Methods for RT-PCR analysis of anterior neural marker genes are indicated in the bottom right panel. (D) Expression of anterior neural marker genes Otx2, Pax6, Lhx2, Rx1, and Six3 in each morphant. ODC (ornithine decarboxylase) was used as a loading control. Total RNAs from the heads of the injected embryos at stage 25 were prepared. (E) Proportion of embryos with eye defects for each morphant in panel C. Each bar corresponds to the lane in panel D with which it is lined up.

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

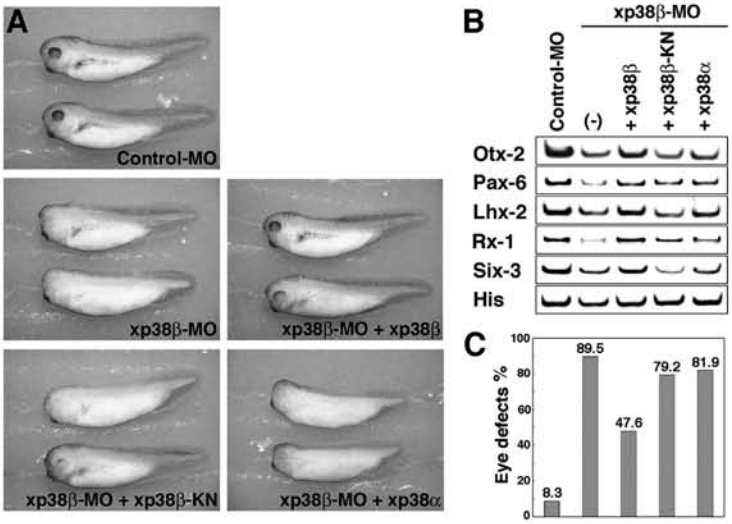


FIG. 5. p38β and its kinase activity are necessary for anterior development. A control MO (20 ng) or xp38β-MO (20 ng) was coinjected with xp38β (500 pg), xp38β-KN (500 pg), or xp38α (500 pg) mRNA. (A) Phenotypes of injected embryos at stage 35. (B) RT-PCR analysis of anterior neural marker genes. His (histone H4) was used as a loading control. (C) Proportion of embryos with eye defects for each morphant in panel A. Each bar corresponds to the lane in panel B with which it is lined up.

neural development in *Xenopus*. Depletion of xNLK1, xNLK2, or xp38β resulted in severe defects in anterior neural development, including loss of eye formation. The defects induced by depletion of xp38β were rescued by expression of wild-type xNLK1 or xNLK2, but not by either of two nonphosphorylatable mutants (xNLK1-S42A or xNLK2-S528A). Interestingly, coinjection with xp38β mRNA failed to rescue the defects in anterior formation caused by depletion of xNLK1 but could rescue those caused by depletion of xNLK2 (Fig. 7B). Our studies demonstrated that the expression of xNLK2 was considerably weaker than that of xNLK1 (Fig. 4A). Moreover,

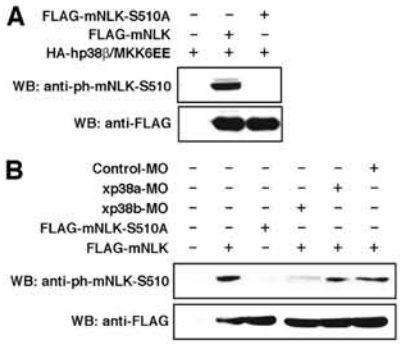


FIG. 6. p38 regulates NLK function through Ser phosphorylation. (A) C2C12 cells were transfected as indicated. anti-ph-mNLK-S510 is the anti-phospho-antibody for mNLK-S510. Whole-cell lysates were subjected to Western blotting using the indicated antibodies. (B) A control MO (20 ng), xp38α-MO (20 ng), or xp38β-MO (20 ng) was coinjected with FLAG-tagged mNLK (50 pg) or mNLK-S510A (50 pg) mRNA as described in Materials and Methods. Lysates from the heads of the injected embryos at stage 25 were subjected to Western blotting using the indicated antibodies.

xNLK1 and xNLK2 function redundantly in anterior formation, such that when xNLK2 is depleted, the xNLK1 signal mediated by p38β can compensate (Fig. 7C). Thus, these results indicate that xp38β functions upstream of xNLK in the development of anterior neural structures. Our results demonstrate the existence of a new molecular mechanism involving p38-NLK signaling in the regulation of endogenous anterior tissue development, including eye formation, in *Xenopus*.

We identified the p38β MAPK isoform as a protein that physically interacts with NLK. In *Xenopus*, three isoforms of the p38 family have been identified: xp38α, xp38β, and xp38γ (23, 25). Studies of mammalian p38α and p38β molecules suggest that these isoforms may overlap in their biological functions (16, 17). On the other hand, it is well known that the function of p38γ is different from those of p38α and p38β (16, 17). Indeed, a previous report indicates that xp38γ, but not xp38α or xp38β, promotes the meiotic G_2/M transition in *Xenopus* (23). Therefore, we focused on the function of xp38α and xp38β in *Xenopus* development. Interestingly, we found that depletion of xp38α did not affect anterior formation or the expression of any anterior marker genes, whereas depletion of endogenous xp38β blocked both anterior formation and the induction of these markers (Fig. 4). Thus, xp38β appears to be selectively responsible for regulating certain aspects of anterior formation via the activation of xNLK. Recently, Keren et al. reported that p38α regulates the expression of xMyf5 during *Xenopus* development (13). Depletion of xp38α by an MO was not reported to have any effect on anterior formation, but this may be due to the limited function of xp38α in *Xenopus*. On the other hand, Beardmore et al. reported that p38β knockout mice are viable, with no obvious health problems (2). They speculate that the reason for this mild phenotype could be compensation between p38α and p38β isoforms. Although there are discrepancies in that p38α could not compensate for the

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

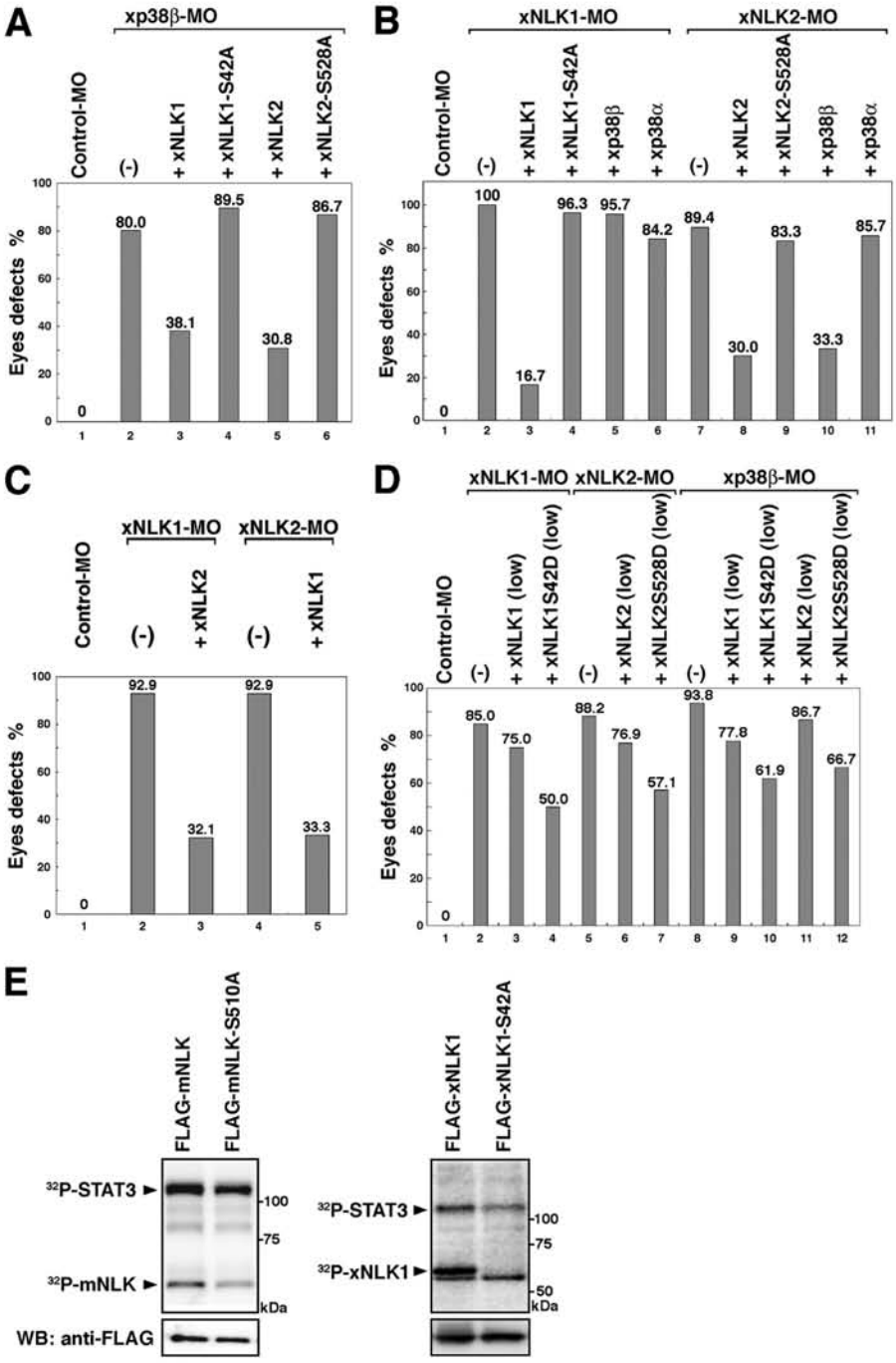


FIG. 7. The Ser phosphorylation of NLK by p38 is essential for anterior formation. (A to D) Phenotypes of injected embryos were observed at stage 35. Each graph shows the proportion of embryos with eye defects for each morphant. Each MO or mRNA was injected as described in Materials and Methods. (A) A control MO (20 ng) or xp38β-MO (20 ng) was coinjected with xNLK1 (62.5 pg), xNLK2 (50 pg), xNLK1-S42A (62.5 pg), or xNLK2-S528A (50 pg) mRNA. (B) A control MO (20 ng), xNLK1-MO (10 ng), or xNLK2-MO (20 ng) was coinjected with xNLK1 (62.5 pg), xNLK2 (50 pg), xNLK1-S42A (62.5 pg), xNLK2-S528A (50 pg), xp38β (500 pg), or xp38α (500 pg) mRNA. (C) A control MO (20 ng), xNLK1-MO (10 ng), or xNLK2-MO (40 ng) was coinjected with xNLK1 (62.5 pg) or xNLK2 (50 pg) mRNA. (D) A control MO (20 ng), xp38β-MO (20 ng), xNLK1-MO (10 ng), or xNLK2-MO (20 ng) was coinjected with low-dose xNLK1 (10 pg), xNLK1-S42D (10 pg), xNLK2 (10 pg), or xNLK2-S528D (10 pg) mRNA. (E) 293 cells were transfected with Flag-tagged NLKs and SA mutants (left panels for mNLK, right panels for xNLK1). Immunoprecipitates obtained with an anti-FLAG antibody were incubated with [γ-^{32}P]ATP and bacterially expressed STAT3 as a substrate of NLK. The phosphorylation of STAT3 and NLK itself is indicated by arrowheads.

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

function of p38β in *Xenopus* anterior formation in contrast to the function in mice, our studies of *Xenopus* may provide the first indication of p38β function in embryogenesis, and they provide the first evidence of isoform-specific functional differences between p38α and p38β family members. However, the details of how p38β specifically contributes to early developmental processes in *Xenopus* embryos remain to be determined and will require additional study.

We have previously demonstrated that the MAP3K TAK1 activates the MAPK-like kinase NLK in a signaling pathway (9, 18). Since TAK1 does not directly interact with NLK, it was assumed that a known molecule, such as a MAPKK, may function upstream of NLK in this pathway. Kanei-Ishii et al. reported that HIPK2 could bind to and activate NLK in the TAK1 signaling pathway (12). However, they failed to detect activation of HIPK2 kinase activity by TAK1. In this study, we demonstrated that p38 MAPK directly interacts with NLK and regulates its kinase activity. Moreover, it is well known that p38 MAPK is activated by MAP3K TAK1 (14). Actually, we found that NLK was activated by activated TAK1 and MKK6 (Fig. 2G) and that this activation was inhibited in the presence of p38-specific inhibitors (Fig. 2H). Taken together, these findings provide the first evidence that NLK functions as a downstream kinase of a MAPK rather than as a MAPK-like kinase.

We demonstrated that p38 directly phosphorylates NLKs at specific sites and that this leads to their activation. We found that NLK1, a gene conserved in *Xenopus* and zebrafish, and NLK2, a gene conserved among many species, are each phosphorylated on different sites by p38. We also found that each p38 phosphorylation site is similarly required for activation of NLK. Interestingly, the p38 phosphorylation sites in the two NLK molecules are localized to the N-terminal or C-terminal region. This suggests that the position of the p38 phosphorylation site in the NLK molecule is structurally critical. It is likely that the specific site in NLK is phosphorylated by p38 and that phosphorylation at the terminal region of the molecule may suffice to induce its activation. However, further study will be required to understand the precise molecular mechanisms by which p38 regulates the activities of NLK1 and NLK2.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Matsumoto for valuable discussions, H. Nishitoh and T. Maruyama for technical advice, and M. Lamphier for critical reading of the manuscript.

This work was supported by Grants-in-Aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan.

REFERENCES

1. **Alonso, G., C. Ambrosino, M. Jones, and A. R. Nebreda.** 2000. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. J. Biol. Chem. **275:**40641–40648.
2. **Beardmore, V. A., H. J. Hinton, C. Eftychi, M. Apostolaki, M. Armaka, J. Darragh, J. McIlrath, J. M. Carr, L. J. Armit, C. Clacher, L. Malone, G. Kollias, and J. S. C. Arthur.** 2005. Generation and characterization of p38b (MAPK11) gene-targeted mice. Mol. Cell. Biol. **25:**10454–10464.
3. **Brott, B. K., B. A. Pinsky, and R. L. Erikson.** 1998. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95:**963–968.
4. **Evangelopoulos, M. E., J. Weis, and A. Kruttgen.** 2005. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. Oncogene **24:** 3309–3318.
5. **Hemmati-Brivanlou, A., D. Frank, M. E. Bolce, B. D. Brown, H. L. Sive, and R. M. Harland.** 1990. Localization of specific mRNAs in Xenopus embryos by whole-mount in situ hybridization. Development **110:**325–330.
6. **Hyodo-Miura, J., S. Urushiyama, S. Nagai, M. Nishita, N. Ueno, and H. Shibuya.** 2002. Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in Xenopus development. Genes Cells **7:**487–496.
7. **Inoue, T., D. Hammaker, D. L. Boyle, and G. S. Firestein.** 2005. Regulation of p38 MAPK by MAPK kinases 3 and 6 in fibroblast-like synoviocytes. J. Immunol. **174:**4301–4306.
8. **Ishitani, T., S. Kishida, J. Hyodo-Miura, N. Ueno, J. Yasuda, M. Waterman, H. Shibuya, R. T. Moon, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2003. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. Mol. Cell. Biol. **23:**131–139.
9. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2003. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. Mol. Cell. Biol. **23:**1379–1389.
10. **Ishitani, T., J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, and K. Matsumoto.** 1999. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. Nature **399:**798–802.
11. **Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ulevitch, and J. Han.** 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. J. Biol. Chem. **272:**30122–30128.
12. **Kanei-Ishii, C., J. Ninomiya-Tsuji, J. Tanikawa, T. Nomura, T. Ishitani, S. Kishida, K. Kokura, T. Kurahashi, E. Ichikawa-Iwata, Y. Kim, K. Matsumoto, and S. Ishii.** 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. Genes Dev. **18:**816–829.
13. **Keren, A., E. Bengal, and D. Frank.** 2005. p38 MAP kinase regulates the expression of XMyf5 and affects distinct myogenic programs during Xenopus development. Dev. Biol. **288:**73–86.
14. **Keren, A., Y. Tamir, and E. Bengal.** 2006. The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. Mol. Cell Endocrinol. **252:**224–230.
15. **Kortenjann, M., M. Nehls, A. J. Smith, R. Carsetti, J. Schuler, G. Kohler, and T. Boehm.** 2001. Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for Nemo-like kinase, Nlk. Eur. J. Immunol. **31:**3580–3587.
16. **Kumar, S., J. Boehm, and J. C. Lee.** 2003. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. Nat. Rev. Drug Discov. **2:**717–726.
17. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol. Rev. **81:**807–869.
18. **Meneghini, M. D., T. Ishitani, J. C. Carter, N. Hisamoto, J. Ninomiya-Tsuji, C. J. Thorpe, D. R. Hamill, K. Matsumoto, and B. Bowerman.** 1999. MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in Caenorhabditis elegans. Nature **399:**793–797.
19. **Mirkovic, I., K. Charish, S. M. Gorski, K. McKnight, and E. M. Verheyen.** 2002. Drosophila nemo is an essential gene involved in the regulation of programmed cell death. Mech. Dev. **119:**9–20.
20. **Natsume, T., Y. Yamauchi, H. Nakayama, T. Shinkawa, M. Yanagida, N. Takahashi, and T. Isobe.** 2002. A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. Anal. Chem. **74:**4725–4733.
21. **Nebreda, A. R., and A. Porras.** 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. Trends Biochem. Sci. **25:**257–260.
22. **Ohkawara, B., K. Shirakabe, J. Hyodo-Miura, R. Matsuo, N. Ueno, K. Matsumoto, and H. Shibuya.** 2004. Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. Genes Dev. **18:**381–386.
23. **Perdiguero, E., M. J. Pillaire, J. F. Bodart, F. Hennersdorf, M. Frodin, N. S. Duesbery, G. Alonso, and A. R. Nebreda.** 2003. Xp38gamma/SAPK3 promotes meiotic G(2)/M transition in Xenopus oocytes and activates Cdc25C. EMBO J. **22:**5746–5756.
24. **Rocheleau, C. E., J. Yasuda, T. H. Shin, R. Lin, H. Sawa, H. Okano, J. R. Priess, R. J. Davis, and C. C. Mello.** 1999. WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in C. elegans. Cell **97:**717–726.
25. **Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt, and A. R. Nebreda.** 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. Cell **78:**1027–1037.
26. **Satoh, K., J. Ohnishi, A. Sato, M. Takeyama, S. Iemura, T. Natsume, and H. Shibuya.** 2007. Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in Xenopus development. Mol. Cell. Biol. **27:**7623–7630.
27. **Yamada, M., B. Ohkawara, N. Ichimura, J. Hyodo-Miura, S. Urushiyama, K. Shirakabe, and H. Shibuya.** 2003. Negative regulation of Wnt signalling by HMG2L1, a novel NLK-binding protein. Genes Cells **8:**677–684.
28. **Yamada, M., J. Ohnishi, B. Ohkawara, S. Iemura, K. Satoh, J. Hyodo-Miura, K. Kawachi, T. Natsume, and H. Shibuya.** 2006. NARF, an nemo-like kinase (NLK)-associated ring finger protein regulates the ubiquitylation and degradation of T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). J. Biol. Chem. **281:**20749–20760.

Downloaded from mcb.asm.org at TOKYO IKASHIKA DAIGAKU on January 14, 2010

MEMO

分子代謝学分野

小川 佳宏

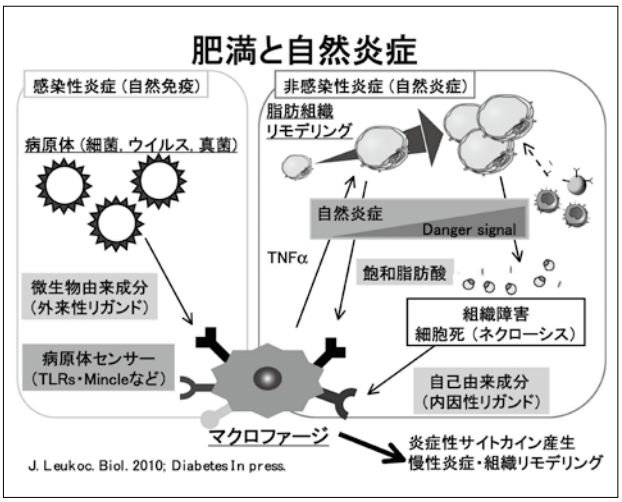
医歯学総合研究科・器官システム制御学系専攻
内分泌学・教授

1）ご研究の課題名

● 脂肪組織の慢性炎症に関する研究

我々は既に、肥満に伴って肥大化脂肪細胞より放出される飽和脂肪酸が、TLR4を介して脂肪組織に浸潤するマクロファージを活性化し、脂肪組織における慢性炎症を増悪することを明らかにした。本研究では、肥満の脂肪組織における新たな炎症関連分子の同定を目的として、脂肪細胞とマクロファージの共培養のcDNAマイクロアレイ解析を行った。共培養により発現が増加し、マクロファージ選択的に発現する遺伝子よりmacrophage-inducible c-type lectin（Mincle）に注目した。TLR4シグナルを欠損するマクロファージでは、飽和脂肪酸や共培養によるMincleの誘導が著しく抑制された。骨髄マクロファージを用いた検討により、MincleはM1マクロファージに選択的に発現した。遺伝性および食餌誘導性肥満マウスの脂肪組織においてMincleの著明な発現亢進が認められたが、TLR4シグナル欠損マウスでは有意な上昇を認められなかった。ヒト皮下脂肪組織においてもMincle遺伝子発現はBMIと正の相関が認められた（r = 0.598）。脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いて、脂肪組織マクロファージにおける新たな炎症調節分子としてMincleを同定した。Mincleは真菌や結核菌に対する病原体センサーとして機能するため、脂肪組織の慢性炎症の病態形成における病態生理的意義が示唆された。

2）



3）研究内容についての英文要約

● Increased expression of Mincle in adipose tissue of obese mice and humans

The aim of this study was to identify the molecule（s）activated in adipose tissue macrophages in obesity. We performed cDNA microarray analysis of coculture of 3T3-L1 adipocytes and RAW264 macrophages. Cultured adipocytes and macrophages and the adipose tissue of obese mice and humans were used to examine mRNA and protein expression. We found that macrophage-inducible C-type lectin（Mincle）, a type II transmembrane C-type lectin, is induced selectively in macrophages during the interaction between adipocytes and macrophages. Treatment with palmitate, a major saturated fatty acid released from 3T3-L1 adipocytes, induced Mincle mRNA expression in macrophages at least partly through the TLR4/NF-κB pathway. Mincle mRNA expression was increased in parallel with macrophage markers in the adipose tissue of obese mice and humans. The obesity-induced increase in Mincle mRNA expression was markedly attenuated in C3H/HeJ mice with defective TLR4 signaling relative to control C3H/HeN mice. Notably, Mincle mRNA was expressed in

bone marrow cell（BMC）-derived proinflammatory M1 macrophages rather than in BMC-derived anti-inflammatory M2 macrophages in vitro. Our data suggest that Mincle is induced in adipose tissue macrophages in obesity at least partly through the saturated fatty acids/TLR4/NF-κB pathway, thereby suggesting its pathophysiologic role in obesity-induced adipose tissue inflammation.

4）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

若手研究者、特にポスドクレベルの研究者の育成

5）英文原著論文

◎N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. Diabetes Care 33: e7, 2010.

◎M. Tanaka, T. Suganami, S. Sugita, Y. Shimoda, M. Kasahara, S. Aoe, M. Takeya, S. Takeda, Y. Kamei, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration under unilateral ureteral obstruction. Endocr. J. 57: 61-72, 2010.

◎Y. Kamei, T. Suganami, T. Ehara, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto, S. Miura, O. Ezaki, M. Okano, Y. Ogawa. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. Obesity 18: 314-321, 2010.

◎Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B.R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, Y. Ogawa. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle. Biochem. J. 427: 171-178, 2010.

◎T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, P. A. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro: role of a disintegrin and metalloproteinase 17. Obesity 18: 1888-1894, 2010.

◎T. Suganami & Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. J. Leukoc. Biol. 88: 33-39, 2010.

◎K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 398: 284-289, 2010.

Y. Okazaki, N. Ohshima, I. Yoshizawa, Y. Kamei, S. Mariggiò, K. Okamoto, M. Maeda, Y. Nogusa, Y. Fujioka, T. Izumi, Y. Ogawa, Y. Shiro, M. Wada, N. Kato, D. Corda, N. Yanaka. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. J. Biol. Chem. 285: 27652-27663, 2010.

◎A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. Diabetes 59: 2495-2504, 2010.

◎N. Satoh-Asahara, T. Suganami, T. Majima, K. Kotani, Y. Kato, R. Araki, K. Koyama, T. Okajima, M. Tanabe, M. Oishi, A. Himeno, S. Kono, A. Sugawara, M. Hattori, Y. Ogawa, A. Shimatsu; the Japan Obesity Metabolic Syndrome Study（JOMS）Group. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2010 Nov 4. [Epub ahead of print]

◎M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, Y. Shimoda, M. Tanaka, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. Diabetes in press.

6）総説ならびに著書

蜂屋瑠見、菅波孝祥、小川佳宏:「炎症とメタボリックシンドローム」:小児科診療 第73巻,第2号,309-314,2010

蜂屋瑠見、菅波孝祥、小川佳宏:「メタボリックシンドロームとToll-like Receptors」:ファルマシア 2月号,124-128,2010

津田直人、菅波孝祥、伊藤綾香、小川佳宏:「脂肪組織リモデリング」:International Review of Diabetes Vol.2,No.1,26-31,2010

小川佳宏、佐藤哲子:「肥満の発症機構」:肥満と消化器疾患,2-14,2010

伊藤綾香、菅波孝祥、小川佳宏:「Toll-like receptor」:Vascular Medicine,62-65,2010

山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏:「肥満脂肪組織と合併症形成機構」:治療学,18-23,2010

姫野亜紀裕、佐藤哲子、小川佳宏:「ニコチンの体重に及ぼす影響について」:内分泌・糖尿病・代謝内科,282-286,2010

小川佳宏:「肥満と病原体センサー」:炎症と免疫,36-41,2010

津田直人、菅波孝祥、小川佳宏:「内分泌器官としての脂肪組織とメタボリックシンドローム」:臨床検査 Vol.54,No.6,665-669,2010

小川佳宏:「栄養のサイエンス:栄養シグナルとしての脂肪酸」:成人病と生活習慣病　5,534-537,2010

山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏:「感染症、炎症と2型糖尿病(総論)」:Diabetes Frontier No.3,Vol.21,320-325,2010

田中都、菅波孝祥、小川佳宏:「脂肪組織における炎症の意義」:総合臨床9 Vol.54,No.9,1895-1899,2010

田中都、菅波孝祥、小川佳宏:「レプチン」:Cardio Diabetic Frontier〜心血管病と糖尿病を総合的に理解する新たな視点を求めて〜,101-106,2010

小川佳宏:「メタボリックシンドロームと慢性炎症」:糖尿病学の進歩2010,120-124,2010

田中都、菅波孝祥、小川佳宏:「アディポサイトカインを介した臓器間代謝情報ネットワークと高血圧」:血圧 第17巻,第10号,19-22,2010

山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏:「メタボリックシンドロームと酸化ストレス・炎症」:Cardiovascular Frontier Vol.1,No.3,39-45,2010

小川佳宏編集:「異所性脂肪:メタボリックシンドロームの新常識」日本医事新報社

7）平成22年度までの自己評価

当分野の中心的な研究課題である「慢性炎症」については英文総説（J. Leukoc. Biol. 88: 33-39, 2010）を発表するなど一定の研究活動を継続することができた。当分野の若手研究者は順調に成長しており、少しずつ研究成果が挙がりつつある。次年度以降にはこれらの研究成果を確かなものとして情報発信できるようにやっていきたいと考えている。

8）学会発表（英文）

◎Y. Ogawa: Adipose tissue Remodeling: 14th International of Endocrinology（ICE2010）,2010.3.30-31,KYOTO

9）学会発表（和文）

小川佳宏:「栄養のサイエンス:栄養シグナルとしての脂肪酸」:第44回日本成人病（生活習慣病）学会,2010.1.9,東京

佐藤哲子、姫野亜紀裕、橡谷真由、佐々木洋介、村中和哉、山田和範、菅波孝祥、小川佳宏、島津章:「肥満・2型糖尿病の心血管病リスクとしての末梢血単球M1/M2phenotypeの病態意義の検討-ピオグリタゾンの効果-」:第53回日本糖尿病学会年次学術集会,2010.5.27-29,岡山

佐々木洋介、佐藤哲子、姫野亜紀裕、橡谷真由、村中和哉、山田和範、菅波孝祥、小川佳宏、島津章:「肥満メタボリック症候群の末梢血単球M1/M2タイプに対するエイコサペンタエン酸の効果」:第53回日本糖尿病学会年次学術集会,2010.5.27-29,岡山

小川佳宏:「メタボリックシンドロームと慢性炎症」:第93回日本消化器病学会中国支部例会,2010.6.12,山口

小川佳宏:「肥満と慢性炎症」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

田中都、菅波孝祥、西條美佐、築地信、亀井康富、小川佳宏:「骨髄Bリンパ球分化に及ぼす中枢レプチン作用」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

市岡誠之、菅波孝祥、津田直人、田中都、白川伊吹、平田陽一郎、宮本恵宏、佐田政隆、亀井康富、小川佳宏:「肥満の脂肪組織における新たな炎症関連遺伝子の探索」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

江原達弥、亀井康富、金井沙綾香、高橋真由美、菅波孝祥、小川佳宏:「脂肪合成遺伝子のエピジェネティクス制御:DNAメチル化に着目して」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

亀井康富、江原達弥、菅波孝祥、金井沙綾香、高橋真由美、畑田出穂、岡野正樹、小川佳宏:「肥満とDNAメチル化:DNAメチル化酵素遺伝子改変マウスによる検討」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

杉田聡、亀井康富、赤池史子、菅波孝祥、金井沙綾香、真鍋康子、藤井宣晴、三浦進司、江崎治、小川佳宏:「骨格筋受容体における核内受容体RXRγの糖代謝促進作用」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

佐藤歩美、伊藤美智子、中久木正則、河野浩之、水口清、菅波孝祥、小川佳宏:「エイコサペンタエン酸の抗肥満作用と抗肝脂肪酸合成作用の関連」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

10）外部資金の獲得状況

科学研究費補助金、 基盤B
研究題目:脂肪組織理モデリングと脂肪毒性の分子機構の解明
代表:小川佳宏
期間:平成20年－平成22年
研究費総額:1430万円

科学研究費補助金、 新学術領域
研究題目:メタボリックシンドロームにおける内因性リガンドと病原体センサーの機能的意義の解明
代表:小川佳宏
期間:平成21年－平成25年
研究費総額:16480万円

科学研究費補助金、 挑戦的萌芽
研究題目:新生児期の栄養環境のエピゲノム記憶と成人期における疾患感受性の分子機構の解明
代表:小川佳宏
期間:平成22年
研究費総額:300万円

厚労省科学研究費補助金、 難治性疾患克服研究事業
研究題目:中枢性摂食異常症に関する調査研究
代表:小川佳宏
期間:平成20年－平成22年
研究費総額:1050万円

厚労省科学研究費補助金、 肝炎等克服緊急対策研究事業
研究題目:骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発研究
代表:坂井田功
期間:平成21年－平成23年
研究費総額:750万円

厚労省科学研究費補助金、 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業
研究題目:母子コホート研究による成育疾患等の病態解明に関する研究
代表:加藤達夫
期間:平成22年－平成24年
研究費総額:450万円

科学技術試験研究委託事業、 橋渡し研究支援推進プログラム
研究題目:骨髄由来liver repair cell（LR細胞）の開発」（脂肪性肝炎マウスモデルでのLR候補細胞の肝機能改善作用評価）
代表:坂井田功
期間:平成21年－平成22年
研究費総額:780万円

科学技術試験研究委託事業、 企業研究者活用型基礎研究推進事業
研究題目:食品成分による生活習慣病発症の新しい予防の確立に向けた基盤研究～胎児期・新生児期に着目して～
代表:小川佳宏
期間:平成21年－平成22年
研究費総額:1,137万円

11）特別講演、招待講演、シンポジウム

小 川 佳 宏:「Adipose tissue inflammation and the metabolic syndrome」:第53回日本糖尿病学会年次学術集会,2010.5.27-29,岡山

小川佳宏:「メタボリックシンドロームと自然炎症」:日本食品免疫学会2010年度大会,2010.6.1-2,東京

田中都、菅波孝祥、小川佳宏:「レプチン」:第31回日本肥満学会,2010.10.1-2,群馬

小川佳宏:「ω3多価不飽和脂肪酸の抗炎症作用」:第25回日本糖尿病合併症学会,2010.10.22-23,滋賀

Y. Ogawa:「 The metabolic syndrome and chronic inflammation」:第18回日本血管生物医学会学術集会,2010.12.1-3,大阪

Y. Ogawa:「Adipose tissue remodeling and homeostatic inflammation」:第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会,2010.12.7-10,兵庫

小川佳宏:メタボリックシンドロームと慢性炎症:第44回糖尿病学の進歩,2010.3.5,大阪

小川佳宏:メタボリックシンドロームと自然炎症:生体調節研究所シンポジウム,代謝疾患研究の最前線,2010.3.17,群馬

小川佳宏:慢性炎症:生活習慣病・癌に共通する基盤病態:第34回日本産科婦人科栄養・代謝研究会,2010.9.3-4,三重

小川佳宏:慢性炎症における実質細胞-間質細胞相互作用:第91回医工学フォーラム,2010.9.24,京都

小川佳宏:慢性炎症の分子基盤と関連病態:環境エピゲノミクス研究会　第4回定例会,2010.11.15,栃木

12）新聞、雑誌、TV報道

NHK「追跡A to Z」2010年3月6日
http://www.nhk.or.jp/tsuiseki/file/list/100306.html

13）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

亀井康富（准教授）、山本幸男（特任講師）
澤田直樹（特任講師）、菅波孝祥（助教）
西條美佐（特任助教）、袁　勲梅（特任助教）
高橋真由美（特任助教）、白川伊吹（特任助教）
田中　都（特任助教）、伊藤美智子（特任助教）
蜂屋瑠見（特別研究員）、杉田　聡（大学院生）
市岡誠之（社会人大学院生）
江原達弥（社会人大学院生）
○滝沢文彦（大学院生）
津田直人（社会人大学院生）
南部宏英（社会人大学院生）
岩崎順博（大学院生）
青山千賀子（社会人大学院生）
中川信貴（大学院生）
服部真季（大学院生）

CJASN ePress. Published on November 4, 2010 as doi: 10.2215/CJN.04830610

Urinary Cystatin C as a Potential Risk Marker for Cardiovascular Disease and Chronic Kidney Disease in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome

Noriko Satoh-Asahara,*† Takayoshi Suganami,‡ Takafumi Majima,* Kazuhiko Kotani,*§ Yasuhisa Kato,‖ Rika Araki,¶ Kazunori Koyama,**†† Taiichiro Okajima,‡‡ Makito Tanabe,‡‡ Mariko Oishi,§§ Akihiro Himeno,*† Shigeo Kono,† Akira Sugawara,‖‖ Masakazu Hattori,* Yoshihiro Ogawa,‡ Akira Shimatsu,* and the Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group

**Division of Diabetic Research, Clinical Research Institute, †Diabetes Center, and ‖‖Department of Nephrology, National Hospital Organization, Kyoto Medical Center, Kyoto, Japan; ‡Department of Molecular Medicine and Metabolism, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; §Department of Clinical Laboratory Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Japan; ‖Diabetes Center, National Hospital Organization, Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan; ¶Internal Medicine, National Hospital Organization, Mie Hospital, Tsu, Japan; **Internal Medicine, National Hospital Organization, Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan; ††University of Health and Welfare, Mita Hospital, Tokyo, Japan; ‡‡Department of Internal Medicine and Department of Clinical Research, National Hospital Organization, Kokura Medical Center, Kitakyu-syu, Japan; and §§Oishi Clinic, Kyoto, Japan*

Background and Objectives: Obesity and metabolic syndrome (MS) increase the risk of cardiovascular disease (CVD), chronic kidney disease (CKD), and all-cause mortality. Serum cystatin C (S-CysC), a marker of GFR, has been shown to be associated with CVD and CKD. This study was designed to elucidate the association of urinary CysC (U-CysC), a marker of renal tubular dysfunction, with CVD and CKD risk factors in patients with obesity and MS.

Design, setting, participants, & measurements: The U-CysC-creatinine ratio (UCCR) was examined in 343 Japanese obese outpatients enrolled in the multi-centered Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study.

Results: UCCR was positively correlated with urine albumin-creatinine ratio (UACR) and S-CysC and negatively correlated with estimated GFR (eGFR). Among obese patients, UCCR was significantly higher in MS patients than in non-MS patients. UCCR had significant correlations with the number of components of MS and arterial stiffness, all of which are CVD predictors, similarly to UACR ($P < 0.05$). Interestingly, diet- and exercise-induced weight reduction for 3 months significantly decreased only UCCR among all of the renal markers examined ($P < 0.01$), in parallel with the decrease in BMI, HbA1c, and arterial stiffness, suggesting the beneficial effect of weight reduction on renal tubular dysfunction.

Conclusions: This study demonstrates that UCCR is significantly associated with renal dysfunction, the severity of MS, arterial stiffness, and weight change in obese patients. The data of this study suggest that U-CysC could serve as a CVD and CKD risk factor in patients with obesity and MS.

Clin J Am Soc Nephrol 6: ●●●–●●●, 2011. doi: 10.2215/CJN.04830610

Obesity and metabolic syndrome (MS), a cluster of multiple risk factors for atherosclerosis such as obesity, elevated BP, elevated glucose, and atherogenic dyslipidemia, increase the risk of all-cause mortality and cardiovascular morbidity and mortality (1,2). Chronic kidney disease (CKD), which is defined as renal damage or GFR < 60 ml/min per 1.73 m^2 for at least 3 months (3), is also known to be an independent risk for cardiovascular diseases (CVD) (4,5). Recent epidemiologic studies revealed a close association of MS and obesity with CKD (6–8). It is speculated that CVD and CKD share common pathophysiologic bases involving metabolic abnormalities, endothelial dysfunction, oxidative stress, and chronic inflammation (9). However, conventional CVD risk factors underestimate the risk of CVD in patients with CKD, implying novel mechanisms linking CVD and CKD (10). It is, therefore, important to identify new biomarkers to evaluate the progression of CVD and CKD in patients with obesity and MS.

Microalbuminuria is an established biomarker that reflects the decline in GFR and a predictive and independent biomarker for all-cause mortality and CVD events (11,12). Cystatin C (CysC), a 13-kD endogenous cysteine proteinase inhibitor, is

Received June 2, 2010. Accepted September 24, 2010.

Published online ahead of print. Publication date available at www.cjasn.org.

Correspondence: Dr. Noriko Satoh-Asahara, Division of Diabetic Research, Clinical Research Institute, National Hospital Organization, Kyoto Medical Center, 1-1 Fukakusa Mukaihata-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8555, Japan. Phone: 81-75-641-9161; Fax: 81-75-645-2781; E-mail: norikos@oregano.ocn.ne.jp

Copyright © ●●●● by the American Society of Nephrology

ISSN: 1555-9041/602–0001

ubiquitously expressed, filtrated freely by the glomeruli, and reabsorbed by the proximal tubules (13,14). Serum CysC (S-CysC) is also a sensitive marker for detecting reduced GFR and is a stronger predictor of the risk of death and cardiovascular events in elderly persons than serum creatinine (14–16). On the other hand, the level of urinary CysC level (U-CysC) has been recognized as a marker of renal tubular dysfunction (17–19). Recently, several studies have provided evidence for the involvement of renal tubular dysfunction as well as glomerulopathy in the CKD progression in diabetic patients with macrovascular diseases (20,21). However, it is unknown whether renal tubular dysfunction is associated with the development of renal damage and CKD in obesity and MS. Moreover, whether U-CysC is associated with the conventional risk factors of CVD and CKD in patients with obesity and MS has never been addressed.

The Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study (JOMS) is a prospective and cross-sectional multi-center study that involves several National Hospital Organization hospitals in Japan. In a series of previous studies, we demonstrated that as a new atherogenic index, cardio-ankle vascular index (CAVI) and serum amyloid A-oxidized LDL are useful for the evaluation and management of the CVD risks in patients with obesity and MS (22,23). We also reported that the markers are sensitive for detecting improvement of CVD risks during weight reduction. Thus, JOMS would provide unique opportunities to investigate the pathophysiology of obesity-related renal dysfunction by cross-sectional and prospective designs.

In this study, we examined the relationships of U-CysC with CVD and CKD risk factors and the significance of renal tubular dysfunction in the progression of CVD and CKD in obese patients. Among the obese patients, we compared the U-CysC levels by classifying the patients as either having MS (MS group) or not (non-MS group) or by stratifying according to the number of MS traits. Because weight reduction improves glomerular hemodynamics and reduces urine albumin excretion (24–26), we also studied the effect of weight-reduction therapy on U-CysC. Here, we show a significant correlation of U-CysC with CVD and CKD risk factors in obese patients. Interestingly, diet- and exercise-induced weight reduction effectively suppressed the increased U-CysC in obese patients. The data of this study suggest that U-CysC may serve as a potential biomarker that reflects the progression of CVD and CKD in patients with obesity and MS.

Materials and Methods

Subjects

A total of 343 Japanese obese outpatients (152 men and 191 women; mean age, 52.1 years) were consecutively enrolled in a multi-center study (JOMS), which involved five National Hospital Organization hospitals (Kyoto, Tokyo, Nagoya, and Kokura Medical Centers and Mie Hospital) and the Oishi Clinic in Japan as part of a study conducted by the Policy Based Medical Service Network for Endocrine and Metabolic Diseases during the period from October 2005 to March 2007 (22,23). Each institution's ethical committee approved this study, and all of the patients gave their written informed consent. The JOMS study has been registered in the University Hospital Medical Information Network system (study identification UMIN000000559), which is open to the public. It was designed to assess the characteristics of MS and the effectiveness of weight-reduction therapy at preventing CVD in Japanese obese subjects.

We recruited obese subjects with a body mass index (BMI) of ≥25 kg/m^2. The exclusion criteria were no previous history of CVD, other vascular diseases, apparent renal disease, or severe liver dysfunction. The patients were classified as having MS (MS group) or not (non-MS group) according to the criteria proposed by the United States National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III with a slight modification on waist circumference, as a representative criteria of this syndrome (27). The criteria for waist circumference was set at ≥85 cm for men and ≥90 cm for women, on the basis of the criteria of the National Metabolic Syndrome Criteria Study Group of Japan (28).

Data Collection and Laboratory Measurements

At the beginning of and 3 months after weight-reduction therapy, we measured MS-related parameters (BMI, waist circumference, systolic [SBP], and diastolic BP [DBP]); blood parameters; and CAVI, an index of arterial stiffness (22). Fasting blood samples were drawn in the absence of prescription drugs, and fasting plasma glucose (FPG), hemoglobin A1c (HbA1c), immunoreactive insulin (IRI), LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), and triglycerides (TG) were determined according to the standard procedures (22). Serum levels of C-reactive protein (CRP), an inflammatory marker, and leptin and adiponectin, representative adipocytokines, were also determined (22). Urinary albumin (U-Alb) and urinary β-2 microglobulin (U-B2MG) were assessed quantitatively by the latex particle enhanced immunoturbidimetric method (Eiken, Japan). S-CysC was determined by a latex particle enhanced immunoturbidimetric assay (Ikagaku, Kyoto, Japan) (17). U-CysC was measured with an ELISA as described (17). The urine albumin-creatinine ratio (UACR) and urine U-CysC-creatinine ratio (UCCR) were calculated (12,17). Urinary *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase (U-NAG) was measured using a colorimetric assay (Shionogi, Japan). Estimated GFR (eGFR) was calculated with the new Japanese coefficient for the abbreviated Modification of Diet in Renal Disease Study equation, including a correction factor of 0.739 for women (29). According to the United States National Kidney Foundation guidelines, CKD was defined as an eGFR <60 ml/min per 1.73 m^2 and was classified into five stages according to e-GFR levels (3). CAVI, a newly developed indicator of arterial stiffness that is independent of BP, was determined using a Vasera VS-1000 vascular screening system (Fukuda Denshi, Tokyo, Japan), as described previously (22).

Weight-Reduction Therapy

Of those enrolled in this study, 182 obese patients (81 men and 101 women; mean age, 52.5 years; mean BMI, 31.1) undertook weight-reduction therapy through lifestyle modifications to reduce energy intake and increase physical activity for 3 months as described previously (22,23). We defined those who were able to reduce their body weight by 5% or more as successful in weight reduction and those who reduced their body weight by less than 5% as unsuccessful (22).

Statistical Analyses

The data are presented as the means ± SEM, and $P < 0.05$ was considered statistically significant. The t test and the χ^2 test were used as appropriate for assessing intergroup differences. Analysis of covariance (ANCOVA) adjusted for gender and age was performed to assess differences in the mean levels of renal parameters stratified according to the number of MS components and the five categories

of eGFR levels. A two-way repeated measured ANOVA was performed to compare changes in parameters over 3 months between patients with successful and unsuccessful in weight reduction. Pearson's correlation coefficient test was used to observe the correlations of renal parameters with metabolic parameters in all patients and of the changes in renal parameters with those in metabolic parameters during weight reduction. A stepwise multivariate regression analysis was performed to explore the factors related to the baseline levels and the changes in UCCR in all of the patients. All of the statistical analyses were performed using StatView version 5.0 for Windows (SAS Institute Inc.).

Results

Baseline Clinical Characteristics

Table 1 summarizes the characteristics of the study cohort and compares the patients with and without MS. The prevalence of MS among the obese patients was 73.2%. As expected, age, waist circumference, SBP, DBP, FPG, HbA1c, IRI, and TG were significantly higher and HDL-C level was significantly lower in the MS group than in the non-MS group ($P < 0.05$). In this study, BMI, LDL-C, leptin, and adiponectin levels did not differ significantly between the two groups. Moreover, CAVI was significantly higher in the MS group than in the non-MS group ($P < 0.001$), which is consistent with our previous report (22). Although eGFR did not differ significantly between the MS and non-MS groups, UCCR was significantly higher in the MS group than in the non-MS group ($P < 0.05$). S-CysC, UACR, U-B2MG, and U-NAG were also significantly higher in the MS group than the non-MS group ($P < 0.05$) (Table 1). In this study, the prevalence of hypertension, diabetes, dyslipidemia, and CKD was higher in the MS group than the non-MS group (proportion of CKD: non-MS group, 5.4%; MS group, 19.5%).

Table 1. Baseline characteristics of the study obese patients stratified by the presence of MS diagnosed according to the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III criteria

	Total	Non-MS	MS
Male/female	152/191	33/59	119/132
Age (years)	52.1 ± 0.8	48.8 ± 1.5	53.2 ± 0.9[a]
BMI (kg/m^2)	31.2 ± 0.3	30.7 ± 0.7	31.4 ± 0.4
Waist circumference (cm)	100 ± 0.8	97.6 ± 1.9	101 ± 0.8[a]
Systolic blood pressure (mmHg)	139 ± 0.9	130 ± 1.5	143 ± 1.1[b]
Diastolic blood pressure (mmHg)	82.5 ± 0.7	77.6 ± 1.2	84.3 ± 0.8[b]
Fasting plasma glucose (mg/dl)	132 ± 2.7	108 ± 3.8	140 ± 3.3[b]
HbA1c (%)	6.72 ± 0.1	5.99 ± 0.1	6.98 ± 0.1[b]
IRI (μU/ml)	21.0 ± 1.7	15.4 ± 1.9	23.0 ± 2.1[a]
Triglyceride (mg/dl)	173 ± 7.1	126 ± 5.6	190 ± 9.2[b]
HDL-C (mg/dl)	53.4 ± 0.7	58.6 ± 1.3	51.5 ± 0.8[b]
LDL-C (mg/dl)	124 ± 1.7	125 ± 2.9	124 ± 2.1
Leptin (ng/ml)	14.3 ± 0.7	13.4 ± 1.1	14.6 ± 0.8
Adiponectin (μg/ml)	6.48 ± 0.2	6.64 ± 0.3	6.43 ± 0.2
CRP (μg/ml)	1.41 ± 0.1	1.23 ± 0.1	1.47 ± 0.1
eGFR	82.6 ± 1.4	85.4 ± 2.2	81.7 ± 1.7
S-CysC (mg/L)	0.84 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.86 ± 0.02[a]
UACR (mg/g·Cr)	99.2 ± 23	37.5 ± 9.7	122 ± 31[a]
UCCR	0.77 ± 0.05	0.61 ± 0.02	0.82 ± 0.07[a]
U-B2MG (μg/L)	186 ± 27	117 ± 20	212 ± 36[a]
U-NAG (U/L)	4.17 ± 0.3	2.91 ± 0.3	4.63 ± 0.4[a]
CAVI	7.85 ± 0.1	7.41 ± 0.2	8.02 ± 0.1[b]
Proportion of			
hypertension (%)	77.0	46.7	93.2[b]
diabetes (%)	60.6	21.7	80.1[b]
dyslipidemia (%)	62.2	23.9	81.3[b]
chronic kidney disease (%)	15.7	5.4	19.5[b]
taking calcium antagonist (%)	25.4	10.9	32.7[b]
taking ACE/ARB (%)	31.2	13.1	40.2[b]
taking antidiabetic medications (%)	45.1	19.6	57.8[b]
taking statins (%)	25.0	6.5	34.3[b]

The data are expressed as the means ± SEM. ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin II type 1 receptor blocker.

[a]$P < 0.05$ *versus* non-MS.

[b]$P < 0.001$ *versus* non-MS.

Correlation between Renal Markers and Metabolic Parameters

Among the renal markers, logUCCR was significantly correlated with logUACR ($P < 0.01$). Interestingly, both logUACR and logUCCR had significant positive correlations with age, SBP, HbA1c, adiponectin, CAVI, and other renal markers (S-CysC, logU-B2MG, and logU-NAG) and had a negative correlation with eGFR ($P < 0.05$) (Table 2). Only logUCCR, but not logUACR, was significantly correlated with leptin ($P < 0.05$). On the other hand, only logUACR, but not logUCCR was significantly correlated with BMI, FPG, and IRI ($P < 0.05$). In this study, eGFR was negatively correlated with age, adiponectin, CAVI, and renal markers (S-CysC, logUACR, logUCCR, and logU-B2MG) and was positively correlated with BMI, waist circumference, and DBP ($P < 0.05$). S-CysC was positively correlated with age, waist circumference, leptin, and adiponectin and was negatively correlated with HDL-C and eGFR ($P < 0.05$). logU-B2MG was positively correlated with age, SBP, DBP, HbA1c, leptin, and adiponectin and negatively correlated with LDL-C. logU-NAG was positively correlated with BMI, waist circumference, FPG, HbA1c, leptin, and CRP and negatively correlated with HDL-C and adiponectin ($P < 0.05$). CAVI was positively correlated with S-CysC, logUACR, logUCCR, and logU-B2MG and negatively correlated with eGFR ($P < 0.01$) (Table 2). Because CAVI demonstrated a strong significant correlation with age, as previously reported (22), age-adjusted CAVI was analyzed with renal markers (data not shown). Importantly, only logUACR and logUCCR were significantly correlated with age-adjusted CAVI (logUACR, $r = 0.205$; logUCCR, $r = 0.185$, $P < 0.001$), whereas eGFR, S-CysC, logU-B2MG, and logU-NAG were not correlated with age-adjusted CAVI.

After adjusting for gender, age, BMI, SBP, FPG, IRI, TG, HDL-C, and LDL-C, which were selected as general CVD risk factors to avoid using variables that demonstrate high colinearity with each other, only logUCCR and logUACR had significant associations with age-adjusted CAVI (logUACR, $\beta = 0.203$; logUCCR, $\beta = 0.173$, $P < 0.01$) (Supplemental Table 1). S-CysC, logU-B2MG, and logU-NAG had no such associations with CAVI (Supplemental Table 1). A stepwise multivariate regression analysis revealed that age, HbA1c, and leptin are independently associated with logUCCR ($P < 0.001$). On the other hand, age, SBP, and HbA1c were independently associated with logUACR ($P < 0.01$) (Supplemental Table 2).

Renal Markers Stratified According to the Prognostic Stages of CKD and the Number of MS Traits

ANCOVA revealed that the mean levels of UCCR were increased in accordance with the prognostic stage of CKD in obese patients ($P < 0.001$) (Figure 1). There was also a significant increase in S-CysC and UACR in accordance with the prognostic stage of CKD ($P < 0.001$). We also examined the

Table 2. Baseline correlations of eGFR, S-CysC, logUACR, logUCCR, logU-B2MG, and logU-NAG with metabolic parameters

	r					
	eGFR	S-CysC	logUACR	logUCCR	logU-B2MG	logU-NAG
Age	−0.458[a]	0.377[a]	0.321[a]	0.221[a]	0.156[b]	−0.001
BMI	0.272[a]	0.011	−0.143[b]	0.003	0.032	0.133[c]
Waist circumference	0.123[c]	0.111[c]	−0.102	0.028	0.038	0.131[c]
Systolic blood pressure	0.008	0.086	0.198[a]	0.115[c]	0.147[b]	0.062
Diastolic blood pressure	0.112[c]	−0.083	0.050	−0.003	0.120[c]	0.015
Fasting plasma glucose	−0.025	0.018	0.257[a]	0.083	0.058	0.214[a]
HbA1c	0.065	0.049	0.245[a]	0.167[b]	0.138[c]	0.348[a]
IRI	0.007	−0.010	0.140[c]	0.098	0.046	0.085
Triglyceride	−0.083	0.080	0.043	0.001	−0.012	−0.061
HDL-C	0.045	−0.144[b]	0.020	0.006	−0.045	−0.155[b]
LDL-C	0.058	−0.022	0.001	−0.009	−0.109[c]	−0.009
Leptin	−0.029	0.282[a]	0.106	0.282[a]	0.203[a]	0.108[c]
Adiponectin	−0.136[c]	0.147[b]	0.218[a]	0.201[a]	0.146[b]	−0.109[c]
CRP	0.019	0.048	0.006	−0.026	0.035	0.126[c]
eGFR	–	−0.573[a]	−0.208[a]	−0.151[b]	−0.119[c]	0.062
S-CysC	−0.573[a]	–	0.312[a]	0.376[a]	0.292[a]	0.109[c]
logUACR	−0.208[a]	0.312[a]	–	0.233[a]	0.321[a]	0.180[b]
logUCCR	−0.151[b]	0.376[a]	0.233[a]	–	0.341[a]	0.180[b]
CAVI	−0.419[a]	0.328[a]	0.373[a]	0.200[a]	0.178[b]	0.031

The data were analyzed by Pearson's correlation coefficient test.
[a] $P < 0.001$.
[b] $P < 0.01$.
[c] $P < 0.05$.

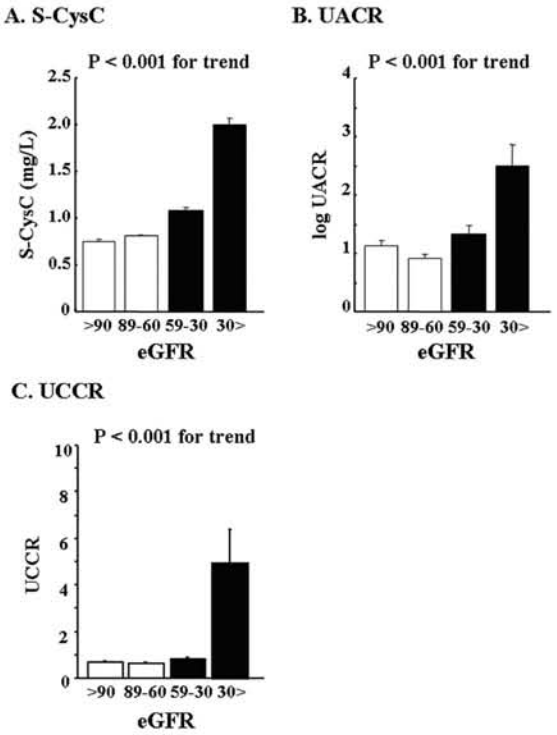


Figure 1. The values of S-CysC (A), UACR (B), and UCCR (C) stratified according to the prognostic stages of CKD after gender and age adjustment. The data are shown as the means ± SEM. The differences between groups were assessed by ANCOVA. The open and closed bars indicate CKD and non-CKD according to the United States National Kidney Foundation guidelines, respectively.

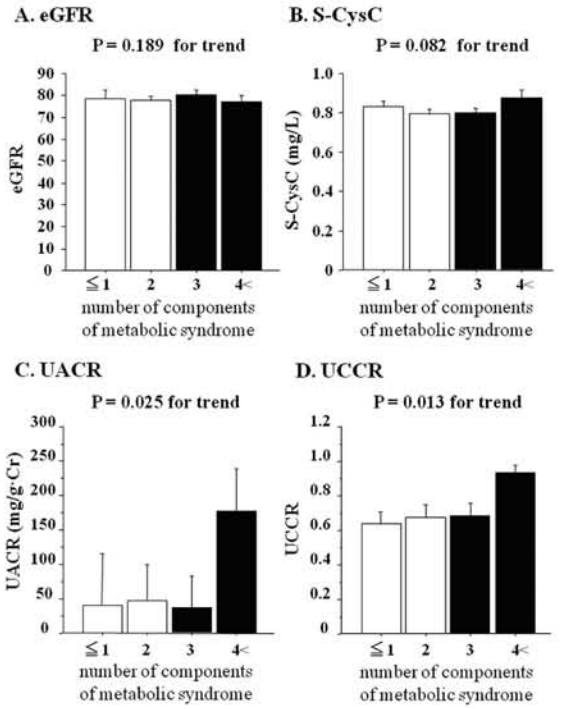


Figure 2. The values of eGFR (A), S-CysC (B), UACR (C), and UCCR (D) stratified according to the number of components of metabolic syndrome after gender and age adjustment. The data are shown as the means ± SEM. The differences between groups were assessed by ANCOVA. Nonmetabolic syndrome and metabolic syndrome are indicated by the open and closed bars, respectively.

mean levels of eGFR, S-CysC, UACR, and UCCR, which were stratified according to the number of MS risk factors in all patients. When both gender and age were taken into account, UCCR was significantly associated with the number of MS risk factors as well as UACR ($P < 0.05$), whereas eGFR and S-CysC were not (Figure 2). Similarly, U-B2MG and U-NAG were significantly correlated with the number of MS risk factors ($P < 0.05$) (Supplemental Figure IC and ID). The mean levels of U-B2MG were increased in accordance with the prognostic stage of CKD (Supplemental Figure IA), whereas U-NAG was not significantly correlated with decreased eGFR (Supplemental Figure IB).

Effect of Body Weight-reduction therapy on Renal Markers and Metabolic Parameters

Of the 182 patients, 54 (30%) successfully reduced their body weight by more than 5%. In those who were successful, BMI, waist circumference, SBP, FPG, HbA1c, LDL-C, and CAVI were significantly decreased, and adiponectin was significantly increased 3 months after the weight-reduction therapy ($P < 0.05$) (Table 3). Among all of the renal markers examined, only UCCR was decreased markedly after successful weight reduction ($P < 0.01$). There were no significant reductions in eGFR, S-CysC, UACR, U-B2MG, or U-NAG. Of those unsuccessful in body-weight reduction ($n = 128$), none of the above parameters changed throughout the study (Table 3). The decrease in logUCCR was strongly correlated with those in BMI, HbA1c, and CAVI ($r = 0.221$, 0.159, and 0.198, respectively; $P < 0.05$) (Supplemental Table 3). In this study, multivariate regression analysis revealed that the decrease in BMI was an independent determinant of the reduction in logUCCR during weight-reduction therapy ($\beta = 0.221$, $P = 0.003$) (Supplemental Table 3).

Discussion

Here we demonstrated for the first time that U-CysC is significantly correlated with the number of components of MS, the prognostic stages of CKD, and arterial stiffness. This study also revealed that among renal markers, only UCCR was significantly reduced, and its reduction was correlated with only BMI change during weight-reduction therapy, suggesting that U-CysC is closely associated with obesity itself. Because CysC is expressed ubiquitously, filtrated freely by the glomeruli, and reabsorbed by the proximal tubules, U-CysC has been used as a biomarker reflecting renal tubular dysfunction (17–19). Evidence has accumulated suggesting that not only renal glomer-

Table 3. Effects of weight reduction in obese patients on metabolic variables and renal markers

	Group Unsuccessful in Weight Reduction		Group Successful in Weight Reduction	
	Before	3 Months	Before	3 Months
Male/female	56/72		25/29	
Age (years)	53.4 ± 1.2		50.4 ± 2.1	
BMI (kg/m^2)	30.7 ± 0.5	30.7 ± 0.5	32.1 ± 0.7	29.7 ± 0.7[a]
Waist circumference (cm)	99.5 ± 1.3	99.1 ± 1.2	102 ± 1.6	96.3 ± 2.2[a]
Systolic blood pressure (mmHg)	140 ± 1.5	137 ± 1.4	137 ± 2.7	130 ± 2.1[a]
Diastolic blood pressure (mmHg)	81.2 ± 1.1	80.7 ± 1.0	81.4 ± 2.5	76.3 ± 1.3
Fasting plasma glucose (mg/dl)	135 ± 4.4	134 ± 4.3	142 ± 7.6	129 ± 7.3[b]
HbA1c (%)	6.85 ± 0.1	6.83 ± 0.1	6.98 ± 0.2	6.45 ± 0.2[a]
IRI (mU/ml)	18.2 ± 1.8	20.2 ± 2.7	22.3 ± 5.7	21.6 ± 10
Triglyceride (mg/dl)	162 ± 8.2	161 ± 6.8	170 ± 12	153 ± 12
HDL-C (mg/dl)	55.1 ± 1.2	53.3 ± 1.0	54.0 ± 1.8	53.5 ± 1.7
LDL-C (mg/dl)	122 ± 3.0	123 ± 0.5	123 ± 4.3	113 ± 3.5[a]
Leptin (ng/ml)	13.9 ± 1.1	14.6 ± 1.0	13.6 ± 2.0	12.2 ± 2.3
Adiponectin (μg/ml)	7.11 ± 0.4	7.73 ± 0.5	6.76 ± 0.5	7.98 ± 0.5[b]
CRP (μg/ml)	1.39 ± 0.2	1.17 ± 0.1	1.32 ± 0.2	1.00 ± 0.1
eGFR	72.2 ± 2.7	70.6 ± 2.3	71.6 ± 3.5	72.1 ± 3.7
S-CysC (mg/L)	0.84 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.81 ± 0.04	0.84 ± 0.05
UACR (mg/g·Cr)	116 ± 45	132 ± 50	158 ± 72	130 ± 58
UCCR	0.78 ± 0.11	0.70 ± 0.08	0.83 ± 0.17	0.66 ± 0.16[a]
U-B2MG (μg/L)	165 ± 36	229 ± 92	184 ± 68	129 ± 39
U-NAG (U/L)	4.70 ± 0.5	4.02 ± 0.6	4.08 ± 1.1	2.96 ± 0.4
CAVI	7.92 ± 0.1	7.89 ± 0.2	7.75 ± 0.3	7.42 ± 0.3[a]

The data are expressed as the means ± SEM.
[a]$P < 0.01$ *versus* before determined by a two-tailed paired *t* test.
[b]$P < 0.05$ *versus* before determined by a two-tailed paired *t* test.

uli and but also renal tubules play an important role in the pathophysiology of diabetic and obesity-related nephropathies (30). Moreover, the rate of renal dysfunction is correlated with the degree of renal tubulointerstitial fibrosis (31). This study highlights the possible role of renal tubular dysfunction in obesity and MS (obesity traits in particular), thereby suggesting that U-CysC could serve as a potential risk marker that reflects the progression of CVD and CKD, similarly to U-Alb, in patients with obesity and MS.

However, from the present association results of UCCR in comparison with UACR, the superior effect of U-CysC on microalbuminuria is debatable. Microalbuminuria predicts GFR decline, cardiovascular events, and mortality in both the general population and patients with diabetes or hypertension (11,12). In this study, we found that UACR is negatively correlated with eGFR and positively correlated with MS traits and arterial stiffness. Similar to UACR, UCCR was also significantly correlated with several CKD and CVD risk factors, such as eGFR, MS traits, and arterial stiffness. In addition, both UACR and UCCR were significantly and independently correlated with age and HbA1c. During weight-reduction therapy, the reduction of UCCR was also significantly correlated with that of HbA1c, suggesting that increased UCCR associates with hyperglycemia, similarly to UACR, and serves as an index of diabetic nephropathy. On the other hand, only UACR, but not UCCR, was correlated with SBP. It is noteworthy that urinary excretion of CysC and albumin is increased via distinct mechanisms; U-CysC is regulated mainly by renal tubular dysfunction, and urinary albumin excretion is regulated mainly by glomerular leakage (11,17,18). The differential correlations of UCCR and UACR with clinical parameters may be attributed to the different mechanisms of their production. Leptin was found to be independently associated with UCCR on multivariate analysis, suggesting that UCCR may be more closely related to obesity itself and obesity-related nephropathy than UACR. It may be clinically beneficial to investigate the different implications and specificities of U-CysC and U-Alb and the merits of utilizing them in combination as an index of CVD or CKD in obesity. To clarify the involvement of U-Alb and U-CysC or glomerular and tubular disorders in the progression of CVD and CKD accompanied by obesity and metabolic diseases, the long-term observation of an increased number of patients is necessary.

Evidence has suggested that S-CysC is associated with GFR reduction and arterial stiffness in patients with conventional CVD risk factors (15,16,32,33). We also found that S-CysC is significantly correlated with the prognostic stages of CKD. However, there was no significant correlation between S-CysC

and the number of MS components or age-adjusted CAVI in obesity. It is conceivable that increased U-CysC affects S-CysC in obesity, thereby decreasing the sensitivity for predicting CVD risk factors. Therefore, our data suggest that U-CysC might reflect the atherogenic CVD risk factors relative to S-CysC in obese patients. Further studies are needed to explore the homeostasis of CysC in obesity.

U-B2MG and U-NAG are established biomarkers for renal tubular dysfunction. Recent evidence has also suggested that U-B2MG and U-NAG are associated with CVD risks in type 2 diabetic patients (21,34). We also observed that U-B2MG and U-NAG are significantly correlated with MS traits and that U-B2MG is significantly correlated with eGFR decline. However, only U-CysC, but not U-B2MG and U-NAG, was significantly associated with age-adjusted CAVI, an index of arterial stiffness, in obese patients. These observations could be attributed to the following reasons: (*1*) U-CysC has different kinetics from U-B2MG and U-NAG, being more closely correlated with creatinine (17,19); (*2*) the major site of their production differs from one another (for instance, proximal renal tubules for NAG, lymphatic tissues for B2MG, and systemic nucleated cells for CysC) (35–37); and (*3*) each has distinct functional properties (for instance, NAG as a glycolytic enzyme and CysC as a cysteine proteinase inhibitor). Because cysteine proteinase inhibitors are involved in atherogenesis (35–37), it would be interesting to examine the role of CysC in the pathophysiology of atherosclerosis.

Weight reduction is essential for the management of obesity-related complications (24–26). It has been reported that moderate weight loss effectively ameliorates proteinuria and GFR decline in obesity and MS (24–26). The data of this study demonstrate that successful weight reduction reduces UCCR, suggesting that renal tubular damage in obese patients is reversibly improved by weight reduction. In this regard, Chagnac *et al.* (38) reported that weight reduction improves glomerular hyperfiltration and ameliorates obesity-related glumerulopathy. We and others previously demonstrated that weight reduction alleviates hyperglycemia, hypertension, hyperlipidemia, and arterial stiffness in patients with obesity and MS (22,23,39). Our data, therefore, newly support the concept that weight-reduction therapy is effective to improve obesity-related tubular dysfunction and subsequently CKD.

The dysregulation of adipocytokine production may contribute to the pathophysiology of metabolic syndrome (40,41). In this study, we demonstrated that leptin is positively correlated with UCCR in obese patients. Leptin, which is overproduced during the course of obesity, is reported to accelerate atherosclerotic lesions, glomerulosclerosis, and renal tubulointerstitial fibrosis in rodent models (42–45). It is conceivable that the production of pro-inflammatory adipocytokine accelerates renal tubular damage as well as arterial stiffness in obese patients. On the other hand, it has recently been reported that the plasma concentration of adiponectin, an anti-inflammatory adipocytokine (46), is elevated because of reduced clearance in chronic renal disorders (47), which might be related to our finding of a positive correlation between the adiponectin and UCCR. The pathophysiological significance of U-CysC in obesity-associated CKD onset and advancement may be clarified through further investigations of how adipocytokines are involved in CysC dynamics in obesity.

There are some study limitations to our study. The study had a cross-sectional design and a short-term intervention and did not examine CVD-related morbidity or mortality in this cohort. Although many prospective studies have shown CRP and arterial stiffness to be independent predictors of future CVD events (48,49), they cannot reflect the critical hard end points of CVD and/or CKD. Accordingly, to clarify the significance of U-CysC as a risk factor for CVD and CKD, it is necessary to conduct a long-term prospective cohort study to examine CVD- and CKD-related morbidity and mortality along with CRP and CAVI. We acknowledge that the correlations between U-CysC and various parameters were not strong, so repeated studies with larger sample sizes should be performed. Furthermore, this study examined the usefulness of U-CysC by classifying it according to the presence or absence of MS. Because there are various opinions on whether the concept of MS can fully contribute to CVD management (50), the clinical implications of these findings should be studied from various viewpoints in future.

In conclusion, this study is the first to demonstrate that increased UCCR is significantly associated with the severity of CKD and MS and arterial stiffness, CVD risk factors, in obese patients. Our data also suggest that U-CysC is helpful for assessing the effect of weight reduction on CVD and CKD risk factors in obesity. Therefore, U-CysC could serve as a potential biomarker for evaluating and managing the progression of CVD and CKD in patients with obesity and MS.

Acknowledgments

We thank Shinichi Mashiba for his valuable discussion and Hajime Yamakage, Yousuke Sasaki, and Kazuya Muranaka for their excellent technical assistance. This work was supported in part by grants from the National Hospital Organization for collaborative clinical research, the Smoking Research Foundation, and the Kidney Foundation, Japan (JFK 09-2) (to N.S.).

Disclosures

None.

References

1. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ: The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415–1428, 2005
2. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24: 683–689, 2001
3. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G: Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 67: 2089–2100, 2005
4. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in

Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention: Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108: 2154–2169, 2003
5. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF: Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116: 85–97, 2007
6. Wahba IM, Mak RH: Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: Mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 550–562, 2007
7. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J: The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med* 140: 167–174, 2004
8. Tanaka H, Shiohira Y, Uezu Y, Higa A, Iseki K: Metabolic syndrome and chronic kidney disease in Okinawa, Japan. *Kidney Int* 69: 369–374, 2006
9. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J: Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: Results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol* 16: 529–538, 2005
10. Dogra G, Irish A, Chan D, Watts G: Insulin resistance, inflammation, and blood pressure determine vascular dysfunction in CKD. *Am J Kidney Dis* 48: 926–934, 2006
11. Weir MR: Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 581–590, 2007
12. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS: Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation* 112: 969–975, 2005
13. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G: Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 40: 221–226, 2002
14. Shlipak MG, Sarnak MJ, Katz R, Fried LF, Seliger SL, Newman AB, Siscovick DS, Stehman-Breen C: Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *N Engl J Med* 352: 2049–2060, 2005
15. Madero M, Wassel CL, Peralta CA, Najjar SS, Sutton-Tyrrell K, Fried L, Canada R, Newman A, Shlipak MG, Sarnak MJ: Health ABC Study. Cystatin C associates with arterial stiffness in older adults. *J Am Soc Nephrol* 20: 1086–1093, 2009
16. Nakamura K, Iizuka T, Takahashi M, Shimizu K, Mikamo H, Nakagami T, Suzuki M, Hirano K, Sugiyama Y, Tomaru T, Miyashita Y, Shirai K, Noike H: Association between cardio-ankle vascular index and serum cystatin C levels in patients with cardiovascular risk factor. *J Atheroscler Thromb* 16: 371–379, 2009
17. Uchida K, Gotoh A: Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta* 323: 121–128, 2002
18. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, Eschwège P, Loric S: Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 44: 288–291, 2006
19. Herget-Rosenthal S, van Wijk JA, Bröcker-Preuss M, Bökenkamp A: Increased urinary cystatin C reflects structural and functional renal tubular impairment independent of glomerular filtration rate. *Clin Biochem* 40: 946–951, 2007
20. Singh DK, Winocour P, Farrington K: Mechanisms of disease: The hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol* 4: 216–226, 2008
21. Weitgasser R, Schnoell F, Gappmayer B, Kartnig I: Prospective evaluation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase with respect to macrovascular disease in elderly type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 1882–1886, 1999
22. Satoh N, Shimatsu A, Kato Y, Araki R, Koyama K, Okajima T, Tanabe M, Ooishi M, Kotani K, Ogawa Y, Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group: Evaluation of cardio-ankle vascular index: A new indicator of arterial stiffness independent of blood pressure, in obesity and metabolic syndrome. *Hypertens Res* 31: 1921–1930, 2008
23. Kotani K, Satoh N, Kato Y, Araki R, Koyama K, Okajima T, Tanabe M, Oishi M, Yamakage H, Yamada K, Hattori M, Shimatsu A, Japan Obesity and Metabolic Syndrome Study Group: A novel oxidized low-density lipoprotein marker, serum amyloid A-LDL, is associated with obesity and the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 204: 526–531, 2009
24. Navaneethan SD, Yehnert H, Moustarah F, Schreiber MJ, Schauer PR, Beddhu S: Weight loss interventions in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1565–1574, 2009
25. Agrawal V, Shah A, Rice C, Franklin BA, McCullough PA: Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 5: 520–528, 2009
26. Morales E, Valero MA, León M, Hernández E, Praga M: Beneficial effects of weight loss in overweight patients with chronic proteinuric nephropathies. *Am J Kidney Dis* 41: 319–327, 2003
27. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (y) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486–2497, 2001
28. The Examination Committee of Criteria for Metabolic syndrome: The Definition and criteria of metabolic syndrome. *J Jpn Soc Int Med* 94: 794–809, 2005
29. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* 53: 982–992, 2009
30. Phillips AO. The role of renal proximal tubular cells in diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 3: 491–496, 2003
31. Phillips AO, Steadman R: Diabetic nephropathy: The central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury. *Histol Histopathol* 17: 247–252, 2002
32. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC: Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem* 55: 1932–1943, 2009
33. Maahs DM, Ogden LG, Kretowski A, Snell-Bergeon JK, Kinney GL, Berl T, Rewers M: Serum cystatin C predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes* 56: 2774–2779, 2007
34. Yoshikawa R, Wada J, Seiki K, Matsuoka T, Miyamoto S, Takahashi K, Ota S, Taniai K, Hida K, Yamakado M, Shikata K, Uehara Y, Urade Y, Makino H: Urinary PGDS levels are associated with vascular injury in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 76: 358–367, 2007

35. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 102: 576–583, 1998
36. Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP: Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1359–1366, 2004
37. Bengtsson E, To F, Hakansson K, Grubb A, Branen L, Nilsson J, Jovinge S: Lack of the cysteine protease inhibitor cystatin C promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2151–2156, 2005
38. Chagnac A, Weinstein T, Herman M, Hirsh J, Gafter U, Ori Y: The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *J Am Soc Nephrol* 14: 1480–1486, 2003
39. Dengel DR, Kelly AS, Olson TP, Kaiser DR, Dengel JL, Bank AJ: Effects of weight loss on insulin sensitivity and arterial stiffness in overweight adults. *Metabolism* 55: 907–911, 2006
40. Matsuzawa Y: Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 35–42, 2006
41. Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K, Vanninen E, Laakso M: Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 110: 3842–3848, 2004
42. Koh KK, Park SM, Quon MJ: Leptin and cardiovascular disease: Response to therapeutic interventions. *Circulation* 117: 3238–3249, 2008
43. Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RA: Leptin stimulates proliferation an TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: Potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 56: 860–872, 1999
44. Kümpers P, Gueler F, Rong S, Mengel M, Tossidou I, Peters I, Haller H, Schiffer M: Leptin is a coactivator of TGF-beta in unilateral ureteral obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1355–F1362, 2007
45. Tanaka M, Suganami T, Sugita S, Shimoda Y, Kasahara M, Aoe S, Takeya M, Takeda S, Kamei Y, Ogawa Y: Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. *Endocr J* 7: 61–72, 2010
46. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K: Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 1784–1792, 2006
47. Komura N, Kihara S, Sonoda M, Maeda N, Tochino Y, Funahashi T, Shimomura I: Increment and impairment of adiponectin in renal failure. *Cardiovasc Res* 86: 471–477, 2010
48. Ridker PM: Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: Implications for longevity. *Nutr Rev* 65: S253–S259, 2007
49. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A: Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 37: 1236–1241, 2001
50. de Zeeuw D, Bakker SJ: Does the metabolic syndrome add to the diagnosis and treatment of cardiovascular disease? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5 [Suppl 1]: S10–S14, 2008

Supplemental information for this article is available online at http://www.cjasn.org/.

形質発現分野

萩原 正敏

疾患生命科学研究部・高次生命制御研究部門
形質発現制御学・教授

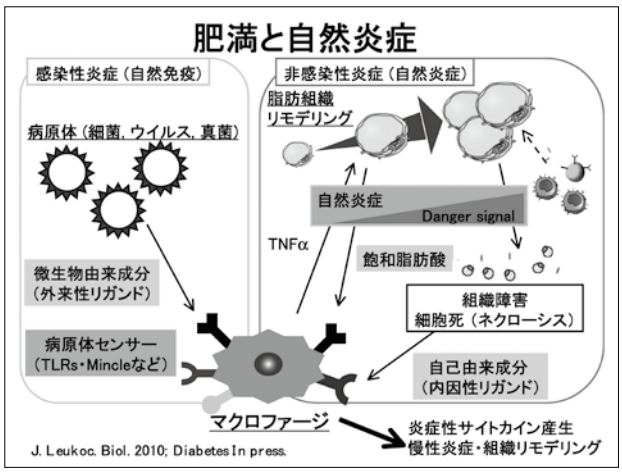
1）研究の課題名

Decipherment of splicing code with fluorescent splicing reporter system and its manipulation with small chemicals for new therapeutics.

スプライシング暗号の解読とスプライシング操作による創薬

2）研究内容

我々はスプライシングレポーターミニジーンを発現するトランスジェニック線虫を樹立し、in vivoで選択的スプライシングパターンを可視化することに世界で初めて成功した。エクソンの選択的使用に応じてGFP/RFP等の異なる蛍光タンパク質が発現するようレポーターミニジーンをデザインしており、生体内においてin situで選択的スプライシングパターンの解析が可能である。最近、スプライシングレポーターを全身で発現するトランスジェニックマウスの作製にも成功し、哺乳類の組織特異的あるいは発生時期依存的なスプライシングを可視化することができるようになった。このスプライシングレポーター系を用いて、疾患原因遺伝子から転写されたmRNAのスプライシングパターンに影響を与える化合物をスクリーニングし、筋ジストロフィーや遺伝性自律神経失調症等に対する治療薬候補物質を探索し、ダウン症や筋ジストロフィーに対する治療薬候補物質を見出した。



3）研究内容の英文要約

Alternative splicing of pre-mRNAs generates diversity in proteome from the limited numbers of gene subsets. We have recently developed bichromatic fluorescent splicing reporter system, which revealed expression profiles of mutually exclusive exons in living nematodes. With this system, we have successfully identified splicing regulators, such as asd1 and asd2, and elucidated the mechanisms of tissue-specific splicing regulation. e applied this technique to analyze the mechanism of tissue-specific splicing regulation in mammals. We propose a novel regulation model, which achieves efficient and distinct switching of splicing patterns with small number of tissue-specific regulators.

Phosphorylation state of RNA binding proteins such as SR proteins appears to influence their activities to regulate constitutive and/or alternative splicing. To date, several kinases have been reported to phosphorylate SR proteins, including SRPK-family kinases, Clk/Sty family kinases, and PRP4. Through our extensive screening of a chemical library, we found specific inhibitors of Clk1/Stys and SRPKs, and named them TG003 and SRPIN340, respectively. We can change splicing patterns of several genes with the administration of these kinase inhibitors. Recently we found their clinical applications for viral diseases, Duchenne muscular dystrophy, etc. By manipulating pre-mRNA splicing, we may find new therapeutic ways to cure fatal diseases.

6）英文原著論文

1. ◎Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M , Ikura T , Onogi H , Shibuya H , Hosoya T, Ito N, and Hagiwara M（2010）Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. Nature Commun.1 ,Article number: 86, doi:10.1038/ncomms1090

2. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, and Watanabe M.（2010）Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. Antimicrob Agents Chemother. 54, 3179-3186.
3. Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M, and Hosoya T.（2010）Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. Org Biomol Chem. 8, 4051-4055.
4. Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, Hagiwara M（2010）Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing. PLOS One 5, e10946.
5. Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and Hagiwara M（2010）Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic Caenorhabditis elegans. Nature Protoc. 5, 1495-1517.
6. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, and Bates DO.（2010）Regulation of vascular endothelial growth factor（VEGF）splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis. J. Biol. Chem. 285, 5532-5540.

7）総説ならびに著書

1. 萩原正敏　スプライシング制御機構の解明とその臨床応用（2010）
   メディカル・サイエンス・ダイジェストVol.36, No.13, 2-3
2. 野島孝之、萩原正敏　RNAスプライシングの可視化による創薬スクリーニング（2010）
   細胞工学Vol.29, No.02, 175-180
3. 萩原正敏　RNAプロセシング異常　RNA病を斬る基礎の基礎（2010）細胞工学

8）特許取得、特許申請

1. Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms.
   ①発明者:萩原　正敏、武内章英
   ②米国出願日:2010年6月1日（US .61/350,420）
   ③出願人:萩原　正敏
2. 発明の名称:遺伝性疾患の予防・改善剤
   ①発明者:萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史
   ②日本出願日:2010年6月28日（特願2010-146699）
   ③出願人:国立大学法人神戸大学　国立大学法人東京医科歯科大学

11）学会発表

○Hagiwara.M‘How can cells recover form the stress-induced suppression of pre-mRNA splicing?’ The 6th International Forum on‘Oxidative Stress and Aging’Noyori Conference Hall, Nagoya University , Japan September6-7th

○新しい分子イメージング技術による創薬　第5回ケミカルバイオロジー国際シンポジウム　東京医科歯科大学　Feb.23th

14）外部資金の獲得状況

1. 日本学術振興会　基盤研究（A）
   研究題目:スプライシング暗号の解読による神経発生過程の解明　/ 10,700千円（代表）
2. 独立行政法人 科学技術振興機構 CREST
   研究題目:「プルキンエ細胞変性の分子病態に基づく診断・治療の開発」/ 11,800千円（分担）
3. 独立行政法人 科学技術振興機構　国際共同研究
   研究題目:鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究 / 29,900千円（代表）
4. 科学技術振興機構（JST）・革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）
   研究題目:網羅的スプライシング暗号解析に基づくRNA病の解明と治療技術の探索　/ 17,692千円（代表）
5. 科学技術振興機構（JST）・分子イメージング研究戦略推進プログラム
   研究題目:分子イメージングによるタウ凝集阻害剤開発　/ 9,500千円（代表）
6. 厚生労働科学研究費補助金　肝炎等克服緊急対策研究事業
   研究題目:肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究 / 4,000千円（分担）

15）特別講演、招待講演、シンポジウム

○Decipherment of splicing code and its manipulation with small chemicals for new therapeutics. DUKE-NUS（シンガポール）Feb.2th,2010

○Decipherment of splicing code and its manipulation for new therapeutics. RNA symposium（National Cheng Kung University 台南）2010

○Hagiwara.M‘Visualizatio and manipulation of RNA splicing to cure RNA diseases’Gorodon Research Conference in New port, RI July 18-23,2010

○Development of Novel Protein Kinase Inhibitors for New Therapeutics of Incurable Diseases. ICGEB RNA Processing in Biology and Medicine Oct.22th, 2010 Beijing

○Splicing resume from stress response’Asian Cold Spring Harbor Laboratory‘RNA Biology’in Suzhou Dushu Lake Conference Center , China, Nobember 1-5,2010

17）新聞、雑誌、TV報道

2010.10.06　読売新聞朝刊　2面
「ダウン症の原因遺伝子抑制」

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 4 May 2010 | Accepted 9 Sep 2010 | Published 5 Oct 2010

DOI:10.1038/ncomms1090

Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A

Yasushi Ogawa[1,†], Yosuke Nonaka[1,2], Toshiyasu Goto[3], Eriko Ohnishi[3], Toshiyuki Hiramatsu[4], Isao Kii[1], Miyo Yoshida[2], Teikichi Ikura[5], Hiroshi Onogi[1,2], Hiroshi Shibuya[3], Takamitsu Hosoya[4], Nobutoshi Ito[5] & Masatoshi Hagiwara[1,6]

Dyrk1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) is a serine/threonine kinase essential for brain development and function, and its excessive activity is considered a pathogenic factor in Down syndrome. The development of potent, selective inhibitors of Dyrk1A would help to elucidate the molecular mechanisms of normal and diseased brains, and may provide a new lead compound for molecular-targeted drug discovery. Here, we report a novel Dyrk1A inhibitor, INDY, a benzothiazole derivative showing a potent ATP-competitive inhibitory effect with IC_{50} and K_i values of 0.24 and 0.18 μM, respectively. X-ray crystallography of the Dyrk1A/INDY complex revealed the binding of INDY in the ATP pocket of the enzyme. INDY effectively reversed the aberrant tau-phosphorylation and rescued the repressed NFAT (nuclear factor of activated T cell) signalling induced by Dyrk1A overexpression. Importantly, proINDY, a prodrug of INDY, effectively recovered *Xenopus* embryos from head malformation induced by Dyrk1A overexpression, resulting in normally developed embryos and demonstrating the utility of proINDY *in vivo*.

[1] Laboratory of Gene Expression, Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. [2] KinoPharma, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. [3] Department of Molecular Cell Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. [4] Laboratory of Chemical Biology, Graduate School of Biomedical Science, Institute of Biomaterials and Bioengineering, 2-3-10, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. [5] Department of Structural Biology, Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan. [6] Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. †Present address: Department of Dermatology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.H. (email: hagiwara.masatoshi.8c@kyoto-u.ac.jp).

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Dyrk1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) is a serine/threonine kinase that is essential for maintaining the normal development and function of the brain; it is expressed in fetal as well as adult brains, where it phosphorylates myriad proteins and thereby regulates their functions[1,2]. The physiological importance of Dyrk1A has recently been highlighted by its proposed relation with the pathogenesis of Down Syndrome (DS)[2].

DS is a congenital genetic disorder that appears in 1 in every 733 births in the United States[3]. DS is caused by a complete or partial trisomy of chromosome 21, and is characterized by systemic manifestations including mental retardation, cardiovascular anomalies, craniofacial dysmorphology, malignant neoplasms such as acute myoblastic leukaemia and recurrent infections[2,4]. The genetically complex nature of the disease has hindered development of effective drugs[4]. *xDyrk1A* resides within the so-called Down Syndrome Critical Region (DSCR) of human chromosome 21 (refs 5–7), a genomic region that has an important role in DS manifestations, if indeed it is not solely responsible for the pathogenesis of DS[8,9]. The extra copy of the *Dyrk1A* gene in DS indeed results in a 1.5-fold increase in the Dyrk1A product at both the protein and activity levels in the brain[10–13]. Importantly, several studies using different lines of transgenic mice have revealed that overexpression of *Dyrk1A* alone is sufficient to induce brain morphology alterations, as well as neurological and motor disorders that may be reminiscent of the learning deficits and altered motor skill acquisition seen in patients with DS[14–21]. The events downstream of Dyrk1A in these disease models are not yet completely understood; however, aberrant phosphorylation of NFATc transcription factors, components of the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T cell) signalling pathway, is proposed to have a role in the pathogenesis of DS. Arron *et al.*[22] reported that *Nfatc1*$^{-/-}$-knockout mouse embryos and *Nfatc2*$^{-/-}$; *Nfatc3*$^{-/-}$; *Nfatc4*$^{-/-}$ triple-knockout mouse embryos exhibit cardiac development defects similar to those seen in DS, and *Nfatc2*$^{-/-}$; *Nfatc4*$^{-/-}$ double-knockout mice show decreased muscular strength, increased sociability and decreased anxiety-related behaviour that are similar to those seen in DS. Transgenic mouse models and computational simulation have predicted that a 1.5-fold increase of Dyrk1A activity, synergistically acting with another DSCR gene, *DSCR1*, would downregulate the activity of the calcineurin/NFAT signalling pathway, thereby inducing the DS-like phenotype[22]. Nevertheless, the exact role of the skewed NFAT pathway in real DS individuals is still debated[8], and further studies are warranted because the transgenic mice may not always mimic the endogenous levels of overexpressed genes, as they are not subjected to transcriptional and alternative splicing regulations.

Interestingly, mice that have only one copy of *Dyrk1A* through targeted disruption of Dyrk1A in one allele (Dyrk1A$^{+/-}$ mice) also show profound phenotypic abnormalities, including reduced viability, smaller body size, disproportionate decrease in the size of the midbrain and hindbrain regions, changes in pyramidal cell structure and neuromotor and cognitive impairment[23–26]. The mice homozygous for targeted disruption of Dyrk1A (Dyrk1A$^{-/-}$-null mice) are embryonic lethal and died between E10.5 and E13.5[23]. Together, these findings demonstrate that Dyrk1A has distinctively strong dose effects, and that either an excess or a deficit of the kinase activity is detrimental for the normal functioning of the brain and the body.

The dose-sensitive nature of Dyrk1A function calls for the development of a method to deliberately manipulate Dyrk1A activity *in vivo* in order to define its functions and its precise role in DS pathology. Here, we report the development of INDY, a novel potent inhibitor of Dyrk1A. INDY is a highly selective inhibitor of Dyrk1A and is capable of manipulating the activity levels of the kinase in cultured cells and *Xenopus* embryos. The discovery of INDY would provide a valuable tool for the research of Dyrk1A-related diseases including DS, and may lead to invention of a novel therapeutic strategy for the diseases.

Results

Discovery of a novel Dyrk/Clk dual inhibitor INDY. To develop a potent inhibitor of Dyrk1A, we screened our compound library. The compound with the strongest inhibition was (1*Z*)-1-(3-ethyl-5-hydroxy-2(3*H*)-benzothiazoylidene)-2-propanone, which we referred to as INDY (inhibitor of Dyrk), and which showed an half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.24 μM (Fig. 1a). Although INDY shared the benzothiazole structure with the previously reported Clk (cdc2-like kinase) inhibitor, TG003 (refs 27,28) (Supplementary Fig. S1), it was threefold more potent in inhibiting Dyrk1A compared with TG003 (IC_{50} = 0.93 μM). The double-reciprocal Lineweaver–Burk plot showed that INDY competitively inhibits Dyrk1A against ATP (Michaelis constant, K_m = 37 μM) with a K_i (inhibition constant) value of 0.18 μM (Fig. 1b). INDY also inhibited Dyrk1B, the closest Dyrk kinase family member to Dyrk1A, with an IC_{50} of 0.23 μM. In an *in vitro* assay screening using a panel of 66 protein kinases, INDY (10 μM) showed >90% inhibition on DYRK2, DYRK3 and four other kinases, namely CLK1, CLK4, casein kinase 1 (CSNK1D) and PIM1 (Supplementary Table S1). Harmine, a plant alkaloid, is the most potent Dyrk1A inhibitor reported to date (IC_{50} = 0.03–0.08 μM)[29,30]. Inhibition of Dyrk1A by INDY was comparable with that by harmine (Supplementary Fig. S1), which showed a higher IC_{50} (0.35 μM) in our assay compared with the past

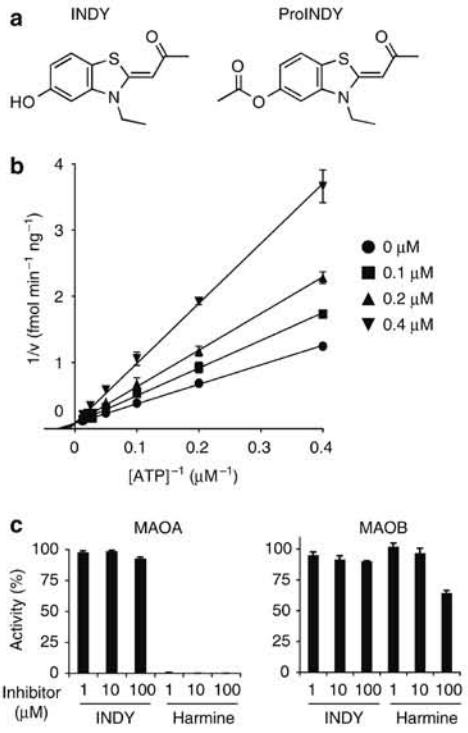


Figure 1 | Identification of INDY as a Dyrk1A inhibitor. (**a**) Structures of INDY and proINDY. (**b**) Double-reciprocal plots of the inhibitory activity of INDY. Dyrk1A kinase activity was measured at the indicated concentrations of INDY and ATP in triplicate. The reciprocal velocity was plotted versus 1/[ATP]. K_m = 37 μM, V_{max} = 12 fmol min^{-1} ng^{-1} and K_i = 0.18 μM. Error bars are the standard deviation. (**c**) Monoamine oxidase (MAO) inhibition by INDY and harmine. MAO activity was measured with an assay based on luminogenic MAO substrate. The percent activities of MAOA or MAOB in the presence of the indicated concentrations of compounds were measured in triplicate. Error bars are the standard deviation.

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

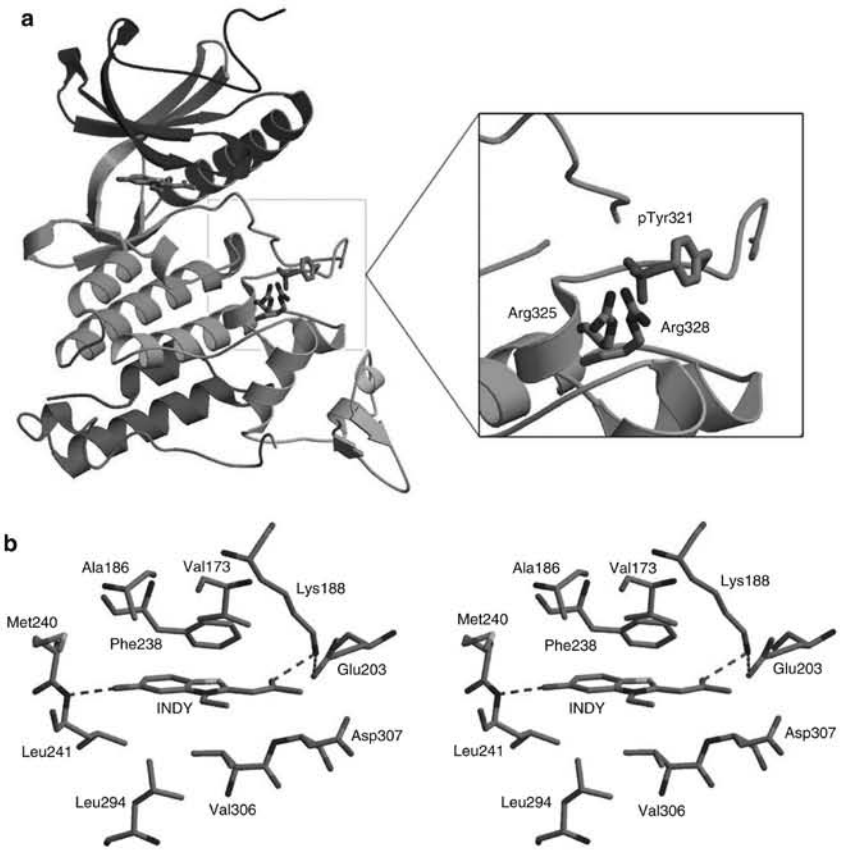


Figure 2 | Crystal structure of the Dyrk1A/INDY complex. (**a**) The overall structure. Dyrk1A is shown in ribbon mode. Left, the inhibitor INDY, as well as phosphorylated tyrosine (Tyr321) and two arginine residues that interact with the phosphate group (Arg325 and Arg328) are shown in stick models; right, Tyr321, Arg325 and Arg328 are depicted in a magnified view. (**b**) Stereoviews of the inhibitor-binding site of the Dyrk1A/INDY complex. The red dotted lines indicate hydrogen bonds.

reports, presumably owing to the different experimental conditions. Interestingly, harmine also inhibited Clks at a level comparable with the inhibition by INDY (Supplementary Table S2), implying a similar structural mechanism of inhibitory action. In addition to inhibiting kinases, harmine also inhibits monoamine oxidase (MAO) A at a considerably lower dose (IC_{50} = 5 nM) than required for inhibiting Dyrk and Clk family kinases[31]. INDY, however, was substantially free of MAOA inhibitory activity (Fig. 1c), which was in sharp contrast to harmine and suggested that there was a biologically significant difference between these compounds.

X-ray crystallographic study of the Dyrk1A/INDY complex. To determine how INDY inhibits Dyrk1A, we co-crystallized the Dyrk1A/INDY complex and determined its structure by X-ray crystallography. The overall fold of Dyrk1A was similar to those of many other protein kinases reported to date (Fig. 2a, Supplementary Table S3). A biochemical study[32] had shown that Tyr321, which is the second tyrosine of the Tyr-Xaa-Tyr motif in the activation loop, is autophosphorylated. The crystal structure clearly shows the phosphate group on Tyr321, which directly interacts with two arginine residues, Arg325 and Arg328 (Fig. 2a). This geometry is almost identical to that found in Erk2, where the phosphorylated tyrosine, Tyr185, is recognized by Arg189 and Arg192[33]. In the case of Erk2, the phosphorylations of Thr183 and Tyr185 induce a conformational change that creates the P+1 site near Tyr185 for the substrate peptide. Considering that the structure of Dyrk1A around the phosphotyrosine is very similar and that both Erk2 and Dyrk1A prefer a proline residue at the P+1 residue of the substrates, the phosphorylation of Tyr321 is also likely to enhance the activity by formation of the P+1 pocket.

INDY binds to Dyrk1A at the ATP-binding cleft and makes extensive hydrophobic interactions with Val173, Ala186, Phe238, Leu241, Leu294 and Val306 (Fig. 2b, Supplementary Fig. S2). The two polar groups of INDY pin the position of the ligand by two hydrogen bonds: the phenolic hydroxyl group to the main chain nitrogen of Leu241 and the carbonyl oxygen to the side-chain amino group of Lys188, which also forms a salt bridge with Glu203 (Fig. 2b, Supplementary Fig. S2). We also prepared and analysed the Dyrk1A/harmine co-crystal and found that harmine binds to Dyrk1A at the same site in a very similar manner (Supplementary Fig. S3). Most of the hydrophobic interactions as well as two crucial hydrogen bonds are conserved, which probably accounts for the similar affinity of these compounds to Dyrk1A.

In-cell inhibition of Dyrk1A by INDY. We then asked whether INDY could inhibit Dyrk1A in living cells. The microtubule-associated protein-tau is a well-characterized substrate of Dyrk1A[11,34]. Dyrk1A phosphorylates the tau-protein at Thr212, and this phosphorylation event has been observed in the brains of animal models of DS[11,34,35]. When EGFP-tau was co-transfected with EGFP-Dyrk1A in COS7 cells,

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

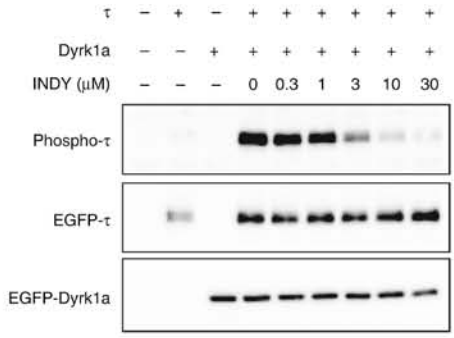


Figure 3 | Inhibition of Dyrk1A kinase activity by INDY in live cells. COS7 cells were transfected with either EGFP-Dyrk1A and EGFP-tau or both. Transfected cells were treated with the indicated dose of INDY or vehicle alone. Dyrk1A-dependent phosphorylation of Thr212 of EGFP-tau was detected by a phospho-specific antibody.

the phosphorylated form of EGFP-tau was detected by a phospho-Thr212-specific antibody. This signal declined by addition of INDY in a dose-dependent fashion, showing its potent Dyrk1A-inhibitory effect (Fig. 3). A mild inhibition of tau-phosphorylation was observed at 3 μM, and nearly complete inhibition was seen at 30 μM.

Recovery of repressed calcineurin/NFAT signalling. As misregulation of calcineurin/NFAT signalling induced DS-like manifestations in transgenic mice[22], an event that may also result from excessive activity of Dyrk1A, we asked if INDY is capable of modifying the calcineurin/NFAT system. NFATc transcription factors reside in the cytosol of unstimulated cells as phosphorylated proteins. On elevation of cellular Ca^{2+} levels, the Ca^{2+}-dependent protein phosphatase calcineurin dephosphorylates NFATc, resulting in nuclear transport of NFATc[36]. In the nucleus, NFATc forms a transcription complex with its partner proteins NFATn and binds to the promoter regions of their target genes to initiate the expression[36]. Dyrk1A rephosphorylates nuclear NFATc and works as a priming kinase to invite sequential phosphorylation by glycogen synthase kinase 3, ultimately leading to cytosolic export of NFATc and termination of the expression of the target genes[22,37].

We therefore assayed the effect of INDY on the calcineurin/NFAT pathway by imaging the translocation of the EGFP–NFATc1 fusion protein. EGFP–NFATc1 predominantly stayed in the cytosol when expressed in HEK293 cells (Fig. 4a, top left). On addition of the calcium ionophore ionomycin (IM) to the cells, EGFP–NFATc1 accumulated in the nucleus (Fig. 4a, top middle). Co-transfection of the Dyrk1A expression vector blocked the nuclear accumulation of EGFP–NFATc1, consistent with its negative regulatory role in the calcineurin/NFAT pathway (Fig. 4a, bottom left). INDY effectively worked to relocate EGFP–NFATc1 into the nucleus, even in the presence of overexpressed Dyrk1A (Fig. 4a, bottom right).

Because the biological effects of Dyrk1A, such as the maintenance of normal neurological functions, are particularly sensitive to its activity levels, we asked whether INDY could control calcineurin/NFAT signalling in a dose-dependent fashion. For this purpose, we performed a dual luciferase assay to monitor the transcriptional activity that follows NFATc nuclear translocation. Stimulation of HEK293 cells harbouring the NFAT response element (NFAT-RE) reporter vector by IM and phorbol 12-myristate 13-acetate resulted in a 15.2-fold increase of NFAT-RE-driven expression of firefly luciferase. When cells were co-transfected with the Dyrk1A expression vector, the effect of the stimuli was suppressed to only one-third (a 5.7-fold increase) compared with the control (Fig. 4b). Addition of 10 μM of INDY partially ameliorated this suppression compared

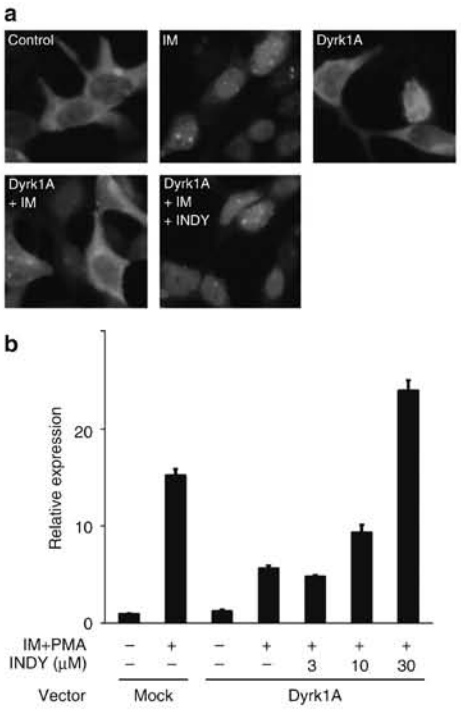


Figure 4 | Inhibition of the NFAT pathway by Dyrk1A overexpression and its rescue by INDY. (**a**) Translocation of the EGFP–NFATc1 fusion protein. EGFP–NFATc1 was co-transfected with either Dyrk1A or mock vector into HEK293 cells. Cells were pretreated with INDY (30 μM) or vehicle alone before stimulation with ionomycin (IM; 5 μM). Top left and middle: mock-transfected cells, unstimulated (top left) or IM treated (top middle); top right and bottom: Dyrk1A-transfected cells, unstimulated (top right), IM treated (bottom left) or INDY pre-treated and IM treated (bottom right). (**b**) Rescue of NFAT-dependent transcription by INDY. The NFAT response element (NFAT-RE)-driven expression of firefly luciferase was measured by a dual luciferase reporter assay. HEK293 cells were transfected with the reporter vectors, and by either Dyrk1A expression vector or empty vector. The cells were treated with IM (5 μM), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 nM) and the indicated dose of INDY or vehicle alone. The signals were standardized with thymidine kinase (TK) promoter-driven expression of *Renilla* luciferase activity. The average ratio ($n = 3$) of NFAT-RE/TK promoter activity was normalized by mock-transfected, unstimulated cells as a control and shown in the graph. Error bars are the standard deviations.

with vehicle alone (a 9.3-fold increase). Treatment with an increased dose (30 μM) of the inhibitor further enhanced the NFAT-RE-dependent transcription and even surpassed the condition under which no exogenous Dyrk1A expression was introduced (a 23.9-fold increase) (Fig. 4b). The overriding effect on calcineurin/NFAT signalling seen in high-dose treatment of INDY would be explained by the inhibition of endogenous DYRK family kinases inherent in HEK293 cells[37].

***In vivo* recovery of *Xenopus laevis* developmental defects**. To validate the utility of the Dyrk1A inhibitor on the whole body, we developed a novel *in vivo* assay. The *X. laevis* embryo is an ideal platform to observe general effects of *Dyrk1A* overexpression and to evaluate the effects of inhibitors, because our assay allows relatively good throughput compared with other vertebrate model systems and the consequences can be easily assessed visually[27]. We found a *X. laevis* cDNA sequence (BC110968, MGC:132284) as well

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

NATURE COMMUNICATIONS | DOI: 10.1038/ncomms1090

as related EST sequences coding a putative kinase nearly identical to mammalian Dyrk1A from a database search. The kinase, which we named xDyrk1A, showed 92.4, 90.7, 90.2 and 97.5% identity to the Dyrk1A proteins of *Homo sapiens, Rattus norvegicus, Mus musculus* and *X. tropicalis*, respectively (Supplementary Fig. S4). When expressed in COS7 cells, the xDyrk1A efficiently phosphorylated tau-proteins and showed sensitivity towards INDY, indistinguishable from its mammalian Dyrk1A counterpart (Supplementary Fig. S5). To investigate the effects of xDyrk1A on the anterior formation, we injected *xDyrk1A* mRNA into two animal dorsal blastomeres of eight-cell embryos. As a result, deformity was observed in the eye and the head of stage 40/41 tadpoles (Fig. 5a, top panels), which was accompanied by dorsal deformation in some cases (Supplementary Fig. S6). We introduced a lysine-to-arginine mutation into the kinase catalytic domain of xDyrk1A (xDyrk1A-K180R) to generate its inactive form. Injection of *xDyrk1A-K180R* mRNA, as well as injection of unrelated control *β-globin* mRNA, did not cause morphological changes, demonstrating that the deformities were indeed induced by the excessive kinase activity of xDyrk1A (Fig. 5a, top panels).

To rescue the deformity with INDY, we developed its acetylated derivative, which we referred to as proINDY (Fig. 1a). ProINDY has an additional acetyl group linked by an ester bond at the phenolic hydroxyl group of INDY that is expected to make the molecule more lipophilic and enhance its cell membrane permeability. Although proINDY itself inhibits Dyrk1A very weakly *in vitro* (26.1% inhibition at 10 μM), the ester bond is easily hydrolysed by esterases inherent in cells as well as blood plasma, leading to production of the highly active compound identical to INDY (Supplementary Fig. S7a). Indeed, in the cultured cells overexpressing Dyrk1A or xDyrk1A, proINDY inhibited the phosphorylation of Thr212 of the tau-protein (Supplementary Figs S5 and S7b). ProINDY also rescued the NFAT pathway at the same concentration as did INDY

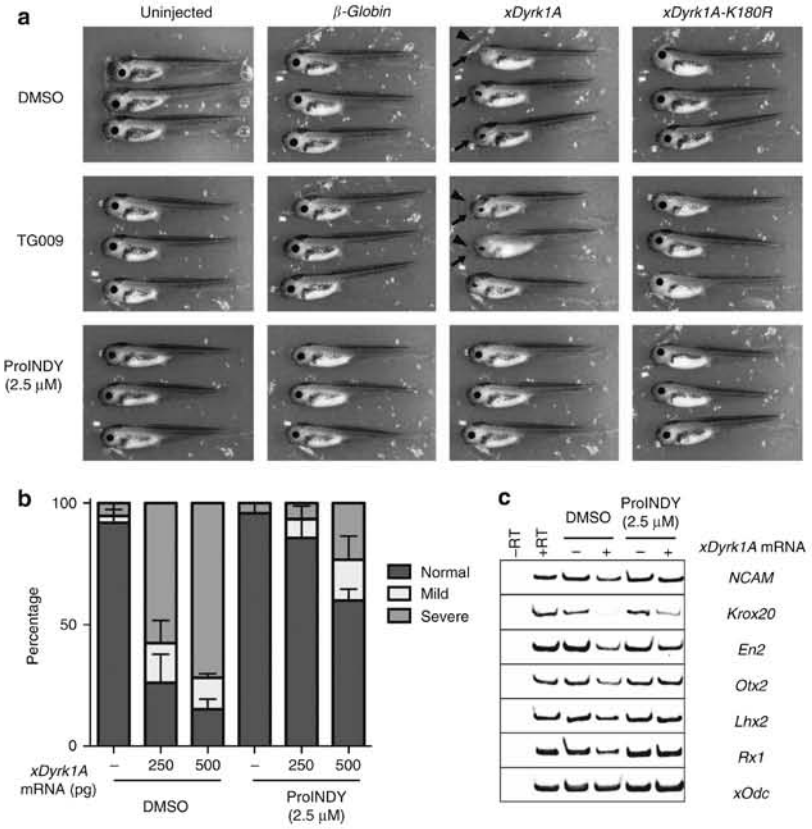


Figure 5 | Whole-embryo *xDyrk1A* overexpression assay. (**a**) *In vivo* rescue of *xDyrk1A* overexpression-induced deformity. *X. laevis* embryos were treated with vehicle alone, TG009 (2.5 μM) or proINDY (2.5 μM). The embryos were injected with 500 pg of *β-globin*, *xDyrk1A* or kinase-inactive *xDyrk1A* mRNA (*xDyrk-K180R*) at the eight-cell stage and incubated until they reached stage 40/41. Arrows, eye deformity; arrowheads, head deformity. (**b**) Rescue rate of embryo deformity. *X. laevis* embryos were treated with either proINDY (2.5 μM) or vehicle alone and injected with 250 pg or 500 pg of *xDyrk1A* mRNA. Uninjected embryos were used as controls. The percentages of normal embryos, embryos with mild deformity and embryos with severe deformity in each experimental group are depicted in green, yellow and orange, respectively. The embryos were categorized into normal, mild deformity and severe deformity groups according to the degree of eye, head and trunk deformity, as illustrated in Supplementary Figure S6. The mean percentage from two independent experiments and the range for each group are shown. The numbers of embryos used were as follows: for vehicle alone and uninjected: 28 and 37 for the first and second experiments, respectively; vehicle alone and 250 pg mRNA: 35 and 29; vehicle alone and 500 pg mRNA: 41 and 27; proINDY and uninjected: 39 and 35; proINDY and 250 pg mRNA: 23 and 44; and proINDY and 500 pg mRNA: 34 and 29. Error bars indicate the range. (**c**) Reversal of downregulation of differential neural markers. *X. laevis* embryos treated with proINDY (2.5 μM) or vehicle alone were injected with *xDyrk1A* mRNA (500 pg) and grew until stage 17. Expression of depicted differentiation markers was analysed by RT–PCR. xOdc is an internal control. Lanes: −RT, negative control without reverse transcriptase; +RT, uninjected and non-treated.

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

in Dyrk1A-overexpressing cells (Supplementary Fig. S7c), confirming the identical Dyrk1A-inhibitory effect.

Furthermore, the *Xenopus* embryo recovered apparently normal development (Fig. 5a, bottom panels) after treatment with proINDY. This rescue effect was dependent on xDyrk1A-inhibitory activity, because TG009 (ref. 27), another benzothiazole derivative that shows virtually no inhibitory effect on Dyrk1A (IC_{50} = 251 μM), failed to reverse the deformity (Fig. 5a middle panels). Highlighting the marked efficiency of proINDY, embryos injected with 250 pg of *xDyrk1A* mRNA were almost completely rescued at the concentration of 2.5 μM; only 26.1% of the tadpoles developed normally when treated with vehicle alone, whereas 85.8% were normal under the presence of proINDY (Fig. 5b). ProINDY was also effective when the embryos were injected with a higher dose of *xDyrk1A* mRNA (500 pg), but with decreased efficiency (15.3% for ProINDY versus 60.0% for the control). These results strongly suggest that increased xDyrk1A activity is causative of the deformity and it can be reversed by addition of proINDY. The relatively low dose of 2.5 μM did not induce apparent toxicity to the injected embryos. Consistent with their morphological change, differential neural markers were downregulated in xDyrk1A-overexpressed tadpoles. In the embryos injected with 500 pg *xDyrk1A* mRNA, decreased expression of the pan-neural marker NCAM, hindbrain marker Krox20, midbrain marker En2 and forebrain marker Otx2 were observed from reverse transcription PCR (RT–PCR) analysis (Fig. 5c). The eye marker genes, *Lhx2* and *Rx1*, also showed a similar downregulation. Treatment with proINDY recovered, if not completely, the expression of these markers in agreement with their ability to rescue the morphological abnormalities.

Discussion

INDY is a newly developed potent Dyrk1A inhibitor that was capable of manipulating the Dyrk1A activity levels in living cells. The structure of the co-crystal of Dyrk1A and INDY revealed that the drug binds to its target at the ATP-binding site, consistent with its ATP-competitive nature. ProINDY, an acetylated INDY, worked as a prodrug, which was hydrolysed *in vivo* to generate INDY and restored the abnormal development of *X. laevis* tadpoles induced by *xDyrk1A* mRNA injection into morphologically normal tadpoles.

To our knowledge, harmine is the most potent inhibitor of Dyrk1A known to date, and has the advantage of highly selective kinase specificity. It is, however, also a strong MAOA inhibitor and a hallucinogenic central nervous system stimulant[38,39]. INDY showed comparable inhibitory potency and similar substrate selectivity with harmine, but had the unique advantage that it did not inhibit MAOA. To explain this selectivity of INDY, the structure of the MAOA/harmine complex[40] (PDB code 2Z5X) was superimposed on the Dyrk1A/harmine complex using the coordinates of harmine (Supplementary Fig. S8). The Dyrk1A/INDY complex was further superimposed on the Dyrk1A/harmine complex using the coordinates of the protein. The hypothetical MAOA/INDY complex suggests that, although INDY could reproduce many hydrophobic interactions between harmine and MAOA, the *N*-ethyl group of INDY would collide with Asn181 or Phe208. The inhibitor-binding site of MAOA is a cavity, whereas that of Dyrk1A is a cleft. INDY, which is slightly larger than harmine, can be accommodated in Dyrk1A but not in MAOA. The hypothetical complex also indicated that the terminal methyl group of the propanone moiety of INDY would disturb a network of water-mediated hydrogen bonds of MAOA, which would be energetically unfavourable (Supplementary Fig. S8). Thus INDY and its prodrug form proINDY would be ideal tools that could be substituted for harmine in DS studies and other neuroscience studies concerned with Dyrk1A.

Other commonly used Dyrk1A inhibitors include roscovitine, purvalanol A and epigallocatechin gallate (EGCG)[41]. Roscovitine and purvalanol A are several-fold more potent inhibitors of cyclin-dependent kinases compared with Dyrk1A[41], and thus their use may be limited because of their effects on the cell cycle. EGCG, a catechin found in green tea, also inhibited Dyrk1A, but its profound promiscuity may also hamper the elucidation of its effect on Dyrk1A. EGCG is a strong anti-oxidant and a metal chelator; it is known to inhibit proteasome, matrix metalloproteinase, dihydrofolate reductase, DNA methyltransferase, topoisomerase II and telomerase; it also binds to laminin receptor, DNA and RNA[42,43]. Thus, EGCG has a profound influence on many signalling pathways, such as those mediated by protein kinase C, nuclear factor-κB, epidermal growth factor receptor, mitogen-activated protein kinases, activator protein 1 transcription factor and hypoxia-inducible factor 1[42,43]. For all these reasons, we concluded that INDY is a novel potent Dyrk1A inhibitor with unique characteristics different from its previously known counterparts.

In addition to Dyrk1A, INDY and harmine inhibit other Dyrk family members, including DYRK1B, DYRK2, DYRK3 and DYRK4, as well as Clk family kinases (Supplementary Tables S1 and S2). To the best of our knowledge, there are no reports of abnormal phenotypes or pathological conditions that are derived from deficiency of other DYRK and Clk family kinases. DYRK1B (also known as Mirk) is reported to be involved in muscle differentiation, although its knockout mouse was reportedly viable[44]. The apparently normal morphology of *X. laevis* embryos treated with proINDY suggests that the moderate reduction of the activities of these kinases might be well tolerated. In the case of DS pathogenesis, a 1.5-fold increase of Dyrk1A expression is considered to be pathogenic[14–18,22]. It is possible that the use of a relatively mild dose of INDY that would simply reduce its activity to the original level might not elicit critical off-target effects. Nevertheless, contributions from the effects of Clk family kinase inhibition should always be considered when interpreting the biological effects of INDY.

The xDyrk1A overexpression assay using *X. laevis* embryos enabled assessment of the *in vivo* benefit of inhibitors. This method is unique in that it allows an *in vivo* assay at a level of whole vertebrate development while also allowing a relatively high throughput. We consider that this whole-embryo assay would be a valuable tool in the further search for and refinement of Dyrk1A inhibitors. On the other hand, we are aware that this assay monitors an artificial phenotype that does not necessarily reflect *bona fide* DS pathology, making it unsuitable for detailed study of the molecular pathogenesis of DS. At present, the downstream events of xDyrk1A overexpression that lead to the downregulation of differentiation markers and head/eye deformity are unknown. It may be noted that Krox20, one of the downregulated markers, has been reported to be a downstream target of NFAT pathways in mammalian brain development[45].

It would be interesting to examine whether the administration of INDY could rescue the phenotypes of Dyrk1A-transgenic mice or the phenotypes of other mice models of human chromosome 21 trisomy, because such an experiment would elucidate the role of Dyrk1A in DS pathogenesis and demonstrate the possible utility of Dyrk1A inhibitors as DS therapeutic agents. Previous reports demonstrated that transgenic mice carrying a yeast artificial chromosome containing Dyrk1A were rescued from neurological defects when they were fed with green tea daily[46]. This effect may be attributed to EGCG, which is present in high concentrations in green tea leaves. In another report, treatment of Dyrk1A-transgenic mice by harmine reversed the decreased plasma homocysteine levels caused by excess Dyrk1A activity[47]. INDY may provide similar rescue effects on DS model mice. It must be noted, however, that the interpretation of drug effects is often difficult in model animals of contiguous genetic syndromes such as DS. Because of the complex interactions between the human chromosome 21 genes, manipulation of a gene activity may affect the activities of other genes and lead to an unpredicted outcome[48]. Such an effect may also occur in the case of Dyrk1A. Several mouse models that overexpress Dyrk1A through yeast artificial chromosome clones, bacterial artificial chromosome

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

clones or exogenous promoters exhibit neurobehavioral abnormalities[14–21]. However, in the case of Ts1Rhr mice, trisomy of a genetic segment that contains 33 genes including *Dyrk1A* was not sufficient to induce neurobehavioral phenotypes[9]. Nonetheless, the gene segment amplified in Ts1Rhr was indispensable for the neurobehavioral abnormalities of Ts65Dn, a DS model mouse that harbours a trisomy of an overlapping genetic segment that is longer than that of Ts1Rhr[9]. The exact role of Dyrk1A in DS would be defined in the context of its complete trisomy, and further development of an improved DS model mice would present more relevant tools for this purpose[49]. We are currently studying the pharmacological effect of INDY in several DS model mice.

Furthermore, excessive Dyrk1A activity may be pivotal to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) and other tauopathies. Recent studies have highlighted the role of Dyrk1A as the priming kinase of multiple phosphorylation of the tau-protein. *In vitro* experiments showed that when the tau-protein was phosphorylated at Thr212 by Dyrk1A, it became prone to phosphorylation by other kinases including GSK3β, at multiple sites, leading to pathogenic aggregation of the protein and formation of neurofibrillary tangles[11,34,35]. Studies of the brains of patients with AD revealed increased expression of Dyrk1A in both the brains and the specific neurons affected by tau-aggregation[13,50,51]. These findings are further reinforced by the fact that DS is strongly associated with early-onset AD[2,4]. Nearly all individuals with DS develop the typical AD histopathology of neurofibrillary tangles and amyloid plaques when they are above the age of 30 years[52], and between 50 and 70% of DS individuals develop dementia by the age of 60 years[2,4]. Because INDY inhibited Thr212 phosphorylation under experimental conditions, it would serve as a useful tool in investigating the role of Dyrk1A in tau-aggregate formation and thus could be used to examine the possibility that Dyrk1A might be a novel drug target of AD and other tauopathies.

Methods

Synthesis of inhibitors. INDY and proINDY were prepared using standard synthetic procedures from TG003 (ref. 27), as described in the Supplementary Methods.

Cell culture. HEK293 and COS7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum. For transfection of plasmids, GeneJuice Transfection Reagent (Merck) or FuGene HD Transfection Reagent (Roche Applied Science) was used according to the manufacturer's instructions.

Plasmid construction and mRNA synthesis. EGFP-Dyrk1A and pGEX-2TK-DYRK1B were kind gifts from Professor Dr Walter Becker (Institute for Pharmacology and Toxicology)[1,53]. The Dyrk1A cDNA was amplified and a FLAG epitope tag was added to its C-terminus by PCR. The PCR fragment was subcloned into pCS2+ vector to generate the FLAG-Dyrk1A expression vector. For expression of the recombinant Dyrk1A kinase domain in *Escherichia coli*, a cDNA fragment encoding the kinase domain (amino acids 126–490) of human Dyrk1A was generated. The fragment was joined with the TEV protease cleavage site directly upstream of the start codon and subcloned into the pET28 vector. To generate the EGFP-tau expression vector, the human MAPT cDNA (NM_016834) was obtained by RT–PCR from mRNAs of human neuroblastoma SH-SY5Y cells and the PCR fragment was introduced into the pEGFP-C1 plasmid. For construction of the expression vector for the EGFP–NFATc1 fusion protein, cDNA fragments coding EGFP and human NFATc1 (BC112243.1, obtained from Thermo Scientific) were amplified by PCR. The fragments were simultaneously subcloned into a pcDNA3 expression vector (Invitrogen) harbouring *att*R1 and *att*R2 sites using a Multisite Gateway Pro Plus kit (Invitrogen). For expression of xDyrk1A, a cDNA fragment of *xDyrk1A* (MGC:132284, obtained from Thermo Scientific) was amplified by RT–PCR, joined with a N-terminal FLAG epitope tag and subcloned into the pCS2+ vector to generate the FLAG-xDyrk1A plasmid. To generate a kinase-inactive mutant of xDyrk1A, Lys180 of xDyrk1A, which corresponds to Lys188 of human Dyrk1A, was replaced with Arg (xDyrk1A-K180R) by using a QuickChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The primers used for mutagenesis were as follows: sense 5′-GTG GGTGGCGATTAGAATTATAAAGAACAAG-3′ and antisense 5′-CTTGT TCTTTATAATTCTAATCGCCACCCAC-3′. For preparation of *xDyrk1A* and *xDyrk1A-K180R* mRNAs, capped mRNAs were synthesized from linearized vectors with an mMessage mMachine Kit (Ambion) using the FLAG-xDyrk1A plasmid as a template.

Determination of IC_{50} values against Dyrk1A and Dyrk1B. The Dyrk1A *in vitro* kinase assay was performed as described previously[27], with minor modifications. Human recombinant Dyrk1A was purchased from Invitrogen. GST-fused human Dyrk1B was expressed in *E. coli* and purified with glutathione Sepharose. The kinase activities of Dyrk1A and Dyrk1B were assayed in a reaction mixture containing serially diluted inhibitors, 10 mM MOPS-KOH (pH 7.0), 10 mM magnesium acetate, 200 μM EDTA, 10 μM ATP, 4 μCi [γ-^{32}P]ATP, 31 μg human myelin basic protein (Millipore) and 0.1–1 μg recombinant Dyrk1A or Dyrk1B in a final volume of 25 μl. The final concentration of DMSO was adjusted to 1%, regardless of the inhibitor concentration. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 10 min and 15 μl of the reaction was spotted onto P81, a phosphocellulose membrane (Whatman). The kinase assay conditions, including the incubation period and concentration of kinases and substrates, were optimized to maintain linearity during incubation. The membrane was washed with 5% phosphoric acid solution for at least 15 min. The radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. The net radioactivity was deduced by subtracting the background count from the reaction mixture without kinase, and the data are expressed as the percentage to the control sample containing the solvent. As for determination of Dyrk1A inhibition by proINDY at a single concentration of 10 μM, the recombinant human Dyrk1A (amino acids 126–490) was used to phosphorylate myelin basic protein substrate.

Lineweaver–Burk plot. To obtain a Lineweaver–Burk plot, the bacterially expressed human Dyrk1A kinase domain (amino acids 126–490) was purified with Ni-NTA agarose. The kinase reaction was performed by essentially the same method as described for the IC_{50} determination, with the difference that 80 ng of purified kinase and 2 μg of synthetic RS peptide[54] (NH_2-RSPSYGRSRSRSRSRSRS RSRSNSRSRSY-OH) were used in the assay. The K_m, K_i and V_{max} (concentration of substrate) values were calculated with Prism5 software (GraphPad Software) using the competitive inhibition model.

Single-concentration kinase inhibition. All kinases were assayed at an inhibitor concentration of 10 μM and an ATP concentration of 10 μM unless otherwise noted. Radioisotope-based assays were performed for ASK1, DYRK1B, DYRK2, CSNK1D, CLK4, GSK3α, GSK3β, HIPK1 and MET, using essentially the same technique as described above. Other kinases were assayed by the SelectScreen Kinase Profiling Service (Invitrogen; see Supplementary Tables S1 and S2). Detailed assay conditions for each kinase are described in the Supplementary Methods.

MAO assay. The MAO inhibitory activities of INDY and harmine were measured by an MAO-Glo Assay System (Promega) using human recombinant MOA-A and MOA-B (both from Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

In-cell phosphorylation assay. COS7 cells were co-transfected with EGFP-tau and either FLAG-Dyrk1A or FLAG-xDyrk1A expression vector. At 4 h after transfection, the cells were treated with the indicated amounts of inhibitors and further incubated for 20 h. Then, the cells were lysed and analysed by western blotting using anti-phosphorylated-tau (pT212) antibody (Biosource), anti-EGFP antibody (Medical & Biological Laboratories) or anti-FLAG antibody (Sigma-Aldrich).

X-ray crystallography. The kinase domain (amino acids 126–490) of human Dyrk1A with an N-terminal histidine tag was expressed in *E. coli* and first purified with Ni-NTA agarose. After the removal of the histidine tag with AcTEV protease (Invitrogen), the protein was further purified with ion-exchange chromatography and size-excision chromatography. Then, the protein was concentrated to 5.0 mg ml^{-1} in 50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM dithiothreitol, 50 mM arginine, 50 mM glutamic acid and 10% glycerol before crystallization. The crystals of Dyrk1A were obtained with the hanging-drop method at 20 °C, using reservoirs containing 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 0.2 M sodium acetate, 30% polyethylene glycol 4000 and 0.5 mM inhibitor (INDY or harmine).

The asymmetric unit contained four copies of Dyrk1A/inhibitor complexes. The diffraction data were collected at photon factory beamline NW12A at 100 K and processed with HKL2000 (HKL Research). The structure was solved by molecular replacement with a model based on the crystal structure of Clk1 (PDB entry code 1Z57) using the program Phaser[55], and refinement was performed with the CNS suite[56]. Restraints over non-crystallographic symmetry were applied during the refinement. The crystallographic statistics are summarized in Supplementary Table S3. The coordinates and structure factors are in preparation for deposition to the protein data bank. During the course of our study, the crystal structures of Dyrk1A in different space groups have been deposited in the protein data bank (PDB code 2VX3 and 2WO6).

EGFP–NFAT localization assay. HEK293 cells were grown on coverslips coated with atelocollagen (Koken) and transfected with EGFP–NFATc1-expressing vector. On the next day, the cells were pre-treated with inhibitors (30 μM) for 3 h and then stimulated with IM (5 μM) for 1 h. Cells were fixed and observed for fluorescence.

Dual luciferase reporter assay. The dual luciferase reporter assay was performed using a Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

manufacturer's instructions. NFAT transcriptional activity in the cells was monitored with a pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] vector (Promega) that contained an NFAT-RE to drive the expression of the firefly luciferase reporter gene. The pRL-TK vector, which expresses *Renilla* luciferase under the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, was co-transfected as an internal control. HEK293 cells were transfected with the FLAG-Dyrk1A vector and reporter vectors. The next day, cells were treated with IM (2.5 μM) and phorbol-12-myristate-13-acetate (10 nM) along with the indicated amounts of inhibitors. Cells were further incubated for 8 h and then cell lysates were harvested to measure the luciferase activity.

Hydrolysis of proINDY and HPLC analysis. Inhibitors were mixed with rat plasma at a concentration of 100 μM and immediately extracted with acetonitrile. The sample was analysed by HPLC using a COSMOSIL ODS column (250×4.6 mm; Nacalai Tesque), with a mobile phase of 0–80% aqueous acetonitrile at 40 °C, and monitored by absorbance at 356 nm.

Handling of the *X. laevis* embryos and RT–PCR analysis. *xDyrk1A* and *xDyrk1A-K180R* mRNAs were injected into two animal dorsal blastomeres at the eight-cell-stage embryos for RT–PCR analysis and observation of embryo phenotypes. The solutions including proINDY or TG009 (2.5 μM each) were used for treating embryos just after microinjection. The head regions of the injected embryos were dissected at the neural stage (stage 17), and total RNAs were prepared using TRIzol (Invitrogen). cDNA synthesis was carried out using Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). The sequences of the primer pairs were as described previously[57,58].

References

1. Becker, W., Weber, Y., Wetzel, K., Eirmbter, K., Tejedor, F. J. & Joost, H. G. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273,** 25893–25902 (1998).
2. Wiseman, F. K., Alford, K. A., Tybulewicz, V. L. & Fisher, E. M. Down syndrome—recent progress and future prospects. *Hum. Mol. Genet.* **18,** R75–83 (2009).
3. Sherman, S. L., Allen, E. G., Bean, L. H. & Freeman, S. B. Epidemiology of Down syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **13,** 221–227 (2007).
4. Antonarakis, S. E. & Epstein, C. J. The challenge of Down syndrome. *Trends Mol. Med.* **12,** 473–479 (2006).
5. Guimera, J. *et al.* A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* **5,** 1305–1310 (1996).
6. Shindoh, N. *et al.* Cloning of a human homolog of the Drosophila minibrain/rat Dyrk gene from 'the Down syndrome critical region' of chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225,** 92–99 (1996).
7. Song, W. J. *et al.* Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome 'critical region'. *Genomics* **38,** 331–339 (1996).
8. Korbel, J. O. *et al.* The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106,** 12031–12036 (2009).
9. Olson, L. E. *et al.* Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum. Mol. Genet.* **16,** 774–782 (2007).
10. Guimera, J., Casas, C., Estivill, X. & Pritchard, M. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57,** 407–418 (1999).
11. Liu, F. *et al.* Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* **22,** 3224–3233 (2008).
12. Dowjat, W. K. *et al.* Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci. Lett.* **413,** 77–81 (2007).
13. Wegiel, J. *et al.* The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta. Neuropathol.* **116,** 391–407 (2008).
14. Smith, D. J. *et al.* Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.* **16,** 28–36 (1997).
15. Branchi, I. *et al.* Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63,** 429–440 (2004).
16. Ahn, K. J. *et al.* DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol. Dis.* **22,** 463–472 (2006).
17. Sebrie, C. *et al.* Increased dosage of DYRK1A and brain volumetric alterations in a YAC model of partial trisomy 21. *Anat. Rec (Hoboken)* **291,** 254–262 (2008).
18. Laguna, A. *et al.* The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev. Cell* **15,** 841–853 (2008).
19. Altafaj, X. *et al.* Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10,** 1915–1923 (2001).
20. Martinez de Lagran, M. *et al.* Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol. Dis.* **15,** 132–142 (2004).
21. Altafaj, X. *et al.* Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* **32,** 377–384 (2008).
22. Arron, J. R. *et al.* NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* **441,** 595–600 (2006).
23. Fotaki, V. *et al.* Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* **22,** 6636–6647 (2002).
24. Fotaki, V., Martinez De Lagran, M., Estivill, X., Arbones, M. & Dierssen, M. Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav. Neurosci.* **118,** 815–821 (2004).
25. Benavides-Piccione, R. *et al.* Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A+/− mouse. *Neurobiol. Dis.* **20,** 115–122 (2005).
26. Arque, G., Fotaki, V., Fernandez, D., Martinez de Lagran, M., Arbones, M. L. & Dierssen, M. Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One* **3,** e2575 (2008).
27. Muraki, M. *et al.* Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.* **279,** 24246–24254 (2004).
28. Mott, B. T. *et al.* Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (Clk). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19,** 6700–6705 (2009).
29. Bain, J. *et al.* The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* **408,** 297–315 (2007).
30. Gockler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F. J. & Becker, W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J* **276,** 6324–6337 (2009).
31. Kim, H., Sablin, S. O. & Ramsay, R. R. Inhibition of monoamine oxidase A by β-carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **337,** 137–142 (1997).
32. Himpel, S. *et al.* Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* **359,** 497–505 (2001).
33. Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90,** 859–869 (1997).
34. Woods, Y. L. *et al.* The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bε at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **355,** 609–615 (2001).
35. Ryoo, S. R. *et al.* DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **282,** 34850–34857 (2007).
36. Crabtree, G. R. & Olson, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109** (Suppl), S67–79 (2002).
37. Gwack, Y. *et al.* A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **441,** 646–650 (2006).
38. Fuentes, J. A. & Longo, V. G. An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related β-carbolines. *Neuropharmacology* **10,** 15–23 (1971).
39. Jones, R. T. in *Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry* (eds. Sadock, B.J. & Sadock, V.A.) (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).
40. Son, S. Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E. & Tsukihara, T. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-A resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105,** 5739–5744 (2008).
41. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* **371,** 199–204 (2003).
42. Mandel, S. A., Amit, T., Weinreb, O., Reznichenko, L. & Youdim, M. B. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurosci. Ther.* **14,** 352–365 (2008).
43. Patra, S. K., Rizzi, F., Silva, A., Rugina, D. O. & Bettuzzi, S. Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts. *J. Physiol. Pharmacol.* **59** (Suppl 9), 217–235 (2008).
44. Leder, S. *et al.* Alternative splicing variants of dual specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1B exhibit distinct patterns of expression and functional properties. *Biochem. J.* **372,** 881–888 (2003).
45. Kao, S. C. *et al.* Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science* **323,** 651–654 (2009).
46. Guedj, F. *et al.* Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One* **4,** e4606 (2009).
47. Noll, C. *et al.* DYRK1A, a novel determinant of the methionine-homocysteine cycle in different mouse models overexpressing this Down-syndrome-associated kinase. *PLoS One* **4,** e7540 (2009).

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

48. Gardiner, K. J. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.* **31,** 66–73 (2009).
49. Yu, T. *et al.* A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum. Mol. Genet* **19,** 2780–2791.
50. Kimura, R. *et al.* The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* **16,** 15–23 (2007).
51. Ferrer, I. *et al.* Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis.* **20,** 392–400 (2005).
52. Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17,** 278–282 (1985).
53. Leder, S., Weber, Y., Altafaj, X., Estivill, X., Joost, H. G. & Becker, W. Cloning and characterization of DYRK1B, a novel member of the DYRK family of protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254,** 474–479 (1999).
54. Fukuhara, T. *et al.* Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103,** 11329–11333 (2006).
55. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40,** 658–674 (2007).
56. Brunger, A. T. Version 1.2 of the crystallography and NMR system. *Nat. Protoc.* **2,** 2728–2733 (2007).
57. Hyodo-Miura, J., Urushiyama, S., Nagai, S., Nishita, M., Ueno, N. & Shibuya, H. Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in Xenopus development. *Genes Cells* **7,** 487–496 (2002).
58. Satoh, K. *et al.* Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in Xenopus development. *Mol. Cell Biol.* **27,** 7623–7630 (2007).

Acknowledgments

We thank Professor Dr Hidenori Ichijo for the ASK1 expression vector, M Ishikawa for the HRMS analysis and Dr Yukiko Okuno for technical and bibliographical assistance. We also thank the laboratory members for their critical comments and discussion. This work was supported by Grants-in-aid (MH) from Japan Science and Technology Agency and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

Author contributions

Y.O., T.H. and M.H. designed the study. All authors contributed to the preparation of the paper, which was finalized by Y.O., T.H. and M.H. T.H. and T.H. synthesized the molecules. M.Y., Y.N. and H.O. determined the IC_{50} values and performed the MAOA assay, HPLC analysis and single-concentration kinase inhibition assays using radioisotope. Y.O. determined the K_m and K_i values and performed the in-cell kinase assay, NFAT localization assay and dual luciferase reporter assay. Y.N., T.I. and N.I. determined the structures of Dyrk1A/inhibitor co-crystals and analysed the hypothetical MAOA/inhibitor complex. E.O., T.G., I.K. and H.S. performed the *Xenopus* experiments.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper on http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Ogawa, Y. *et al.* Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* 1:86 doi: 10.1038/ncomms1090 (2010).

© 2010 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

細胞生理学分野

水島　昇

医歯学総合研究科・教授
細胞生理学／医学博士

1）研究の課題名

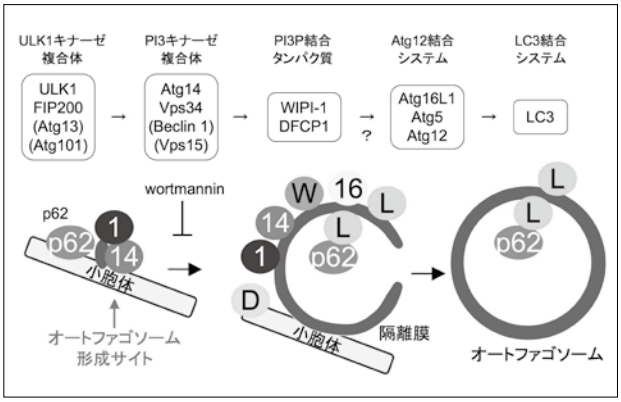
オートファジーの分子機構と生理的意義の研究

Molecular mechanism and physiological roles of autophagy

哺乳類細胞でのオートファゴソーム形成に関わるAtg因子群の遺伝学的階層構造を調べ、それをもとにオートファゴソーム形成場所の解析を行った。その結果、遺伝学的には、ULK1キナーゼ複合体が最も上流に位置し、続いてPI3キナーゼ（phosphatidylinositol 3-kinase）複合体、PI3P（phosphatidylinositol 3-phosphate）結合タンパク質、Atg12結合システム、LC3結合システムの順に続くことがわかった。さらにPI3K阻害剤によってオートファゴソーム形成を抑制した場合でも、ULK1やAtg14は小胞体（あるいは近傍）に点状に局在することから、これがオートファゴソーム形成部位を示していると考えられた。この研究は網羅的に哺乳類オートファジー因子の階層構造を初めて報告したものであり、今後それぞれのタンパク質の詳細な役割の解明へ役立つことが期待される。

オートファジーによるタンパク質分解は主に非選択的であるが、最近の研究から一部選択的であることも判明している。そこで、私たちの明らかにした階層構造をもとに、オートファジー選択的基質であるp62がどのようにオートファゴソーム膜にリクルートされるかを検討した。これまでp62はLC3と結合することでオートファゴソーム内に取り込まれると考えられていたが、今回私達はp62の一部がLC3非依存的に小胞体上のオートファゴソーム形成部位に局在することを見いだした。そこから隔離膜形成が開始され、LC3依存的にp62がオートファゴソーム内に取り込まれる。隔離膜形成中にさらなるp62も取り込まれると考えられる。オートファゴソーム形成部位へのp62の集積は、特異的基質の分解メカニズムとともに、オートファゴソームがどこで形成されるかという問題を考える上でも興味深い現象であるといえる。

2）



3）研究内容についての英文要約

Autophagy is an intracellular degradation process, through which cytosolic materials are delivered to the lysosome. We examined the hierarchical relationships among mammalian Atg proteins. The protein complex including ULK1 and FIP200 is the most upstream unit and is required for puncta formation of the Atg14-containing PI3-kinase complex. Puncta formation of both DFCP1 and WIPI-1 requires FIP200 and Atg14. The Atg12—Atg5–Atg16L1 complex and LC3 are downstream units among these factors. The punctate structures containing upstream Atg proteins such as ULK1 and Atg14 tightly associate with the ER, where the ER protein Vacuole membrane protein 1（VMP1）also transiently localizes. These hierarchical analyses suggest that ULK1, Atg14 and VMP1 localize to the ER-associated autophagosome formation sites in a PI3-kinase activity-independent manner.

With this hierarchical map, we analyzed loading of p62 and found that they localize to the ER-associated autophagosome formation site independently of LC3 localization to membranes. p62 co-localizes with upstream autophagy factors such as ULK1 and VMP1 even when autophagosome formation is blocked by wortmannin or FIP200 knockout. These results suggest that p62 localizes to the autophagosome formation site on the ER, where

autophagosomes are nucleated.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

国内でオートファジー研究会を開催。また、Chairとしてオートファジーに関するGordon Research Conferenceをイタリアで開催。

C（人材確保）

助教1名、ポスドク1名を採用。

D（人材育成）

講師1名が久留米大学教授として転出。

E（国際化）

中国から専攻生1名を新規に受入。

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

インド人大学院生2名、ベトナム人大学院生1名を引き続き指導し、国際性を維持。

6）英文原著論文

1. Itakura, E., Mizushima, N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. J. Cell Biol. 192: 17-27（2011）.
2. Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Ng, A.C., Hara, T., Hipp, M.S., Lage, K., Xavier, R.J., Ryu, K.Y., Taguchi, K., Yamamoto, M., Tanaka, K., Mizushima, N., Komatsu, M., Kopito, R.R. Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. J. Cell Biol. 191: 537-552（2010）.
3. Itakura, E., Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. Autophagy 6: 764-76（2010）..
4. Taneike, M., Yamaguchi, O., Nakai, A., Hikoso, S., Takeda, T., Mizote, I., Oka, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nishida, K., Shimizu, T., Hori, M., Komuro, I., Shirasawa, T., Mizushima, N., Otsu, K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. Autophagy 2010 Jul 1;6（5）. [Epub ahead of print]
5. Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T., Mizushima, N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. J. Biol. Chem. 285: 20109-20116（2010）.
6. Hartleben, B., Gödel, M., Meyer-Schwesinger, C., Liu, S., Ulrich, T., Köbler, S., Wiech, T., Grahammer, F., Arnold, S.J., Lindenmeyer, M.T., Cohen, C.D., Pavenstädt, H., Kerjaschki, D., Mizushima, N., Shaw, A.S., Walz, G., Huber, T.B. Autophagy controls glomerular disease susceptibility, and maintains podocyte homeostasis in aging mice. J. Clin. Invest. 120:1084-1096（2010）.

7）総説ならびに著書

1. Levine, B., Mizushima, N., Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. Nature 469: 323-335（2011）.
2. Mizushima, N. Noboru Mizushima: All about autophagy. Interview by Caitlin Sedwick. J. Cell Biol. 190: 946-947（2010）.
3. Mizushima, N., Levine, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. Nat. Cell Biol. 12:823-830（2010）
4. Stappenbeck, T.S., Rioux, J.D., Mizoguchi, A., Saitoh, T., Huett, A., Darfeuille-Michaud, A., Wileman, T., Mizushima, N., Carding, S., Akira, S., Parkes, M., Xavier, R.J. Crohn disease: A current perspective on genetics, autophagy and immunity. Autophagy. 2010 Feb 17;7（2）.
5. Klionsky, D.J., Codogno, P., Cuervo, A.M., Deretic, V., Elazar, Z., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D.A., Kroemer, G., Levine, B., Mizushima, N., Rubinsztein, D.C., Thumm, M., Tooze, S.A. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. Autophagy. 2010 May 6;6（4）.
6. Kuma, A., Mizushima, N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism. Semin. Cell Dev. Biol. 21: 683-90,（2010）
7. Mizushima, N. Autophagy. FEBS Lett. 584:1279（2010）
8. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. Cell 140; 313-326（2010）
9. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Curr Opin Cell Biol. , 22:132–139（2010）

1. 久万亜紀子、水島昇　飢餓におけるmTORの役割:オートファジー誘導とリソソーム生合成　実験医学
2. 久万亜紀子、水島昇　飢餓における細胞応答:オートファジー　アディポサイエンス
3. 塚本　智史、水島昇　オートファジーの受精卵発生における役割　Hormone Frontier in Gynecology
4. 貝塚剛志、水島昇　オートファジーの分子機構と生

理機能　血液・腫瘍科

5. 西村多喜、高村聡人、水島昇　オートファジーと癌抑制　実験医学
6. 塚本智史、岸千絵子、水島昇　初期胚発生におけるオートファジーの新しい役割　顕微鏡　45, 91-93 (2010)
7. 板倉英祐、水島昇　オートファゴソーム形成に関わるリン脂質　実験医学　28, 3279-3284 (2010)
8. 渡邉（浅野）貴子、久万亜紀子、水島昇　オートファジーの制御機構と代謝生理学的役割　日本臨床 (2010)
9. 水島昇.オートファジーの生理的役割　Medical Science Digest 36, 788-789 (2010)
10. 高村聡人、水島昇. がんとオートファジー　BIO Clinica 25, 227-232 (2010)
11. 渡邉（浅野）貴子、水島昇　Autophagyの分子機構とその生物学的意義　Diabetes Frontier　21, 36-40 (2010)
12. 渡邉（浅野）貴子、水島昇　オートファジー　肥満症　69, 211-215 (2010)

8）平成22年度までの自己評価

オートファジーメカニズム研究と生理学的研究の双方は順調に進んでいる。新しいマウスモデルの作出にも成功しており、オートファジーの新しい役割も見えてきている。

9）学会発表（和文）

1. 水島昇　オートファジーによる細胞内分解の役割と制御機構　Brainstorming Medical Conference　東京　2010.4.17
2. Hiroyuki Katayama　Keima, a lysosomal proteases-resistant and pH-sensitive GFP-like protein, enables the visualization of autophagy　第62回日本細胞生物学会年会　Osaka 2010.5.19-21
3. Eisuke Itakura　Mammalian autophagosome formation sites and autophagy proteins　第10回日本蛋白質科学会年会　Sapporo　2010.6.16-18
4. Chieko Kishi　Ultrastructural analysis of Parkin-dependent mitochondrial degradation BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
5. 塚本智史　精子完成過程におけるオートファジーの生理機能の解析　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
6. Hideaki Morishita　Involvement of lysosome in organelle degradation during lens differentiation 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
7. Anoop Kumar Gopi Velikkakath Mammalian Atg2s associate with autophagic isolation membrane and lipid droplet, and are essential for autophagosome formation　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
8. Saori Yoshii　Parkin-dependent degradation of depolarized mitochondria involves both autophagy and proteasome　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
9. Eisuke Itakura　Recruitment of p62 to the autophagosome formation site is dependent on self-oligomerization but not on interaction with LC3　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
10. Akiko Kuma　Analysis of Atg5-deficient mice rescued with Atg5 Expression in the brain　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
11. Naotada Ishihara　Regulation and physiological roles of mitochondrial fission and fusion in mammal　第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 神戸　2010.12.7-10
12. 水島昇　Role of autophagy in tumorigenesis　第6回オートファジー研究会　掛川　2011.1.12-14

10）受賞

平成22年10月
第5回日本生化学会柿内三郎記念賞受賞

11）外部資金の獲得状況

科学研究費補助金、 特定領域研究
研究題目: タンパク質分解による細胞・個体機能の制御
代表:水島　昇
期間:平成18年―平成22年

研究費総額:4200万円

科学研究費補助金、 特定領域研究
研究題目: オートファジーのダイナミクスと生理意義の解析
代表:水島　昇
期間:平成18年―平成22年
研究費総額:20500万円

科学研究費補助金、 若手研究S
研究題目:哺乳類細胞を用いたオートファゴソーム形成機構の解析
代表:水島　昇
期間:平成21年―平成25年
研究費総額:8040万円

12）特別講演、招待講演、シンポジウム

1. Noboru Mizushima　Physiological roles of autophagy in mammals　EMBO Worshop Proteolysis and Neurodegeneration/5th INPROTEOLYS meeting 2010.5.4-7　Madrid
2. Noboru Mizushima　Autophagy　The 8th Internal Conference on Hyaluronan　2010.6.11　Kyoto
3. 水島昇　オートファジーによる細胞内分解の役割と制御機構　第11回京都糖尿病・動脈硬化研究会　2010.6.12　京都
4. Noboru Mizushima The Role of autophagy during embryogenesis and spermatogenesis in mice 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists　2010.6.20-23　Kyoto
5. 水島昇　オートファジーによる細胞内分解の生理的役割　第14回日本適応医学会学術集会　2010.7.2　東京
6. Noboru Mizushima　New Horizons for Modern Science: Biology and Medicine at the Crossroads　2010.8.19-20　Fukuoka
7. Noboru Mizushima　Physiological roles of autophagy in mammals　14th International Congress of Immunology　2010.8.22-27　Kyoto
8. 水島昇　マウス初期胚発生および精子形成におけるオートファジーの役割　第51回日本組織細胞化学会総会　2010.9.5　東京
9. Noboru Mizushima　Physiological role of autophagy and its regulation mechanism　OzBio2010/12th IUBMB 2010　2010.9.26-10.1　Melbourne
10. Noboru Mizushima　Role of autophagy in tumorigenesis　1st Sino-Japan Autophagy Symposium　2010.10.14-17　Xi' an
11. 水島昇　オートファジーによる細胞内リサイクル　第11回抗加齢歯科医学研究会主催講習会　2010.10.24 東京
12. 水島昇　オートファジー研究の最前線:胚発生、神経変性、がんとの関連　第4回清水医師会学術講演会　2010.11.4　清水
13. 水島昇　哺乳類オートファジーの生理的意義と分子機構　グローバルCOEシンポジウム「神経疾患とがんの共通機能分子をめぐって」2010.11.5　名古屋
14. Noboru Mizushima　Physiological role of autophagy: Lessons from autophagy deficient mouse models BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会）　2010.12.7-10　神戸
15. 水島昇　哺乳類におけるオートファジーの制御機構と 生理的意義の研究　BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会）　2010.12.7-10　神戸
16. Noboru Mizushima　Physiological roles of autophagy: Lessons from autophagy deficient mouse models The American Society of Cell Biology 50th Annual Meeting　2010.12.11-15　Philadelphia
17. Noboru Mizushima p62 recruitment to autophagosomes NCI Workshop on Autophagy in Cancer Initiation and Progression　2010.12.16-17　Bethesda
18. 水島昇　オートファジーによる細胞内分解の生理的役割と分子機構　第2回 Cell Metabolism & Communication Conference　2011.1.15　東京

13）主催学会

1. Gordon conference "Autophagy in stress, development and disease" 2010.4.25-30　Barga, Italy（大会長）
2. BMB2010（第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会）（庶務幹事）2010.12-7-10　神戸
3. 第6回オートファジー研究会　2011.1.12-14　掛川

14）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

助教	久万亜紀子
助教	西村多喜
特任助教	岸千絵子
学振特別研究員	板倉英祐
学振特別研究員	本田郁子
大学院生D4	渡邉（浅野）貴子
大学院生MD-PhD3	北村圭
大学院生D3	Velikkakath, Anoop Kumar Gopi
大学院生D2	Sahani, Mayurbhai Himatbhai
大学院生D2	森下英晃
大学院生D2	Pham Nguyen, Quy
大学院生D2	内藤貴子
大学院生D1	貝塚剛志
大学院生D1	山本篤
大学院生M2	松永結
専攻生	Jiang, Peidu

Leading Edge
Primer

Cell

Methods in Mammalian Autophagy Research

Noboru Mizushima,[1,*] Tamotsu Yoshimori,[2] and Beth Levine[3,4,5,*]
[1]Department of Physiology and Cell Biology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8519, Japan
[2]Department of Cellular Regulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan
[3]Howard Hughes Medical Institute
[4]Department of Internal Medicine
[5]Department of Microbiology
University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390-9113, USA
*Correspondence: nmizu.phy2@tmd.ac.jp (N.M.), beth.levine@utsouthwestern.edu (B.L.)
DOI 10.1016/j.cell.2010.01.028

Autophagy has been implicated in many physiological and pathological processes. Accordingly, there is a growing scientific need to accurately identify, quantify, and manipulate the process of autophagy. However, as autophagy involves dynamic and complicated processes, it is often analyzed incorrectly. In this Primer, we discuss methods to monitor autophagy and to modulate autophagic activity, with a primary focus on mammalian macroautophagy.

Introduction

The past decade has witnessed an explosion of research on a fundamental cell biology pathway called autophagy (Greek for "self-eating"). The discovery of evolutionarily conserved genes (initially identified in yeast) that are required for autophagy has enabled scientists to uncover a vast array of homeostatic, developmental, and other physiological functions of autophagy. Moreover, increasing evidence suggests that the deregulation of autophagy may contribute to a broad spectrum of mammalian diseases (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008). Consequently, there is a rapidly growing need among scientists to be able to accurately detect autophagy and to study its function in diverse biological processes, especially in mammalian systems.

Research in mammalian autophagy has been historically plagued by two major considerations. First, there has been the challenge of capturing a "dynamic process" with "static measurements," and the inherent limitations associated with making biological inferences based on such measurements. Second, there has been the challenge of separating "form" from "function," and avoiding the common pitfall of assigning physiological functions to autophagy based on its detection (or lack thereof) in a given physiological setting. These two challenges likely underlie many of the misconceptions in our historical understanding of the functions of mammalian autophagy. For example, certain neurodegenerative and myodegenerative diseases were initially believed to result, at least

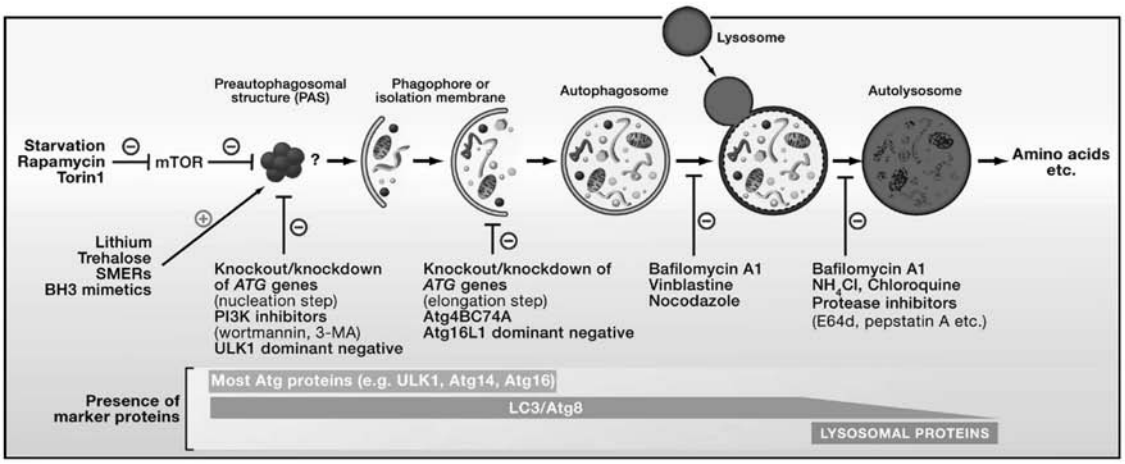


Figure 1. The Process of Macroautophagy
A portion of cytoplasm, including organelles, is enclosed by a phagophore or isolation membrane to form an autophagosome. The outer membrane of the autophagosome subsequently fuses with the lysosome, and the internal material is degraded in the autolysosome. In yeast, autophagosomes are generated from the preautophagosomal structure (PAS), which has not yet been identified in mammalian cells. A partial list of treatments and reagents that modulate autophagy are indicated. Notably, lithium may also inhibit autophagy through mTOR activation. Atg proteins that have thus far been identified on isolation membranes include ULK1/2, Atg5, Beclin 1, LC3, Atg12, Atg13, Atg14, Atg16L1, FIP200, and Atg101.

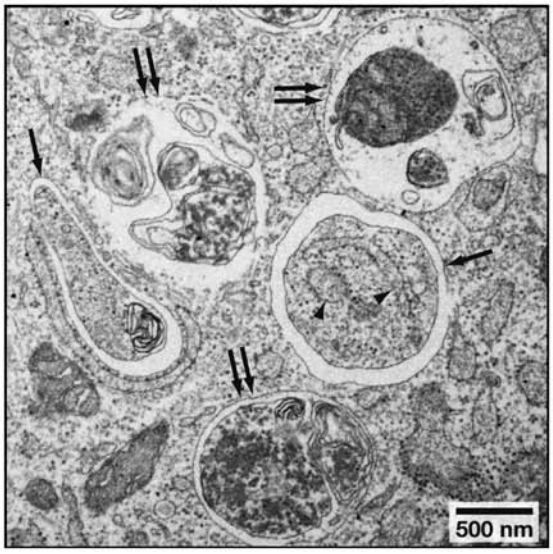


Figure 2. Autophagosome and Autolysosome Morphology
Electron microscopic analysis of nutrient-starved mouse embryonic fibroblasts. Arrows indicate autophagosomes and double arrows indicate autolysosomes/amphisomes. Arrowheads indicate fragments of endoplasmic reticulum inside the autophagosome. (Image courtesy of Chieko Kishi.)

in part, from increased autophagy (based on microscopic visualization of increased numbers of early intermediates in the pathway) when, in reality, the accumulation of early intermediates in such diseases likely represents a block in later stages of the autophagy pathway (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008; Rubinsztein, 2006). Autophagy, a common morphological feature in dying cells, was also often erroneously presumed to be a cell death pathway, whereas it now seems clear that one of its major functions is to fight to keep cells alive under stressful "life-threatening" conditions (Kroemer and Levine, 2008).

These historical challenges in mammalian autophagy research have been partially overcome by applying advances in the elucidation of autophagy's molecular mechanisms to the development of new methods in autophagy research. Accordingly, within the past decade, numerous new techniques have been developed both (1) to monitor autophagy as a dynamic process and (2) to modulate autophagy in order to probe its functions in a given cellular process. The aim of this Primer is to provide a critical overview of currently available techniques in mammalian autophagy research and the limitations in their interpretation. More detailed information on each technique can also be found in other reviews (Klionsky et al., 2008a; Mizushima, 2004; Mizushima and Yoshimori, 2007; Rubinsztein et al., 2009).

The Primer's Primer on Autophagy

Autophagy is a general term for processes by which cytoplasmic materials including organelles reach lysosomes for degradation (Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008; Rubinsztein, 2006). Among the three types of autophagy (macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy), the most extensively studied is macroautophagy. Chaperone-mediated autophagy involves the direct translocation of cytosolic proteins across the lysosomal membrane, which requires protein unfolding by chaperone proteins. Microautophagy involves inward invagination of lysosomal membrane, which delivers a small portion of cytoplasm into the lysosomal lumen.

Macroautophagy (simply referred to as autophagy hereafter) is the pathway that will be the focus of this Primer. This pathway is conserved from yeast to mammals, and is mediated by a special organelle termed the autophagosome. Upon induction, a small vesicular sac called the isolation membrane or phagophore elongates and subsequently encloses a portion of cytoplasm, which results in the formation of a double-membraned structure, the autophagosome (Figures 1 and 2). Then, the outer membrane of the autophagosome fuses with a lysosome (to form an autolysosome), leading to the degradation of the enclosed materials together with the inner autophagosomal membrane. The endosome can also fuse with the autophagosome (to form an amphisome) before fusion with the lysosome. Amino acids and other small molecules that are generated by autophagic degradation are delivered back to the cytoplasm for recycling or energy production. The methods described below detect different stages of the autophagy pathway (e.g., early autophagosome, autolysosome, autophagic degradation products) and should be used coordinately with each other to determine whether an increase in intermediates in the pathway represents a true increase in autophagic degradation or rather, a block in the completion of the autophagic pathway (Figures 3 and 4).

Under physiological conditions, autophagy has a number of vital roles such as maintenance of the amino acid pool during starvation, preimplantation development, prevention of neurodegeneration, antiaging, tumor suppression, clearance of intracellular microbes, and regulation of innate and adaptive immunity (Cecconi and Levine, 2008; Deretic and Levine, 2009; Levine and Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008; Rubinsztein, 2006). One of the characteristic features of autophagy is its dynamic regulation; cellular autophagic activity is usually low under basal conditions, but can be markedly upregulated by numerous stimuli. The most well-known inducer of autophagy is nutrient starvation, both in cultured cells and in intact organisms, ranging from yeast to mammals. Besides starvation, autophagy can also be activated by other physiological stress stimuli (e.g., hypoxia, energy depletion, endoplasmic reticulum stress, high temperature, and high-density conditions), hormonal stimulation, pharmacological agents (e.g., rapamycin and other compounds discussed below), innate immune signals, and in diseases such as bacterial, viral, and parasitic infections, acute pancreatitis, heart disease, and protein aggregopathies. Conversely, autophagy suppression is also often associated with certain diseases, including a subset of cancers, neurodegenerative disorders, infectious diseases, and inflammatory bowel disorders, and a decline in autophagy function is a common feature of aging. Given this strong association between autophagy and different physiological and pathophysiological processes, there is an increasing need for

scientific methods in autophagy research that reliably determine (1) whether autophagy is present, upregulated, or suppressed in a given biological context and (2) whether (and how) basal autophagy and/or modified autophagy contribute mechanistically to the physiological or pathophysiological process under investigation.

The execution of autophagy involves a set of evolutionarily conserved gene products, known as the Atg proteins, that are required for the formation of the isolation membrane and the autophagosome (herein referred to as the "autophagic machinery") (Table 1). The process of autophagosome formation involves two major steps: nucleation and elongation of the isolation membrane. The ULK/Atg1 kinase complex, the autophagy-specific PI3-kinase complex, and PI(3)P effectors and their related proteins are important for the nucleation step, whereas the Atg12- and LC3/Atg8-conjugation systems are important for the elongation step. In addition, other proteins required for autophagosome-lysosomal fusion, lysosomal acidification, and lysosomal digestion, and regulatory signals that integrate environmental cues with the autophagic machinery are involved in autophagy. Details of the molecular regulation and machinery of autophagy have been reviewed elsewhere (He and Klionsky, 2009; Longatti and Tooze, 2009). In mammalian cells, most of the Atg proteins are observed on isolation membranes (e.g., ULK1/2, Atg13, FIP200, Atg101, Beclin 1, Atg14, LC3, Atg12, Atg16L1) but not on complete autophagosomes (Longatti and Tooze, 2009) (Figure 1, Table 1). To date, only microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), a mammalian homolog of yeast Atg8, is known to exist on autophagosomes, and therefore, this protein serves as a widely used marker for autophagosomes (Figures 1 and 4) (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2004). The identification of the autophagic machinery has greatly facilitated the detection of autophagy (through LC3-based biochemical and microscopic assays), as well as the ability to experimentally manipulate the autophagy pathway (through knockout or knockdown of autophagy genes or the expression of dominant negative autophagy proteins). The autophagy pathway can also be manipulated with agents that regulate autophagosome formation or subsequent degradation steps (Figure 1).

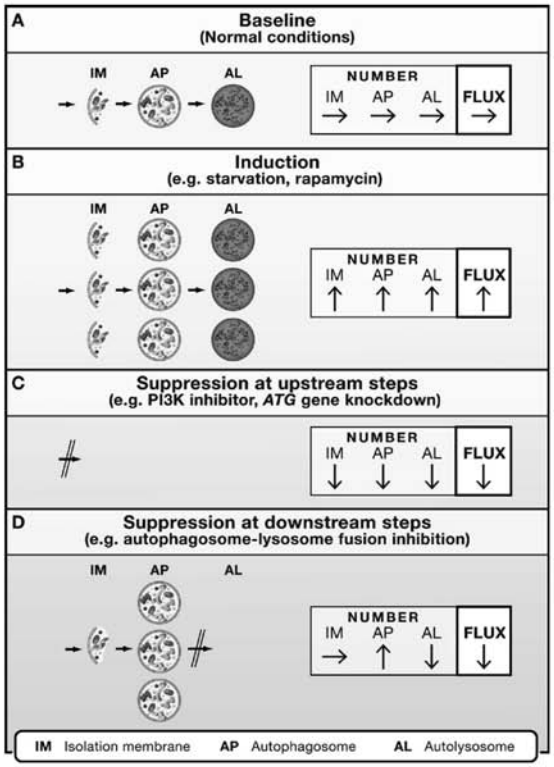


Figure 3. Dynamic Regulation of Autophagy and Cellular Accumulation of Different Autophagic Structures
Depicted are the relative amounts of isolation membrane (IM), autophagosomes (AP), and autolysosomes (AL).
(A) Under normal conditions, basal autophagy occurs.
(B) When autophagy is induced, for example by starvation, there is an increase in all types of autophagic structures.
(C) When autophagy is suppressed at any step upstream, none of the autophagic structures are generated.
(D) When autophagy is suppressed at any step after complete closure of the autophagosome, only autophagosomes accumulate.
Autophagic flux increases in (B), but decreases in (C) and (D).

Monitoring Cellular Autophagic Activity

A common misconception is the notion that increased numbers of autophagosomes in cells invariably correspond to increased cellular autophagic activity. Given that the autophagosome is an intermediate structure in a dynamic pathway, the number of autophagosomes observed at any specific time point is a function of the balance between the rate of their generation and the rate of their conversion into autolysosomes. Thus, autophagosome accumulation may represent either autophagy induction or, alternatively, suppression of steps in the autophagy pathway downstream of autophagosome formation. For example, compared to basal levels of autophagy (Figure 3A), autophagy activation is expected to result in an increase in the numbers of all autophagic structures (i.e., isolation membranes, autophagosomes, and autolysosomes) (Figure 3B). If any step upstream of autophagosome formation is blocked, the numbers of all autophagic structures are decreased (Figure 3C). In contrast, the blockade of any step downstream of autophagosome formation increases the number of autophagosomes while decreasing the number of autolysosomes (Figure 3D). Notably, in two physiologically opposite scenarios, autophagy activation (and increased autophagic degradation) (Figure 3B) and blockade of a downstream step in autophagy (and decreased autophagic degradation) (Figure 3D), there is an increase in the number of autophagosomes. Therefore, the simple determination of numbers of autophagosomes is insufficient for an overall estimation of autophagic activity. Rather, different methods often need to be used in concert to distinguish between basal levels of autophagy, induction of autophagy, suppression of upstream steps of autophagy, and suppression of downstream steps of autophagy. The term "autophagic flux" is used to denote the dynamic process of autophagosome synthesis, delivery of autophagic substrates to the lysosome, and degradation of autophagic substrates inside the lysosome and is

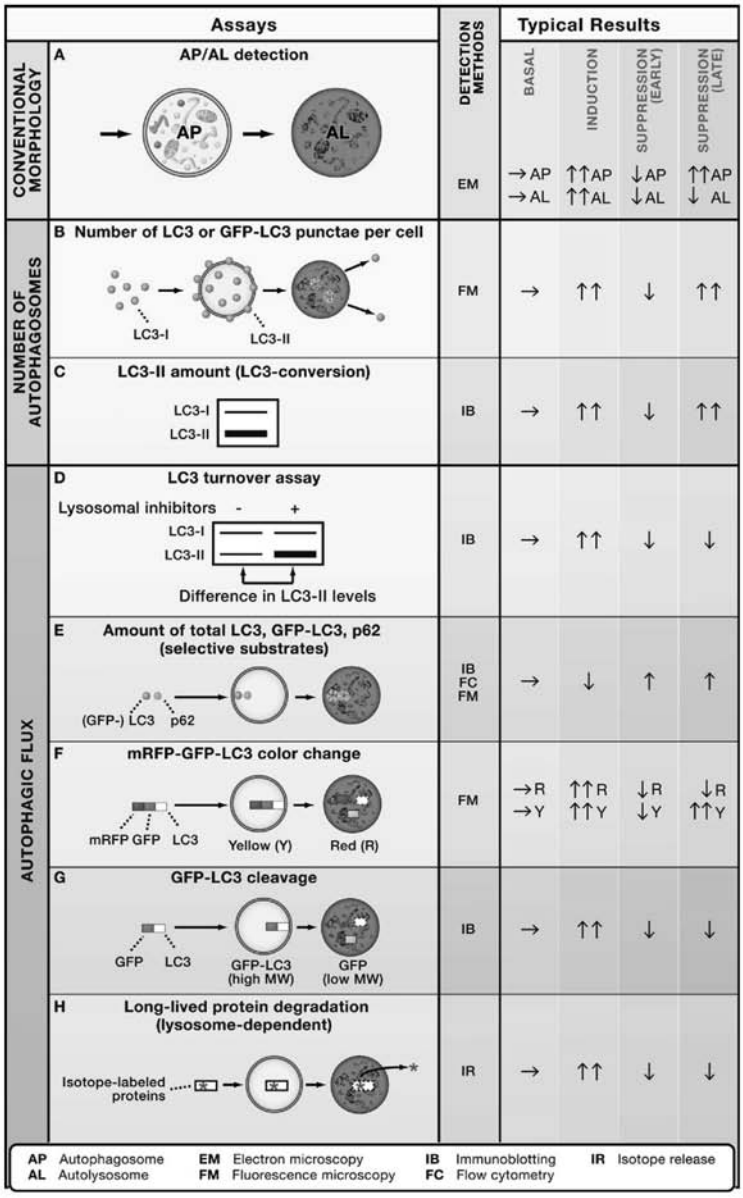


Figure 4. Methods for Monitoring Autophagosome Number and Autophagic Flux

(A) Detection of autophagosomes and autolysosomes by conventional electron microscopy.

(B) The GFP-LC3 (or endogenous LC3) puncta formation assay counts the average number of punctate structures per cell by fluorescence microscopy.

(C) Detection of the conversion of LC3-I (cytosolic form) to LC3-II (membrane-bound lipidated form) by immunoblotting.

(D) In the LC3 turnover assay, degradation of LC3-II inside the autolysosome is estimated by the comparison of two samples with and without lysosomal inhibitor treatment.

(E) Degradation of autophagy-selective substrates such as LC3 and p62 is detected by immunoblotting (LC3 is part of the autophagy machinery rather than a true substrate but is selectively degraded by autophagy). The degradation of GFP-LC3 can also be quantified by flow cytometry.

(F) Detection of autophagosomes labeled with a yellow signal (mRFP-GFP-LC3) and their maturation into autolysosomes labeled with a red signal (after quenching of GFP fluorescence in the lysosome).

(G) Detection of the GFP fragment generated by the degradation of GFP-LC3 inside autolysosomes by immunoblotting with an anti-GFP antibody.

(H) Measurement of long-lived protein degradation that is suppressed by autophagy inhibitors.

a more reliable indicator of autophagic activity than measurements of autophagosome numbers. In subsequent sections, we will discuss different methods for monitoring the number of autophagosomes and for monitoring autophagic flux.

Monitoring the Number of Autophagosomes

Three principal methods are presently used to monitor the number of autophagosomes, including electron microscopy, light microscopy detection of the subcellular localization of LC3, and biochemical detection of the membrane-associated form of LC3.

Electron Microscopy

The most traditional method is electron microscopy, and in fact, mammalian autophagy was originally discovered in the late 1950s by electron microscopists studying the lysosome. At the ultrastructural level, an autophagosome is defined as a double-membraned structure containing undigested cytoplasmic contents, which has not fused with a lysosome (Figures 2 and 4A). Autophagosomes often enclose intracellular organelles such as mitochondria and fragments of the endoplasmic reticulum (ER). As this definition is straightforward, it is usually easy to identify autophagosomes, or at least those organelles that envelop cellular contents. It is less clear how to interpret double-membraned structures that specifically enwrap intracellular pathogens: the life cycle of some pathogens may involve transit through autophagic-like intermediate structures (without eventual delivery to the lysosome), whereas in other cases, intracellular pathogens are truly captured by the autophagy pathway for lysosomal degradation. Another consideration is that the classic definition of an autophagosome includes the visualization of different cellular contents inside the double-membraned structure. Although this may

Table 1. Key Proteins in Mammalian Autophagosome Formation

Nucleation Step	Mammalian Protein	Yeast Ortholog	Feature
ULK/Atg1 complex[a]	ULK1, ULK2	Atg1	Protein kinase, phosphorylated by mTORC1
	Atg13	Atg13	Phosphorylated by mTORC1
	FIP200	–	Scaffold for ULK1/2 and Atg13
	Atg101	–	Interacts with Atg13
	–	Atg17, 29, 31	Interacts with Atg13
Class III PI3-kinase complex[b]	Vps34	Vps34	PI3-kinase
	p150	Vps15	Myristoylated
	Beclin 1	Vps30/Atg6	BH3-only protein, interacts with Bcl-2
	Atg14	Atg14	Autophagy-specific subunit
	Ambra1	–	Interacts with Beclin 1
Others[c]	Atg2	Atg2	Interacts with Atg18 in yeast
	Atg9	Atg9	Transmembrane protein
	WIPI1-4	Atg18	PI(3)P-binding proteins
	DFCP1	–	PI(3)P-binding ER protein
	VMP1	–	Transmembrane protein
Elongation Step			
Atg12-conjugation system[d]	Atg12	Atg12	Ubiquitin-like, conjugates to Atg5
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme
	Atg10	Atg10	E2-like enzyme
	Atg5	Atg5	Conjugated by Atg12
	Atg16L1	Atg16	Homodimer, interacts with Atg5
LC3/Atg8-conjugation system[e]	LC3 (GATE-16, GABARAP)	Atg8	Ubiquitin-like, conjugates to PE
	Atg4A-D	Atg4	LC3/Atg8 C-terminal hydrolase, deconjugating enzyme
	Atg7	Atg7	E1-like enzyme
	Atg3	Atg3	E2-like enzyme

[a]This complex is negatively regulated by mTORC1 in a nutrient-dependent manner. Upon autophagy induction, this complex translocates to early autophagic structures. Although FIP200 and Atg13 are known to be phosphorylated by ULK1, physiologically relevant substrates remain unknown. FIP200 and Atg101 may have functions similar to yeast Atg17, 29, and 31, although they show no sequence similarity with these proteins.
[b]Beclin 1 is negatively regulated by Bcl-2 through direct binding. This complex produces PI(3)P, most likely on the ER membrane. Vps34, p150, and Beclin 1 are shared with the UVRAG complex, which seems to function in the late endocytic pathway. Rubicon negatively regulates autophagosome-lysosome fusion through interaction with the UVRAG complex.
[c]DFCP1 forms an "omegasome" on the ER, where other Atg proteins are assembled. Atg9, WIPIs, and VMP1 are present on autophagic membrane. Atg9 also exists in other compartments such as endosomes and the Golgi apparatus.
[d]The Atg12-Atg5-Atg16(L) dimer is important for LC3/Atg8-phosphatidylethanolamine (PE) conjugation. This complex is present on the outer side of the isolation membrane and is essential for proper elongation of the isolation membrane.
[e]The formation of LC3/Atg8-PE conjugates and their deconjugation by Atg4 is important for isolation membrane elongation and/or complete closure. LC3/Atg8 is present on both inner and outer membranes of the autophagosome, and also serves as an adaptor for selective substrates such as p62, NBR1, and the yeast mitophagy protein, Atg32.

be the case in "bulk autophagy," there is increasing evidence for organelle-specific autophagy, including pexophagy, mitophagy, ribophagy, and reticulophagy (van der Vaart et al., 2008). Thus, the morphological criteria used to identify an autophagosome may need to be revised to incorporate recent evidence for pathogen-specific and organelle-specific autophagy in mammalian cells.

In contrast to an autophagosome containing cellular cargo (which is usually easy to identify), the distinction of autolysosomes from other cellular membranous compartments is often more difficult. The autolysosome is a hybrid organelle generated by the fusion of an autophagosome and a lysosome (an endosome can also be involved), which has a single limiting membrane and contains cytoplasmic materials at various stages of degradation. At early stages, the inside materials can be recognized as having originated from cytoplasm. However, if degradation proceeds too far, it is not easy to determine whether the inside materials are of intracellular origin. Furthermore, it is often difficult to distinguish autolysosomes from endocytic compartments (heterophagic vacuoles) or from certain other vacuoles/structures of unknown origin. In particular, vacuoles with no or scarce inside materials should not be judged as "autophagic" structures. Other typical examples of misinterpretation are discussed in more detail in another review (Eskelinen, 2008). Thus, although electron microscopy is a powerful tool, it is not a perfect method and it is limited in its potential for application to functional studies as described below.

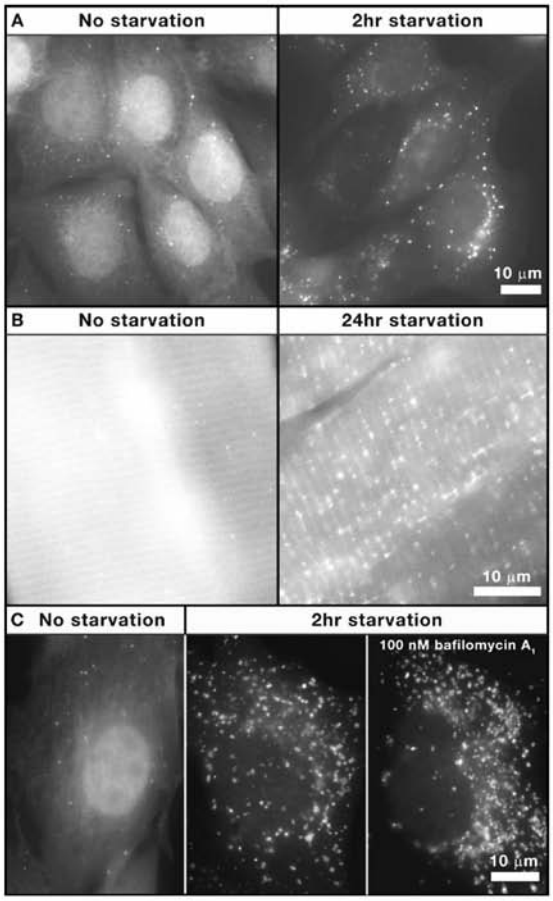


Figure 5. GFP-LC3 and mRFP-GFP-LC3 Puncta Formation Assays
(A) NIH 3T3 cells in culture stably expressing GFP-LC3 with (right) or without (left) 2 hr of starvation (depletion of both amino acids and serum). There is not only an increase in GFP-LC3 puncta number, but also a decrease in total GFP-LC3 fluorescent signals during the 2 hr incubation period.
(B) Example of an analysis of GFP-LC3 transgenic mice. Skeletal muscle (extensor digitorum longus) and heart muscle samples were prepared from GFP-LC3 transgenic mice before (left) or after (right) 24 hr of starvation.
(C) Mouse embryonic fibroblasts expressing mRFP-GFP-LC3 (left) were subjected to starvation treatment (2 hr) with (right) or without (middle) 100 nM bafilomycin A_1 to inhibit autophagosome/lysosome fusion. Note that both yellow (autophagosome) and red (autolysosome) puncta increase in the middle panel, whereas most puncta in the right panel are yellow (autophagosome). Scale bars represent 10 μm. (Images in A and C courtesy of Eisuke Itakura.)

Fluorescence Microscopy

The assessment of autophagosome number by electron microscopy requires considerable specialized expertise, and is becoming increasingly replaced by light microscopic and biochemical methods that are more widely accessible to researchers in different fields. As noted above, the mammalian autophagy protein, LC3, is a marker of autophagosomes (Figures 1 and 4B). Among the four LC3 isoforms, LC3B is most widely used. Soon after synthesis, nascent LC3 is processed at its C terminus by Atg4 and becomes LC3-I, which has a glycine residue at the C-terminal end. LC3-I is subsequently conjugated with phosphatidylethanolamine (PE) to become LC3-II (LC3-PE) by a ubiquitination-like enzymatic reaction. In contrast to the cytoplasmic localization of LC3-I, LC3-II associates with both the outer and inner membranes of the autophagosome (Figure 4B). After fusion with the lysosome, LC3 on the outer membrane is cleaved off by Atg4 and LC3 on the inner membrane is degraded by lysosomal enzymes, resulting in very low LC3 content in the autolysosome. Thus, endogenous LC3 or GFP-LC3 is visualized by fluorescence microscopy either as a diffuse cytoplasmic pool or as punctate structures that primarily represent autophagosomes (Figure 5A).

Although the number of punctate LC3 or GFP-LC3 structures per cell is usually an accurate measure of autophagosome number, this assay has some potential experimental pitfalls. First, there is potential for subjectivity, and a uniform approach needs to be established and applied by the investigator, both with respect to the method of quantitation and the criteria for defining a "puncta." The number of punctate structures can be counted visually (by an observer blinded to experimental condition) or automatically determined using computerized software image analysis programs (e.g., Top Hat algorithm of MetaMorph version 7.0 by Molecular Devices, and G-Count by G-Angstrom). Although puncta number is markedly increased after autophagy induction, small numbers of punctae are also observed even under normal conditions (Figure 5A). Therefore, "percentage of cells with GFP-LC3 punctae" is not an appropriate indicator (theoretically, it should be 100% in most cell types), unless a clear threshold can be established that effectively distinguishes "autophagy active" and "autophagy inactive" states; if so, results should then be expressed as the "percentage of cells with more than a certain number of punctae." In general, it is preferable to quantify the "average number of GFP-LC3 punctae per cell" in all cells in the population under evaluation. The "total area of GFP-LC3 punctae per cell" may also be analyzed with image analysis software, but in such a case, it is particularly important to rule out experimental artifacts due to the formation of large GFP-LC3 aggregates (see below).

A second potential pitfall with the detection of LC3 or GFP-LC3 punctate structures as a method to monitor autophagosome numbers is the observation that GFP-LC3, and probably even endogenous LC3, can be easily aggregated if overexpressed or coexpressed with other aggregate-prone proteins (Kuma et al., 2007). GFP-LC3 aggregates are often indistinguishable from true autophagosomes by fluorescence microscopy. However, certain precautions can be exercised to reduce the possibility of GFP-LC3 aggregation. The use of stable GFP-LC3 transformants is highly recommended, so that one can select clones that express appropriate levels of GFP-LC3 without artificial aggregation. When the GFP-LC3 construct is used in transient transfection experiments, caution should be exercised to avoid high levels of expression that result in artificial aggregation. Furthermore, it is possible to experimentally distinguish between nonspecific GFP-LC3 incorporation into aggregates versus GFP-LC3 incor-

poration into autophagosomes with the use of a C-terminal glycine mutant GFP-LC3 that is defective in ubiquitin-like conjugation with phosphatidylethanolamine (GFP-LC3^{G120A}) as a negative control (Tanida et al., 2008). In settings where autophagosome numbers are truly increased (versus non-specific GFP-LC3 aggregation), one should see increased wild-type GFP-LC3 punctae but not increased mutant GFP-LC3^{G120A} punctae (assuming that both wild-type and mutant GFP-LC3 forms are expressed at comparable levels).

The GFP-LC3 labeling method has been successfully applied to in vivo mammalian autophagy research by generating transgenic GFP-LC3 transgenic mice (Mizushima et al., 2004). Similar approaches have also been used in model organisms, including *Drosophila* (Rusten et al., 2004; Scott et al., 2004), nematodes (Meléndez et al., 2003), plants (Yoshimoto et al., 2004), and zebrafish (He et al., 2009). In GFP-LC3 transgenic mice, GFP-LC3 is ubiquitously expressed under the control of the CAG promoter, and the accumulation of GFP punctae (which represent autophagosomes) is observed in almost all tissues after a 24 hr fasting period (Figure 5B). One exception seems to be the brain, where the accumulation of GFP-LC3 punctae is not observed even after 48 hr of starvation. This may reflect the lack of autophagy regulation by nutritional conditions or alternatively, the very rapid turnover of autophagosomes in the brain. In addition to the systemic GFP-LC3 transgenic mice, tissue-specific transgenic mice expressing GFP-LC3 and mCherry-LC3 have also been generated (Iwai-Kanai et al., 2008; Zhu et al., 2007). These systemic and tissue-specific models have been successfully used to show reductions in autophagosome numbers in mice deficient in autophagy genes. They have also been used to show increases in autophagosome numbers under disease and stress conditions, for example, in hepatocytes expressing an α1-antitrypsin Z variant (Kamimoto et al., 2006), in degenerating Purkinje cell axons with a mutation that enhances excitotoxicity (Wang et al., 2006), and in heart muscle subjected to pressure overload or overexpressing a mutant αβ-crystallin protein (Tannous et al., 2008; Zhu et al., 2007). Thus, the monitoring of GFP-LC3 punctae in GFP-LC3 transgenic mice is a powerful method to assess whether different physiological and pathophysiological stimuli regulate autophagosome numbers in vivo.

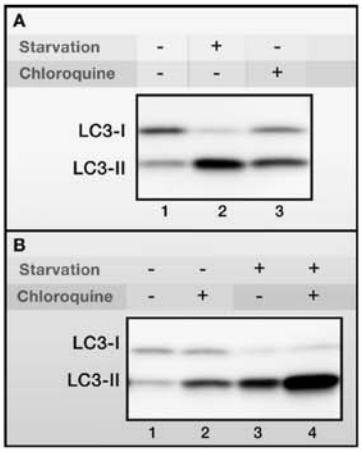


Figure 6. LC3 Conversion and Turnover Assays

(A) Steady-state levels of LC3 expression. Mouse embryonic fibroblasts were cultured in regular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) culture medium (lane 1), DMEM without amino acids and serum (lane 2), and regular DMEM containing 20 μM chloroquine (lane 3) for 1 hr. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with an anti-LC3 antibody. The positions of LC3-I and LC3-II are indicated.

(B) LC3 turnover assay. Cells were cultured as in (A), and the difference in LC3-II levels between samples with and without chloroquine was compared under nonstarvation and starvation conditions. (Data courtesy of Akiko Kuma.)

Biochemical Assays

In addition to its utility in fluorescence microscopy assays, LC3 is also useful in biochemical assays to assess autophagosome numbers. The conversion from endogenous LC3-I to LC3-II and from GFP-LC3-I to GFP-LC3-II can be detected by immunoblotting with antibodies against LC3 and GFP, respectively. Although the actual molecular weight (MW) of LC3-II (a PE-conjugated form) is larger than that of LC3-I, LC3-II (apparent MW is 14 kD) migrates faster than LC3-I (apparent MW is 16 kD) in SDS-PAGE because of extreme hydrophobicity of LC3-II (this is often misunderstood as "processing" because of the apparent size reduction) (Figures 4C and 6A). The amount of LC-II usually correlates well with the number of autophagosomes (or more precisely, in theory, the amount of autophagic membrane labeled with LC3-II) (Kabeya et al., 2000). However, not all LC3-II is present on autophagic membranes, and, importantly, some population of LC3-II seems to be ectopically generated in an autophagy-independent manner. For example, a significant amount of LC3-II is detectable in FIP200- and Atg14-deficient mouse embryonic fibroblasts (Hara et al., 2008; Matsunaga et al., 2009), in Beclin 1-deficient embryonic stem cells (Matsui et al., 2007) and in cells with RNA interference (RNAi)-mediated suppression of Beclin 1, Atg13, Atg14, and Vps34 (Hosokawa et al., 2009; Itakura et al., 2008; Matsui et al., 2007; Zeng et al., 2006), even though autophagosome formation and autophagic flux (see below) are completely or profoundly inhibited. Similarly, in yeast, Atg8 lipidation occurs in *atg1*, *2*, *6*, *9*, *13*, *14*, *16*, and *17* mutants (Suzuki et al., 2001). Therefore, in settings where certain components of the autophagic machinery are inactivated (genetically or pharmacologically), it is still possible that autophagy is suppressed even if LC3-II is detected. In such cases, other approaches including GFP-LC3 labeling methods and autophagic flux assays (described below) are required to assess autophagic activity.

Cautions

It should be noted that certain approaches sometimes used in the literature are not considered appropriate measures of autophagosome numbers (or autophagic activity) by most experts in the field. For example, the number and activity of lysosomes is not a reliable general indicator of autophagy, although it may work well in *Drosophila*. Therefore, at least for mammalian cells, we do not recommend the use of LysoTracker, Acridine orange, or monodansylcadaverine (MDC). (MDC was originally proposed to be a specific autophagosome indicator but was later demonstrated to have higher affinity for lysosomes [Bampton et al., 2005; Mizushima, 2004].) Second, although mammalian LC3, yeast Atg8, and certain other autophagy genes may be transcriptionally upregulated in response to stress conditions that induce autophagy (He and Klionsky,

2009), there is no clear evidence that autophagic activity per se is transcriptionally upregulated. Moreover, Atg proteins are constitutively expressed in sufficient amounts, and their posttranslational modifications and/or associations with other members of the autophagic machinery, rather than regulation of their expression levels, seems to be critical for their activity in the autophagy pathway. Therefore, Atg mRNA or protein expression levels are not considered appropriate indicators for monitoring autophagy.

Monitoring Autophagic Flux

The methods described in the above section are useful to evaluate the number of cellular autophagosomes, which generally—but not always—is an indicator of the level of cellular autophagic activity. As discussed above (and illustrated in Figure 3), the accumulation of autophagosomes is not always indicative of autophagy induction and may represent either the increased generation of autophagosomes and/or a block in autophagosomal maturation and the completion of the autophagy pathway. A similar concern is also true for the measurement of LC--II. For example, if cells are cultured with chloroquine, an agent that impairs lysosomal acidification, LC3-II accumulates even under normal (nonstarved) conditions because turnover of LC--II by basal autophagy is blocked (Figure 6A). Thus, one cannot distinguish between bona fide induction of autophagy (e.g., by starvation) and impairment of autophagolysosomal maturation simply by measuring autophagosome numbers (e.g., by electron microscopy or by light microscopy detection of LC3 or GFP-LC3 puncta) or by measuring levels of LC3-II (by immunoblot analysis). In most experimental settings, it is necessary to distinguish whether autophagosome accumulation is due to autophagy induction or rather a block in downstream steps, by performing "autophagic flux" assays (Figures 4D–4H and 6B) that distinguish between these two possibilities. It should be noted that the quantitation of relative numbers of autophagosomes and autolysosomes observed by electron microscopy can help discriminate between autophagy activation (in which both autophagosomes and autolysosomes are increased in numbers) and a block in autophagosome maturation (which is associated with an increase in autophagosome numbers without a change in autolysosome numbers) (Figure 4A). However, electron microscopy does not provide direct information about lysosomal degradation of autophagic substrates and, therefore, we do not formally classify it as an "autophagic flux" assay.

LC3 Turnover Assay

One of the principal methods in current use to measure autophagic flux is the monitoring of LC3 turnover, which is based on the observation that LC3-II is degraded in autolysosomes. As described above, if cells are treated with lysosomotropic reagents such as ammonium chloride, chloroquine, or bafilomycin A_1, which inhibit acidification inside the lysosome or inhibit autophagosome-lysosome fusion, or with inhibitors of lysosomal proteases such as E64d and pepstatin A, the degradation of LC3-II is blocked, resulting in the accumulation of LC3-II (Tanida et al., 2005). Accordingly, the differences in the amount of LC3-II between samples in the presence and absence of lysosomal inhibitors represent the amount of LC3 that is delivered to lysosomes for degradation (i.e., autophagic flux) (Figure 4D) (Klionsky et al., 2008a; Mizushima and Yoshimori, 2007; Rubinsztein et al., 2009). For example, levels of LC3-II are increased by treatment with chloroquine even under nonstarvation conditions (compare lanes 1 and 2, Figure 6B). However, the difference in LC3-II levels in the presence and absence of chloroquine is larger under starvation conditions (compare lanes 3 and 4, Figure 6B), indicating that autophagic flux is increased during starvation.

Although the LC3 turnover assay is theoretically straightforward, in some experimental settings, it can be challenging to obtain meaningful results and reliably detect autophagic flux. This may in part reflect the highly sensitive nature of the assay; in particular, a high rate of flux can be detected even during basal conditions (for example, in HeLa cells grown in normal media), which makes it difficult in such settings to detect additional changes in LC3 turnover upon autophagy upregulation. Therefore, we propose that the measurement of LC3 turnover should not be the single "sine qua non" for evaluating autophagic flux. Rather, it should be viewed as a reliable indicator of autophagic flux in some settings, but in other settings, autophagic flux may need to be measured by a combination of other techniques (described below) that will yield more useful information.

Degradation of LC3 and Selective Substrates

As LC3 is degraded by autophagy, the disappearance of total LC3 is paradoxically a good indicator of autophagic flux (Figure 4E). Even the amount of LC3-II, which increases transiently upon induction of autophagy, is decreased after longer periods of autophagy activation (e.g., more than 2 hr of starvation) (Mizushima and Yoshimori, 2007). Similarly, cells under starvation exhibit a large number of GFP-LC3 puncta, but the cytoplasmic GFP-LC3 signal and the GFP-LC3 nuclear signal (the significance of which is unknown) are both reduced after autophagy induction (Figure 5A). This reduction of total GFP-LC3 expression can be quantitatively and sensitively monitored by flow cytometry (Shvets et al., 2008). Thus, the amount of total cellular LC3 that can be quantitated by immunoblot analysis or flow cytometry (or observed qualitatively by fluorescence microscopy) inversely correlates with autophagic flux. One important implication of this relates to the interpretation of LC3 staining in histological studies. Increased LC3 staining is sometimes interpreted as evidence for autophagy activation; however, such an observation may instead indicate that autophagy is suppressed, resulting in decreased autolysosomal degradation of LC3.

Besides LC3, levels of other autophagy substrates can be used to monitor autophagic flux. Classically, autophagy was considered to be a random degradation system, but recent studies have revealed that several specific substrates are preferentially degraded by autophagy, of which the best studied example is p62 (also known as SQSTM1/sequestome 1). p62 is selectively incorporated into autophagosomes through direct binding to LC3 and is efficiently degraded by autophagy (Figure 4E) (Bjørkøy et al., 2005); thus, the total cellular expression levels of p62 inversely correlate with autophagic activity. For example, a starvation-induced reduction in p62 levels is not observed in autophagy-deficient cells, and instead, p62

Table 2. Materials Discussed in This Primer	
Addgene	
GFP-LC3 plasmid	http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=showcol&colid=623
mRFP-GFP-LC3 (ptfLC3) plasmid	http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=showcol&colid=623
Atg4BC74A plasmid (pmStrawberry-Atg4BC74A)	http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=showcol&colid=623
Riken BioResource Center, Cell Bank	
Atg5−/− mouse embryonic fibroblast	http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB2711&type=1
Atg5+/+ mouse embryonic fibroblast	http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=RCB2710&type=1
Riken BioResource Center, Experimental Animal Division	
GFP-LC3 mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.cgi?reg_no=00806
Atg5+/− mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.cgi?reg_no=02231
Atg5flox mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02975
Atg7+/− mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02760
Atg7flox mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02759
Atg3+/− mice	http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC02761

accumulates (Mizushima and Yoshimori, 2007). In numerous studies, the measurement of cellular p62 appears to correlate well with other parameters of autophagic flux, and overall, this assay seems quite promising. However, it should be noted that it is not yet clear whether p62 is degraded solely through autophagy or partially through the ubiquitin-proteasome pathway. Moreover, p62, as well as LC3, can be transcriptionally regulated during autophagy (He and Klionsky, 2009; Nakaso et al., 2004), which may confound the interpretation of p62 and LC3 levels as indicators of autophagic flux. Given these potential limitations, we recommend that the measurement of autophagic substrate levels be used in combination with other independent experiments to evaluate autophagic flux.

Delivery of mRFP-GFP-LC3 to the Lysosome

Another useful assay to measure autophagic flux is based on the concept of lysosomal quenching of GFP in GFP-labeled autophagic substrates such as LC3 (Figure 4F). GFP is a stably folded protein and relatively resistant to lysosomal proteases. However, the low pH inside the lysosome quenches the fluorescent signal of GFP, which makes it difficult to trace the delivery of GFP-LC3 to lysosomes; indeed, most GFP-LC3 punctate signals do not colocalize with lysosomes (Bampton et al., 2005; Kabeya et al., 2000). In contrast, RFP (and other red fluorescent proteins, such as mCherry) exhibits more stable fluorescence in acidic compartments (Katayama et al., 2008), and mRFP-LC3 can readily be detected in autolysosomes (Table 2). By exploiting the difference in the nature of these two fluorescent proteins (i.e., lysosomal quenching of GFP fluorescence versus lysosomal stability of RFP fluorescence), autophagic flux can be morphologically traced with an mRFP-GFP-LC3 tandem construct (Figures 4F and 5C) (Kimura et al., 2007). With this novel construct, autophagosomes and autolysosomes are labeled with yellow (i.e., mRFP and GFP) and red (i.e., mRFP only) signals, respectively. If autophagic flux is increased, both yellow and red punctae are increased; however, if autophagosome maturation into autolysosomes is blocked, only yellow punctae are increased without a concomitant increase in red punctae. Although this assay can be used as an indicator of autophagic flux, it does not provide precisely the same information as other flux assays that directly measure endpoints of lysosomal degradation. This method depends on the acidification and degradation capacity of the lysosome. It is, therefore, sometimes possible that autolysosomes are observed as yellow, depending on the activity of lysosomal enzymes and the speed at which the acidic lysosomal pH quenches the GFP signal.

GFP-LC3 Cleavage Assay

Although GFP fluorescence is quenched by the acidic pH environment inside the lysosome, GFP is still detectable by immunoblotting and is more stable than the GFP-LC3 fusion protein (which is partially degraded upon reaching the lysosome, resulting in the appearance of a free GFP fragment) (Gao et al., 2008; Hosokawa et al., 2006). Therefore, another assay to measure autophagic flux is the detection of the free GFP fragment that is generated by degradation of GFP-LC3 in the autolysosome by immunoblotting with an anti-GFP antibody (Figure 4G). Although this assay has been fairly widely used in yeast cells expressing GFP-Atg8, experience is more limited in mammalian cells. In some cases, depending on the activity and acidity of lysosomes (which may differ between cell types), this assay may not be successful as a result of GFP degradation in the autolysosome.

Long-Lived Protein Degradation

One of the most traditional methods to evaluate autophagic flux, developed in the 1970s, is the measurement of bulk degradation of long-lived proteins (Figure 4H). In this assay, cells are cultured with isotope-labeled amino acids (usually [^{14}C]- or [^{3}H]-valine or leucine) for a long duration (several hours to several days) to label long-lived proteins, followed by a short incubation period without isotope-labeled amino acids to wash out radiolabeled short-lived proteins, which are primarily degraded by the proteasome. After treatment with an autophagy-inducing stimulus, the cellular release of degraded proteins (measured as tricholoracetic acid-soluble radioactivity in the culture supernatant) is quantified. This may be the most quantitative assay, because it provides a precise numerical readout that reflects the fate of all long-lived cellular proteins and avoids the pitfalls associated with measuring a single autophagic substrate. To ensure that one is truly measuring the contribution of "autophagic degradation" (versus other potential pathways

that may contribute to long-lived protein degradation), it is standard practice to compare degradation rates between samples cultured in the presence or absence of an autophagy inhibitor (e.g., 3-methyladenine [3-MA]). One weakness of this assay is that its interpretation depends entirely on the specificity and efficiency of the autophagy inhibitors used (discussed below).

Cautions

As reviewed in this section, several different assays are presently available to monitor autophagic flux, including the LC3 turnover assay, measurements of total levels of autophagic substrates (e.g., LC3, GFP-LC3, or p62), analysis of the mRFP-GFP-LC3 color change, measurement of free GFP generated from GFP-LC3, and measurement of lysosome-dependent long-lived protein degradation. The utility and limitations of each of these assays may vary somewhat in different cell types and in different experimental contexts; therefore, we propose that the choice of assays used to measure autophagic flux be "custom-tailored" accordingly. As the limitations of the individual assays are largely nonoverlapping, we recommend using a combination of different assays to measure autophagic flux. In this manner, it should be possible to reliably monitor autophagic flux (and thereby autophagic activity) in most mammalian tissue culture settings. Unfortunately, only a limited number of methods have been reported for monitoring autophagic flux in vivo (Iwai-Kanai et al., 2008). Although p62 levels have been reported to increase in the tissues of autophagy-deficient mice (Komatsu et al., 2007), it is not yet known how p62 levels correlate with autophagy induction in vivo. Similar to the GFP-LC3 transgenic mice that have been a useful tool for monitoring autophagosome numbers in vivo, it should be possible to generate GFP-RFP-LC3 transgenic mice that can be used to monitor autophagic flux in vivo. A more difficult, but extremely important, challenge will be to develop assays to measure autophagic flux in patients (and in blood and tissue samples from patients).

Inhibition of Autophagic Activity

To fully understand a given biological process, it is usually critical to perform experiments to modulate the activity of the process. One of the most serious problems in current autophagy research is that we still lack highly specific autophagy inhibitors and activators. Nonetheless, several modulators are now available, and genetic manipulation techniques have also provided powerful tools (Figure 1) (Rubinsztein et al., 2007). In this section and the subsequent section, we discuss different pharmacological and genetic approaches to inhibit and activate autophagy, respectively.

As autophagosome formation requires class III PI3-kinase activity, one of the most commonly used pharmacological approaches to inhibit autophagy in vitro involves the use of PI3-kinase inhibitors such as wortmannin, LY294002, or 3-MA (Blommaart et al., 1997; Itakura et al., 2008; Matsunaga et al., 2009). However, it should be noted that all of these reagents can inhibit both class I PI3-kinase activity (which inhibits autophagy) as well as class III PI3 kinase activity (which is required for autophagy) (Knight et al., 2006), and some of the PI3-kinase inhibitors, such as LY294002 and wortmannin, also inhibit mTOR (an autophagy-inhibitory molecule) by targeting its ATP binding site (Brunn et al., 1996). Moreover, as PI3-kinases (both class I and class III) regulate diverse cell signaling and membrane trafficking processes, these PI3-kinase inhibitors are not autophagy specific. Another concern is that 3-MA, which is used at very high concentrations to inhibit autophagy (usually 10 mM), can target other kinases and affect other cellular processes such as glycogen metabolism, lysosomal acidification (Caro et al., 1988), endocytosis (Punnonen et al., 1994), and the mitochondrial permeability transition (Xue et al., 2002). Indeed, 3-MA can suppress proteolysis even in Atg5-deficient cells, suggesting that its effects on protein degradation extend beyond its role in autophagy inhibition (Mizushima et al., 2001).

Although PI3-kinase inhibitors block the formation of autophagosomes, the other major pharmacological inhibitors in experimental use block later stages of autophagy (Figure 1). Microtubule-disrupting agents (e.g., vinblastine and nocodazole) inhibit autophagosome-lysosome fusion, a step in the pathway that requires microtubules (Jahreiss et al., 2008; Kimura et al., 2008). Final degradation of autophagic cargo inside autolysosomes can also be inhibited by ammonium chloride, bafilomycin A_1, and lysosomal protease inhibitors such as E64d and pepstatin A (Figure 1). Although bafilomycin A_1 was originally reported to inhibit autophagosome-lysosome fusion (Yamamoto et al., 1998), a recent study suggests that it primarily affects intralysosomal degradation by inhibiting acidification, at least under certain conditions (Klionsky et al., 2008b).

One major limitation is that disruption of microtubules and inhibition of lysosomal degradation affect other cellular processes besides autophagy such as mitosis and endocytosis. Accordingly, as with the PI3-kinase inhibitors, caution needs to be exercised in interpreting phenotypes observed with such treatments. Given the lack of specificity of these currently available autophagy inhibitors, we recommend that investigators avoid drawing conclusions about the functions of autophagy based upon studies that rely uniquely upon the pharmacological inhibition of autophagy. Rather, pharmacological studies should be combined with genetic approaches to more specifically inhibit the autophagy pathway.

More specific inhibition of the autophagy pathway can be achieved by knockout or knockdown of different *ATG* genes. To date, autophagy deficiency/reduction has been confirmed in cells lacking Atg3 (Sou et al., 2008), Atg5 (Mizushima et al., 2001), Beclin 1 (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003), Atg7 (Komatsu et al., 2005), Atg9a (Saitoh et al., 2009), Atg16L1 (Cadwell et al., 2008; Saitoh et al., 2008), FIP200 (Hara et al., 2008) and Ambra1 (Fimia et al., 2007). The knockout of Atg4C (Mariño et al., 2007), LC3B (Cann et al., 2007), and ULK1 (Kundu et al., 2008) results in mild phenotypes in vivo, probably because related isoforms compensate for the gene deficiency. Therefore, these genes should not be used as first choice RNAi targets for autophagy knockdown experiments (although small interfering RNA [siRNA] against ULK1 is effective at least in certain cell types (Chan et al., 2007). Another consideration with RNAi-mediated approaches to autophagy inhibition is that certain Atg proteins (e.g., Atg5; Hosokawa et al., 2006) still function normally in autophagy when present at very low levels; in such cases, RNAi-mediated silencing will require nearly

complete suppression of protein expression to observe effective autophagy inhibition. Thus, when performing autophagy gene knockdown experiments, we recommend that investigators not only confirm effective knockdown of autophagy protein expression levels with each siRNA, but also confirm effective inhibition of the autophagy pathway using a known autophagy-inducing stimulus such as starvation.

Another successful approach for genetic inhibition of autophagy involves the utilization of dominant-negative mutant autophagy proteins. These include kinase-dead mutants of ULK1 (ULK1^{K46N}, ULK1^{K46R}, and ULK1^{K46I}) (Chan et al., 2009; Hara et al., 2008), Atg4B^{C74A} (Fujita et al., 2008a), and the coiled-coil region of Atg16L1 (Fujita et al., 2008b). In addition, the overexpression of wild-type Atg12 and Atg16L1 (Fujita et al., 2008b) and a conjugation-defective Atg5 mutant (Atg5^{K130R}) (Pyo et al., 2005) result in dominant-negative effects. As the effect of these dominant-negative mutants is sometimes context and/or cell-type specific, it is important to confirm the inhibitory effect in each experiment.

Of note, most *ATG* gene deletions or dominant-negative mutant autophagy proteins block initiation of autophagosome formation (Figure 1, Table 1). However, abnormally elongated membranes are observed in *Atg3* knockout cells (Sou et al., 2008), *Atg5* knockout cells (Mizushima et al., 2001; Nishiyama et al., 2007), and Atg4B^{C74A}-expressing cells (Fujita et al., 2008a), suggesting that these factors, which belong to the Atg12 and Atg8/LC3 conjugation systems, may also be important for the complete closure of autophagosomes (Figure 1).

In theory, autophagy gene knockdown/knockout represents a more specific approach than pharmacological agents to inhibit autophagy. However, one important cautionary note is that the Atg proteins may not be entirely specific for autophagy; they may have autophagy-independent functions, including a role in cell death, endocytosis, and immunity-related GTPase trafficking (Kroemer and Levine, 2008; Virgin and Levine, 2009). Moreover, divergent functions for Atg proteins are suggested by the nonoverlapping phenotypes of different *ATG* gene knockout mice. The phenotypes of targeted mutant mice deficient in Atg3 (Sou et al., 2008), Atg5 (Kuma et al., 2004), Atg7 (Komatsu et al., 2005), Atg9a (Saitoh et al., 2009), and Atg16L1 (Saitoh et al., 2008) are essentially the same (neonatal lethality), whereas embryonic lethality is observed in mice deficient in Beclin 1 (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003), FIP200 (Gan et al., 2006), and Ambra1 (Fimia et al., 2007). Thus, given the possibility that any individual Atg protein may also have autophagy-independent functions, a combination of different genetic approaches (i.e., targeting different genes that act at different steps in the autophagy pathway) is advised to increase the likelihood that observed phenotypes in the setting of autophagy gene knockdown/knockout are truly due to inhibition of autophagic activity.

Activation of Autophagic Activity

There is growing interest in activators of autophagy, not only for research purposes but also for potential therapeutic purposes. Similar to the case with autophagy inhibitors, there are several different methods to activate autophagy, but they lack complete specificity for the autophagy pathway. As stated above, the most potent known physiological inducer of autophagy is starvation, which exerts effects both in vitro and in vivo (withdrawal of amino acids is more potent than withdrawal of serum or growth factors in vitro) (Figure 1). In most cell lines, autophagy induction can be observed within 1 hr of amino acid withdrawal; a notable exception is that certain tumor cell lines may be resistant to starvation-induced autophagy. Another approach to activate autophagy is through the modulation of nutrient-sensing signaling pathways. The best target is mTOR, which is a potent suppressor of autophagy. Rapamycin, an inhibitor of mTOR, and its analogs, such as CCI-779, activate autophagy both in vitro and in vivo (Ravikumar et al., 2004). One limitation of rapamycin in mammalian cells is that it seems to only exert partial effects at least with respect to autophagy induction and 4E-BP1 dephosphorylation (Thoreen et al., 2009). Recently developed ATP-competitive inhibitors of mTOR such as Torin1 (Thoreen et al., 2009) and PP242 (Feldman et al., 2009) show stronger inhibitory activity and may have more promise as autophagy-inducing agents. Of note, starvation and mTOR inhibition are not specific inducers of autophagy; these treatments affect a wide range of cellular responses, particularly protein synthesis and cellular metabolism, in addition to autophagy activation.

Several mTOR-independent autophagy activators have also been reported (Figure 1). Lithium induces autophagy through inhibition of inositol monophosphatase (which is mTOR-independent), but it also attenuates autophagy through glycogen synthase kinase-3β inhibition (which is mTOR-dependent) (Sarkar et al., 2008); therefore, if used to activate autophagy, lithium should always be combined with mTOR inhibitors. BH3 mimetics such as ABT737 (and similar compounds in pre-clinical development) induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2 or Bcl-X_L (Maiuri et al., 2007). Trehalose and small-molecule enhancers of rapamycin (SMERs) also induce autophagy by mechanisms that are not well understood (Sarkar et al., 2007a; Sarkar et al., 2007b). Two screens of FDA-approved compounds identified additional agents that induce autophagy in an mTOR-independent manner, including fluspirilene, trifluoperazine, pimozide, nicardipine, niguildipine, loperamide, and amiodarone (Zhang et al., 2007), and verapamil, minoxidil, and clonidine (Williams et al., 2008). To achieve maximal autophagy induction either in vitro (or in vivo in patients), it may be desirable to combine reagents that act in an mTOR-independent manner with rapamycin or other mTOR inhibitors to achieve additive effects in autophagy activation.

Concluding Remarks

We have discussed currently available techniques and methods to monitor and modulate autophagy in mammalian cells. There is no perfect method to measure autophagosome numbers or to measure autophagic flux, and no perfect method to specifically activate or inhibit the autophagy pathway. Accordingly, it should be emphasized that there is no single "gold standard" for methods to monitor or modulate autophagic activity. Rather, one should consider the use of several different concurrent methods (with nonoverlapping limitations) to accurately assess the status and functions of autophagic

activity in any given biological setting. With further elucidation of the molecular mechanisms of autophagy, it is anticipated that better assays will be developed to monitor autophagy and more specific agents will be developed to modulate autophagy. Such advances will be critical for an improved understanding of the biological functions of autophagy and for the successful development of therapies that modulate autophagy for use in clinical medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Akiko Kuma, Eisuke Itakura, and Chieko Kishi for providing the data used in this manuscript. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (N.M. and T.Y.), the Toray Science Foundation (N.M.), the Takeda Science Foundation (N.M. and T.Y.), and National Institutes of Health grants RO1 CA85254, RO1 CA109618, and U54 AI057156 (B.L.).

REFERENCES

Bampton, E.T.W., Goemans, C.G., Niranjan, D., Mizushima, N., and Tolkovsky, A.M. (2005). The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. Autophagy *1*, 23–36.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J. Cell Biol. *171*, 603–614.

Blommaart, E.F.C., Krause, U., Schellens, J.P.M., Vreeling-Sindelárová, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. *243*, 240–246.

Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., Jr., and Abraham, R.T. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. EMBO J. *15*, 5256–5267.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. Nature *456*, 259–263.

Cann, G.M., Guignabert, C., Ying, L., Deshpande, N., Bekker, J.M., Wang, L., Zhou, B., and Rabinovitch, M. (2007). Developmental expression of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. Dev. Dyn. *237*, 187–195.

Caro, L.H., Plomp, P.J., Wolvetang, E.J., Kerkhof, C., and Meijer, A.J. (1988). 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. Eur. J. Biochem. *175*, 325–329.

Cecconi, F., and Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. Dev. Cell *15*, 344–357.

Chan, E.Y.W., Kir, S., and Tooze, S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. J. Biol. Chem. *282*, 25464–25474.

Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. Mol. Cell. Biol. *29*, 157–171.

Deretic, V., and Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. Cell Host Microbe *5*, 527–549.

Eskelinen, E.L. (2008). To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. Autophagy *4*, 257–260.

Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., and Shokat, K.M. (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. PLoS Biol. *7*, e38.

Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., et al. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. Nature *447*, 1121–1125.

Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008a). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. Mol. Biol. Cell *19*, 4651–4659.

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008b). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. Mol. Biol. Cell *19*, 2092–2100.

Gan, B., Peng, X., Nagy, T., Alcaraz, A., Gu, H., and Guan, J.L. (2006). Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNFalpha and TSC-mTOR signaling pathways. J. Cell Biol. *175*, 121–133.

Gao, W., Ding, W.X., Stolz, D.B., and Yin, X.M. (2008). Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. Autophagy *4*, 754–761.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. J. Cell Biol. *181*, 497–510.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet. *43*, 67–93.

He, C., Bartholomew, C.R., Zhou, W., and Klionsky, D.J. (2009). Assaying autophagic activity in transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. Autophagy *5*, 520–526.

Hosokawa, N., Hara, Y., and Mizushima, N. (2006). Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size. FEBS Lett. *580*, 2623–2629.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol. Biol. Cell *20*, 1981–1991.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. Mol. Biol. Cell *19*, 5360–5372.

Iwai-Kanai, E., Yuan, H., Huang, C., Sayen, M.R., Perry-Garza, C.N., Kim, L., and Gottlieb, R.A. (2008). A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. Autophagy *4*, 322–329.

Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. Traffic *9*, 574–587.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J. *19*, 5720–5728.

Kamimoto, T., Shoji, S., Hidvegi, T., Mizushima, N., Umebayashi, K., Perlmutter, D.H., and Yoshimori, T. (2006). Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. J. Biol. Chem. *281*, 4467–4476.

Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2008). GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. Cell Struct. Funct. *33*, 1–12.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy *3*, 452–460.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. Cell Struct. Funct. *33*, 109–122.

Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2008a). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. Autophagy *4*, 151–175.

Klionsky, D.J., Elazar, Z., Seglen, P.O., and Rubinsztein, D.C. (2008b). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? Autophagy *4*, 849–950.

Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., et al. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. Cell *125*, 733–747.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. J. Cell Biol. *169*, 425–434.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.I., Ezaki, J., Murata, S., et al. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. Cell *131*, 1149–1163.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 1004–1010.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature *432*, 1032–1036.

Kuma, A., Matsui, M., and Mizushima, N. (2007). LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. Autophagy *3*, 323–328.

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A., and Thompson, C.B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. Blood *112*, 1493–1502.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell *132*, 27–42.

Longatti, A., and Tooze, S.A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. Cell Death Differ. *16*, 956–965.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. EMBO J. *26*, 2527–2539.

Mariño, G., Salvador-Montoliu, N., Fueyo, A., Knecht, E., Mizushima, N., and López-Otín, C. (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. J. Biol. Chem. *282*, 18573–18583.

Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., and Sadoshima, J. (2007). Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. Circ. Res. *100*, 914–922.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Nat. Cell Biol. *11*, 385–396.

Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D.H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. Science *301*, 1387–1391.

Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2491–2502.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. Autophagy *3*, 542–545.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. J. Cell Biol. *152*, 657–668.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. Mol. Biol. Cell *15*, 1101–1111.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature *451*, 1069–1075.

Nakaso, K., Yoshimoto, Y., Nakano, T., Takeshima, T., Fukuhara, Y., Yasui, K., Araga, S., Yanagawa, T., Ishii, T., and Nakashima, K. (2004). Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. Brain Res. *1012*, 42–51.

Nishiyama, J., Miura, E., Mizushima, N., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2007). Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. Autophagy *3*, 591–596.

Punnonen, E.-L., Marjomäki, V.S., and Reunanen, H. (1994). 3-Methyladenine inhibits transport from late endosomes to lysosomes in cultured rat and mouse fibroblasts. Eur. J. Cell Biol. *65*, 14–25.

Pyo, J.O., Jang, M.H., Kwon, Y.K., Lee, H.J., Jun, J.I., Woo, H.N., Cho, D.H., Choi, B., Lee, H., Kim, J.H., et al. (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. J. Biol. Chem. *280*, 20722–20729.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin 1* autophagy gene. J. Clin. Invest. *112*, 1809–1820.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat. Genet. *36*, 585–595.

Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. Nature *443*, 780–786.

Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., and Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. Nat. Rev. Drug Discov. *6*, 304–312.

Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., and Klionsky, D.J. (2009). In search of an "autophagomometer". Autophagy *5*, 585–589.

Rusten, T.E., Lindmo, K., Juhász, G., Sass, M., Seglen, P.O., Brech, A., and Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. Dev. Cell *7*, 179–192.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1β production. Nature *456*, 264–268.

Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., et al. (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Published online November 19, 2009.

Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D.C. (2007a). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. J. Biol. Chem. *282*, 5641–5652.

Sarkar, S., Perlstein, E.O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R.L., Webster, J.A., Lewis, T.A., O'Kane, C.J., Schreiber, S.L., and Rubinsztein, D.C. (2007b). Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. Nat. Chem. Biol. *3*, 331–338.

Sarkar, S., Krishna, G., Imarisio, S., Saiki, S., O'Kane, C.J., and Rubinsztein, D.C. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. Hum. Mol. Genet. *17*, 170–178.

Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. Dev. Cell *7*,

167–178.

Shvets, E., Fass, E., and Elazar, Z. (2008). Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. Autophagy *4*, 621–628.

Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., et al. (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. Mol. Biol. Cell *19*, 4762–4775.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. EMBO J. *20*, 5971–5981.

Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. Autophagy *1*, 84–91.

Tanida, I., Yamaji, T., Ueno, T., Ishiura, S., Kominami, E., and Hanada, K. (2008). Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. Autophagy *4*, 131–134.

Tannous, P., Zhu, H., Johnstone, J.L., Shelton, J.M., Rajasekaran, N.S., Benjamin, I.J., Nguyen, L., Gerard, R.D., Levine, B., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2008). Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 9745–9750.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. J. Biol. Chem. *284*, 8023–8032.

van der Vaart, A., Mari, M., and Reggiori, F. (2008). A picky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. Traffic *9*, 281–289.

Virgin, H.W., and Levine, B. (2009). Autophagy genes in immunity. Nat. Immunol. *10*, 461–470.

Wang, Q.J., Ding, Y., Kohtz, D.S., Kohtz, S., Mizushima, N., Cristea, I.M., Rout, M.P., Chait, B.T., Zhong, Y., Heintz, N., and Yue, Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. J. Neurosci. *26*, 8057–8068.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., et al. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. Nat. Chem. Biol. *4*, 295–305.

Xue, L., Borutaite, V., and Tolkovsky, A.M. (2002). Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. Biochem. Pharmacol. *64*, 441–449.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A_1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct. Funct. *23*, 33–42.

Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. Plant Cell *16*, 2967–2983.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100*, 15077–15082.

Zeng, X., Overmeyer, J.H., and Maltese, W.A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. J. Cell Sci. *119*, 259–270.

Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., Zhu, H., Yu, A.D., Xie, X., Ma, D., and Yuan, J. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 19023–19028.

Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J.L., Kong, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Le, V., Levine, B., Rothermel, B.A., and Hill, J.A. (2007). Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. J. Clin. Invest. *117*, 1782–1793.

MEMO

細菌感染制御学分野

中川 一路

医歯学総合研究科・教授
細菌感染制御学

1）研究の課題名

①細胞内侵入性細菌の認識機構と細胞内分解機構の解析

Molecular analysis of recognition system and inflammation responses against bacterial infection.

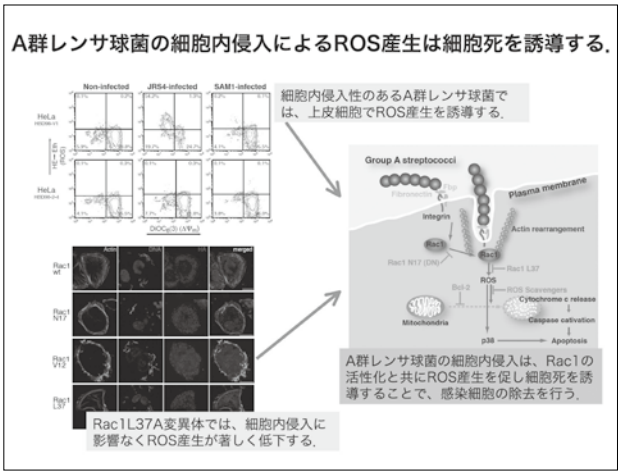
病原性細菌の病原性の発揮は,宿主組織への付着により生体組織に定着することから開始する.そのため,生体を広く覆う上皮や粘膜といった組織は,これらの菌の侵入を感知する最前線の組織であり,かつ重要な防御組織となっている.近年,多くの細菌種がこのような上皮組織の細胞内に侵入することが知られているが,その動態はほとんど明らかとされていない.本年度は、細胞内に侵入するA群レンサ球菌の動態を、特にエンドソームでの菌の動態、およびROS産生による細胞死との影響について明らかとした.

②比較ゲノム解析に基づく病原性細菌の外来性遺伝子獲得機構と進化の解析

Comparative genomics for bacterial gene acquisition and evolution systems.

病原性細菌は生体の防御機構に対抗するため,ゲノムの再構成や,外来性遺伝子の取り込みなど様々な方法を用いて進化してきたと考えられる.しかし、口腔内という特殊な環境にどのように適応して自らの生息域（ニッチ）を獲得したかというゲノム情報を元にした解析についてはほとんど行われていない.そこで日本で分離されたS. mutansの全ゲノム解析を行い比較ゲノム解析によりこれらの菌の特徴を新たな観点で明らかにすると同時に、重要な歯周病原性細菌であるP. gingivalis TDC60株の全ゲノム解析を終了し、現在投稿準備中である.また、レンサ球菌の進化過程における病原性獲得機能を明らかとするため、A群レンサ球菌では,ファージが外来遺伝子の獲得および再編成に重要な役割を果たしている一方で,S. mutansでは、ファージに対しての抵抗性を有し、CRISPRと呼ばれる防御機構が重要であることなどを明らかとした（現在投稿中）.さらに現在これらの42株についての比較ゲノム解析を進めている.また、比較ゲノム情報を充実させるため、S. mutans JL23株、S. pyogenes JRS4株の全ゲノム解析を東京工業大学（黒川顕教授）との共同研究で進めている.

2)



3）研究内容についての英文要約

Streptococcus pyogenes（group A Streptococcus, GAS）, one of the most frequent pathogens of humans, attaches and invades into human pharyngeal or skin epithelial cells. We have previously reported that induction of apoptosis is associated with the GAS invasion, which induces mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death. We demonstrated here that GAS-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species（ROS）production. These observations indicated that GAS invasion triggers ROS production through Rac1 activation, and generated ROS resulted in mitochondrial dysfunction leading to cellular apoptosis. We also performed the comparative genomics of S. pyogenes. S. pyogenes possesses clustered regularly

interspaced short palindromic repeats（CRISPR）/Cas systems that can restrict horizontal gene transfer（HGT）including phage insertion. Therefore, it was of interest to examine the relationship between CRISPR and acquisition of prophages in S. pyogenes. Our results suggested that limitations in CRISPR content could explain the characteristic acquisition of prophages and might contribute to strain-specific pathogenesis in S. pyogenes.

4）本事業に関連して世界的な研究拠点形成に向けて、以下の点で改善・整備等されたこと

A（研究拠点体制）

東京医科歯科大学で大規模ゲノム配列解析施設を整えるため、高速シーケンサーIllumina GIIxの稼働を開始した.現在のところ、テストラン3回を行っているが、情報処理を行う計算サーバーを他大学から貸与している状況であるため、この点の改善が必要であろうと考えている.また、シングルランだけではなく、現在イルミナ社と共同で、多サンプル同時解析のためのMultiplex解析法の開発を行っているが、イルミナ社で販売しているキットにかなり問題があり、現在のところ、問題点を抽出してその改善に努めている.

B（研究教育環境）

研究教育環境については昨年よりM&Dタワー8Fに移動し、研究環境がようやく整ってきたところである.

C（人材確保）

人材確保については、高速シーケンサーの運用・稼働のため、東京工業大学より丸山史人助教を准教授として採用した.ウェット実験も可能なバイオインフォの専門家であるため、イルミナの稼働には最適の人材である.

D（人材育成）

人材育成については、高速シーケンサーの運用・稼働のため、現在分野に所属するポスドク・大学院生でも運用可能になるように教育を行っている.

E（国際化）

大学院生としてインドよりBijaya Haobamさんが入学した.また、東京医科歯科大学も参加しているJ-Grid（感染症研究国際ネットワーク推進プログラム）の一環として、タイ拠点より研究員を2名、12月末に本分野に滞在し、新型シーケンサーによる解析を行った.このうち1名は、来年度に本学大学院への入学を希望している.

5）GCOE事業を推進するに当たって力を入れた点

本分野は、大量のゲノム情報を扱うためのプラットフォームを確定することが、本事業での任務であると捉えているため、本年度はそのためのアプリケーションの開発・運営指導体制の確立を行ってきた.高速シーケンサーであるIllumina GIIxは、高速シーケンサーとしては、現段階では世界的な標準となっているが、その性能上、短いDNA配列（約50bp）を大量に取得するため、ゲノム配列を決定するというよりもSNP解析やde noveでの配列確定に使われているのが現状である.そのため、既知の遺伝子情報がある、という条件下での配列解析には有効であるが、未知の遺伝子についての大量の解析を行うのは現段階では難しい.そのため、少なくともpaired-endで150bp以上の配列決定を行うため、Illumina社と共同で、そのプロトコールを作製している.

6）英文原著論文

1. T. Izumo, F. Izumi, I. Nakagawa, Y. Kitagawa, H. Shibata, S. Hamada, Y. Kiso. Influence of Lactobacillus pentosus S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy or Salmonella Typhimurium-infected mice. Biosci. Microflora. In press
2. C. Aikawa, F. Matuyama, I. Nakagawa. The dawning era of comprehensive transcriptome analysis in cellular microbiology. Frontier in Microbiol. In press.
3. S. Endo, K. Yamato, S. Hirai, T. Morikawa, K. Fukuda, H. Suzuki, M. Abei, I. Nakagawa, I. Hyodo. Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. Cancer Sci. In press.
4. A. Sakurai, F. Maruyama, J. Funao, T. Nozawa, C. Aikawa, N. Okahashi, S. Shintani, S. Hamada, T. Ooshima, I. Nakagawa. 2010. The specific behavior of intracellular Streptococcus pyogenes undergone the autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. J. Biol. Chem. 285: 22666-22675.
5. C. Aikawa, T. Nozawa, F. Maruyama, K. Tsumoto, S. Hamada, and I. Nakagawa. Reactive oxygen species induced by fibronectin-mediated Streptococcus pyogenes invasion trigger apoptotic cell death in infected epithelial cells. Cell. Microbiol.（2010）12: 814-830.

7）平成22年度までの自己評価

平成22年5月より本GCOEに参加させていただき、それに伴い7月よりIllumina GIIxの運用を行うため、丸山史人准教授を採用し、稼働を開始した.しかし、高速シーケンサーを実稼働させるには、多量の核酸サンプルを高精度に扱うスタッフの育成と、多量の情報処理を行うバイオインフォマティクスのウェットとドライ双方のスタッフの育成が必要なため、現在は取得したデータの解析（P. gingivalis TDC60株ゲノム、P. ances C1株ゲノム、S. mutans LJ23株ゲノム、S. pyogenes JRS4株ゲノム）に手間取っており、現在までのところ1株の配列決定が終了したところであり論文発表に結びついていない.そのため、この点を次年度は大きく改善したいと考えている.

8）学会発表（英文）

T. Nozawa. C. Aikawa, T. Watanabe, F. Maruyama, I. Nakagawa（Tokyo Med. and Dent. Univ., Tokyo, Japan）
A small GTPase, Rab23, is required for the autophagic degradation of intracellular group A streptococcus. ASM General Meeting, San diego（23-27 May 2010）

9）学会発表（和文）

1. 森宏員,丸山史人,大野雅幸,渡辺孝康,相川知宏,野澤孝史,黒川顕,津本浩平,中川一路.A群レンサ球菌プロファージによるCRISPR制御機構の解析2010.3.7-10福岡（ポスター）
2. 丸山史人,大野雅幸,相川知広,桜井敦朗,野澤孝志,安孫子宜光,黒川顕,中川一路 劇症型A群レンサ球菌のヒト細胞内生存に関わる新規因子の解析,第4回日本ゲノム微生物学会,2010.3.7-10福岡（ポスター）
3. 丸山史人.　レンサ球菌属ゲノム情報に基づく種特異的進化機構の解析.第83回日本細菌学会総会.The Rising Generation’s Forum.2010.3.27-29.横浜.（口頭およびポスター）
4. 相川知宏, 野澤孝志, 丸山史人, 中川一路. NLRX1によるA群連鎖球菌感染上皮のオートファジー制御機構の解析（NLRX1 promotes the GAS induced-autophagy in epithelial cells）第83回日本細菌学会総会.横浜.（ポスター）
5. 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路.Rabタンパク質によるA群レンサ球菌感染誘導によるオートファジー制御機構. A small GTPase, Rab23, is required for autophagic degradation of intracellular bacteria. 第83回日本細菌学会総会.横浜.（ポスター）
6. 野澤孝志、相川知宏、渡辺孝康、Bijaya Haobam、丸山史人、中川一路　2010年8月26, 27, 28日A群レンサ球菌感染誘導オートファジーにおけるユビキチンシステムの機能解析.第4回細菌学・若手コロッセウム. 静岡県伊豆市　ラフォーレ修善寺（口頭）
7. 野澤孝志, 相川知宏 , 丸山史人,中川一路. 2010. Rabタンパク質によるA群レンサ球菌感染誘導オートファジーの制御機構. 第52回歯科基礎医学会学術大会、東京
8. Chihiro Aikawa, Takashi Nozawa, Fumito Maruyama, and Ichiro Nakagawa. 2010. NLRX1 promotes the GAS induced-autophagy in epithelial cells. 第52回歯科基礎医学会学術大会、東京
9. 古川那由太、野澤孝志、相川知宏、渡辺孝康、Bijaya Haobam1、遠藤亜希子、丸山史人、中川一路 2011 A群レンサ球菌の多重溶原性獲得機構の解析.第5回ゲノム微生物学会（仙台）（ポスター）
10. 渡辺孝康1、古川那由太1、野澤孝志、相川知宏、Bijaya Haobam、遠藤亜希子、丸山史人、中川一路 2011. 歯周病原性細菌Porphyromonas gingivalisのゲノム解析および多様性解析による種分化機構の解明.第5回ゲノム微生物学会（仙台）（ポスター）

10）外部資金の獲得状況

科学研究費補助金、 基盤B
研究題目:レンサ球菌属における種特異的ゲノム進化機構の解明
代表:中川一路
期間:平成21年―平成24年
研究費総額:1300万円

科学研究費補助金、 基盤C
研究題目:高解像度細菌叢解析による口腔微生物環境の恒常性維持メカニズムの解明
代表:丸山史人
期間:平成22年―平成24年
研究費総額:500万円

11）教室、分野や講座の准教授、講師、助教、特別研究員、ポスドク、指導を受けた大学院生の名前（AISSには○印）のリスト

准教授:丸山史人
日本学術振興会特別研究員:野澤孝志
大学院生:相川知宏（東京大学メディカルゲノム専攻よりの委託）
大学院生:渡辺孝康（博士課程2年）
大学院生:○Bijaya Haobam（博士課程1年）
大学院生:古川那由太（修士課程1年）

12）GCOE活動についての感想、コメント、改善を望む点など自由形式で記載

イルミナの運用にあたり、今後出てくるであろう大量の解析に対応する計算サーバーを導入していただくことは難しいでしょうか?現在私の分野で行っているような微生物ゲノム（大きさ3Mb程度）になら、現在導入されているサーバーを流用して解析することは可能ですが、ヒトゲノムなどを解析するとなってくると、他大学の計算機をお借りするしかありません.しかし、この点は非常に問題で、配列データは、本来は個人情報に属するものですので、データの移動は本来行ってはならない部類のものですので、なにとぞご勘案のほどよろしくお願いいたします.

Cellular Microbiology (2010) **12**(6), 814–830

doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01435.x
First published online 18 February 2010

Reactive oxygen species induced by *Streptococcus pyogenes* invasion trigger apoptotic cell death in infected epithelial cells

Chihiro Aikawa,[1,2,3] Takashi Nozawa,[1,2,3] Fumito Maruyama,[2,4] Kohei Tsumoto,[3] Shigeyuki Hamada[5] and Ichiro Nakagawa[1,2]*

[1]*Section of Bacterial Pathogenesis, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan.*

[2]*Division of Bacteriology, International Research Center for infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan.*

[3]*Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5, Kahiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan.*

[4]*Divison of Information Biotechnology, Department of Bioinformation Engineering, Tokyo Institute of Technology School and Graduate School of Bioscience and Biotechnology, 4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan.*

[5]*Research Collaboration Center on Emerging and Reemerging Infections (RCC-ERI) 6F, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Tiwanon Road, Muang Nonthaburi 11000, Thailand.*

Summary

Streptococcus pyogenes **(group A streptococcus, GAS), one of the most common pathogens of humans, attaches and invades into human pharyngeal or skin epithelial cells. We have previously reported that induction of apoptosis is associated with GAS invasion, which induces mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death. We demonstrate here that GAS-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species (ROS) production. Both the induction of apoptosis and ROS production markedly increased upon invasion of wild-type GAS strain JRS4 into HeLa cells; however, the apoptotic response was not observed in fibronectin-binding protein F1-disrupted mutant SAM1-infected cells. In Bcl-2-overexpressing HeLa cells (HBD98-2-4), the induction of apoptosis, ROS production and mitochondrial dysfunction were significantly suppressed, whereas the numbers of invaded GAS was not different between HeLa (mock cells) and the HeLa HBD98-2-4 cells. Whereas Rac1 activation occurred during GAS invasion, ROS production in GAS-infected cells was clearly inhibited by transfection with the Rac1 mutants (L37 or V12L37), but not by the dominant active mutant (V12L61) or by the dominant negative mutant (N17). These observations indicate that GAS invasion triggers ROS production through Rac1 activation and generated ROS induced mitochondrial dysfunction leading to cellular apoptosis.**

Received 18 July, 2009; revised 27 December, 2009; accepted 1 January, 2010. *For correspondence. E-mail ichiro-n.bac@tmd.ac.jp; Tel. (+81) 3 5408 5455; Fax (+81) 3 5408 5455.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

Introduction

Group A streptococcus *(Streptococcus pyogenes*; GAS) is the aetiological agent of a diverse collection of human diseases that range from self-limiting suppurative infections of the upper respiratory tract and skin to deeper and more serious invasive infections such as toxic shock-like syndrome, life-threatening necrotizing fasciitis and its infectious sequelae, i.e. glomerulonephritis and rheumatic fever (Cunningham, 2000).

GAS is able to invade several eukaryotic cell types (Cleary *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001), where it induces cytoskeletal rearrangements (Cywes and Wessels, 2001), activates the focal adhesion complex (Tomasini-johansson *et al.*, 2001), and induces apoptosis in infected cells (Tsai *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2001). Many of the proteins and components of GAS, which are involved in invasion, such as fibronectin (Fn)-binding proteins (FnBPs) and M protein. Protein F (renamed as protein F1) is a major Fn receptor of *S. pyogenes* that binds both soluble and insoluble Fn from several species, including human and bovine species, and mediates streptococcal adhesion to several epithelial cells of respiratory or epidermal origin (Cue and Cleary, 1998; Cue *et al.*, 2000). M proteins also participate

in adherence to host epithelial cells of respiratory and epidermal origin (Fischetti, 1989; Hasty *et al.*, 1992). The M6 protein is part of the M protein family, which is involved in protection of GAS from host defences, mainly via anti-phagocytic activity. GAS type M6 is all serum-opacity factor (SOF)-negative, and is preferentially isolated from the throat (Bessen *et al.*, 1996; Jadoun *et al.*, 1998).

We have previously demonstrated that the fibronectin-mediated internalization of GAS into epithelial cells is necessary and sufficient for the induction of apoptosis, which is initiated by mitochondrial dysfunction (Nakagawa *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2004). It was reported that induction of cell death by GAS requires invasion of GAS into epithelial cells (Tsai *et al.*, 1999), or formation of transmembrane pore induced by SLO (Cywes Bentley *et al.*, 2005), but the precise mechanism of GAS-induced cell death in host epithelial cells remains unclear.

Apoptosis is a regulated multi-step intracellular process that can be initiated by a variety of internal and external signals (Monack *et al.*, 1996; Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Apoptosis in response to bacterial infection is thought to play an important role in embryogenesis, development of the nervous and immune systems and tissue homeostasis. In addition, it represents a vital defence mechanism against damaged or infected cells. The signal transmitting cascade of apoptotic cell death is tightly regulated by intracellular organelles such as mitochondria or the endoplasmic reticulum (Tsujimoto and Shimizu, 2000; Shimizu *et al.*, 2000; Zamzami and Kroemer, 2001). Regulation of apoptosis mainly involves the Bcl-2 family members such as the prosurvival proteins (Bcl-2, Bcl-xL, MCl-1, A1), proapoptotic Bax-like proteins (Bax, Bak, Bok), and proapoptotic BH3-only proteins (Bad, Bik, Bid, Puma, Noxa) (Strasser, 2005). It has been known for some time that Bcl-2 overexpression can protect cells from apoptosis mediated by reactive oxygen species (ROS) (Hockenbery *et al.*, 1993).

Reactive oxygen species are intermediaries in signal transduction cascades regulating cell death (Thannickal and Fanburg, 2000). The mechanisms for ROS production and their molecular targets remain largely unknown. In nuetrophils, superoxide is produced in the phagosome by a membrane oxidase to kill the endocytosed pathogen (Bokoch, 1995). On the other hand, in non-phagocytic cells, ROS are produced by a distinct oxidase at the plasma membrane mediated by the epidermal growth factor (EGF) (Bae *et al.*, 1997). In this system, ROS inhibit tyrosine phosphatase activity and induce EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation (Lee, 1998).

The small GTPases Rac1 and Rac2 have emerged as common mediator of ROS production in diverse signalling pathways that lead to mitogenesis, gene expression and stress responses (Irani *et al.*, 1997; Suzukawa *et al.*, 2000). In neutrophils, the promotion of ROS production is triggered by binding of Rac2 to a NAD(P)H oxidase through the insertion domain and residue 26 in the effector domain (Freeman *et al.*, 1996). In non-phagocytic cells, Rac1 is necessary to induce ROS production (Irani *et al.*, 1997; Joneson and Bar-Sagi, 1998), and both platelet-derived growth factor (PDGF)-induced cyclin D expression and Rac1-mediated ROS production depend on residues 33 and 37 of the effector domain of Rac1 (Joyce *et al.*, 1999; Page *et al.*, 1999). Although Rac1 activation might contribute to ROS induction in non-phagocytic cells, the relationship between bacterial invasion and ROS induction still remains unclear.

We report here that the increase of ROS production following GAS strain JRS4 ($M6^+F1^+$) invasion induces mitochondrial dysfunction, which results in apoptotic cell death in infected HeLa cells. GAS-induced apoptosis and ROS production are clearly inhibited by the overexpression of Bcl-2. Fibronectin-binding protein F1 (prtF1)-deficient mutant (SAM1; $M6^+F1^-$) fails to induce apoptosis and ROS production. In addition, Rac1L37 mutant-transfected cells fail to induce apoptosis and ROS production. Our findings suggest that internalization of GAS triggers ROS production via Rac1 activation, and Rac1-mediated ROS production is a potent mediator of GAS-induced apoptotic cell death. Analysis of the apoptosis induction mechanism in GAS-infected cells will help us to understand the cellular responses to and molecular pathogenicity of GAS infection.

Results

Bcl-2 overexpression inhibits apoptotic cell death following GAS invasion

We initially analysed the number of invaded GAS in HeLa HBD 98V-1 cells (98V-1 cells; control vector stably transfected cells) and HeLa HBD98-2-4 cells (98-2-4 cells; Bcl-2-overexpressing cells). There was no significant difference in the invasiveness of GAS strain JRS4 between the two cell lines (Fig. 1A). Strain SAM1, a protein F1-deficient isogenic derivative of JRS4, is less than 1% of that of JRS4 in both cell lines (Hanski and Caparon, 1992). Therefore, overexpression of Bcl-2 did not affect GAS invasion. We next analysed the kinetics of apoptotic cell death using the two cell lines (Fig. 1B and C). Figure 1B shows the typical dot plot analysis of apoptotic cells in both cell types. After 3 h infection, an increase in annexin V and propidium iodine (PI) staining was observed in HeLa HBD98V-1 cells infected with GAS strain JRS4. Annexin V^+ PI^- cells (early apoptotic cells) showed staining in 15.5% of the sorted cells and were stained in 10.5% of sorted cells in annexin V^+ PI^+ cells (secondary apoptotic cells). The numbers of annexin V-positive cells increased with time and almost 80% of

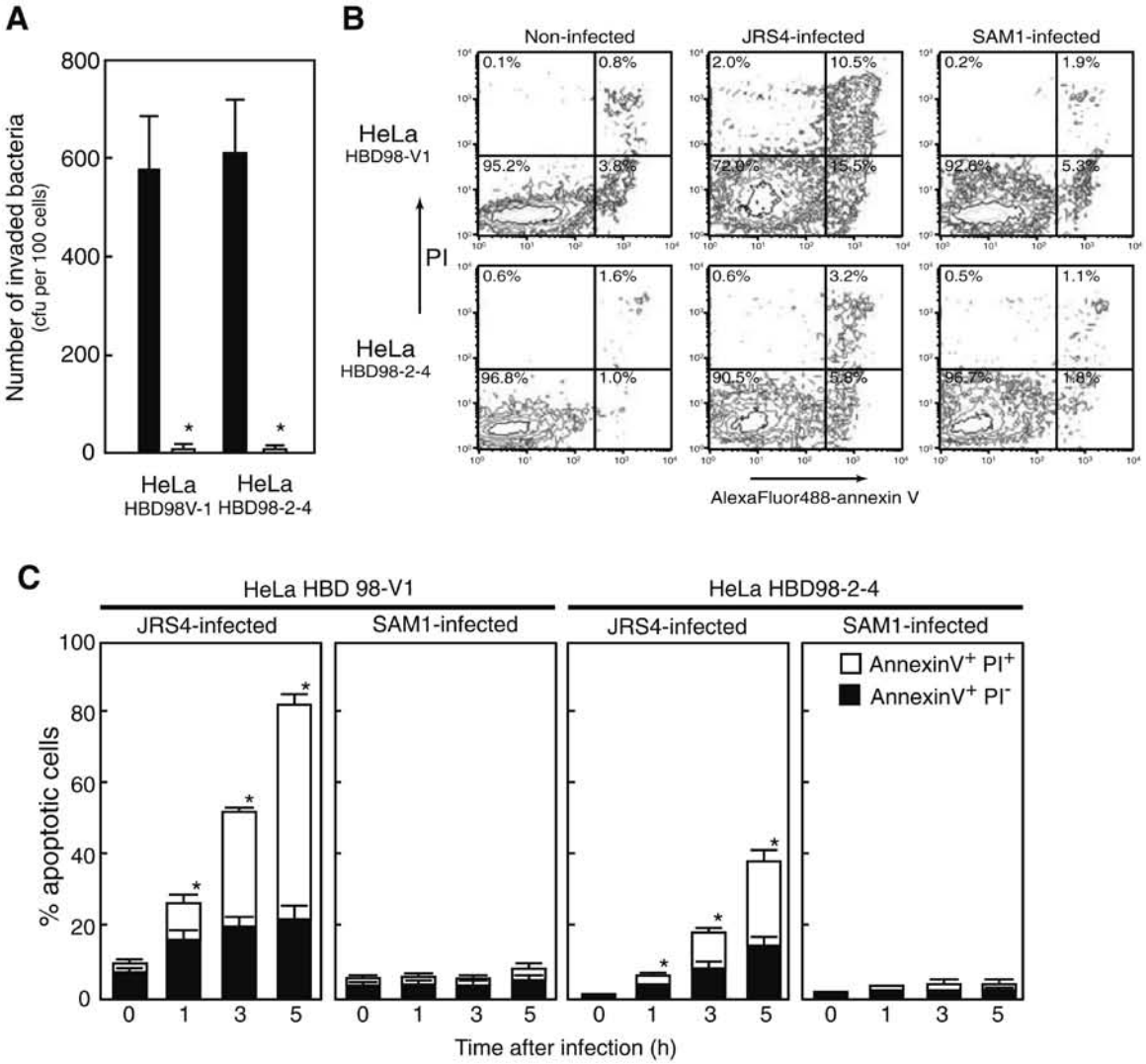


Fig. 1. Overexpression of Bcl-2 can protect GAS-infected HeLa cells from apoptosis.
A. Overexpression of Bcl-2 did not affect the invasion of GAS into HeLa cells. HeLa HBD98V-1 (mock) and HeLa HBD98-2-4 cells (Bcl-2-overexpressing cells) (4×10^4 per well) were infected with two isogenic strains of GAS, JRS4 ($M6^+$ $F1^+$, closed bar) and SAM1 ($M6^+$ $F1^-$, open bar) at a moi 50. After 1 h of infection, cells were washed with PBS and further incubated for 1 h with DMEM/10% FCS with antibiotics to kill the extracellular bacteria. Cells were disrupted with distilled water and serial dilutions of cellar extracts were plated on THY agar plates. $^*P < 0.01$.
B. Flow cytometric analysis of GAS-infected HeLa HBD98V-1 and HBD98-2-4 cells. Infected cells were stained with AlexaFluor488-conjugated annexin V and propidium iodine (PI; 1 μg ml^{-1}) at 1 h of infection. The percentages of the cells in each fraction are indicated. One of four experiments is represented.
C. Kinetic analysis of apoptosis in GAS-infected HBD98V-1 and HBD98-2-4 cells. The proportions of annexin V^+ PI^- and annexin V^+ PI^+ cells were measured by flow cytometry. Results represent mean ± SEM of four independent experiments. $^*P < 0.01$.

infected cells became annexin V-positive 5 h after infection (Fig. 1A). On the other hand, apoptotic cell death in HeLa HBD98-2-4 cells is less than 50% of that in HeLa HBD98V-1 cells. In SAM1-infected cells, no increase of apoptotic cell death was observed in either cell line (Fig. 1C). These observations indicate that the internalization of GAS induced the mitochondrial dysfunction and mitochondrial membrane stabilization following Bcl-2 expression can protect cells from apoptosis during infection.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Cellular Microbiology*, **12**, 814–830

Table 1. Effect of GAS invasion on mitochondrial membrane depolarization.

	J-aggregate-positive cells (%)			
	HeLa HBD98-V1		HeLa HBD98-2-4	
GAS strains or stimulant	1 h	3 h	1 h	3 h
Control	N.D.	86.2 ± 2.2	N.D.	87.2 ± 1.8
JRS4	52.5 ± 3.4	1.8 ± 0.4	81.8 ± 3.3	68.7 ± 6.2
SAM1	84.9 ± 3.2	78.7 ± 4.2	84.1 ± 2.6	85.6 ± 2.1
Staurosporine (5 μM)	N.D.	31.1 ± 3.3	N.D.	59.3 ± 3.3

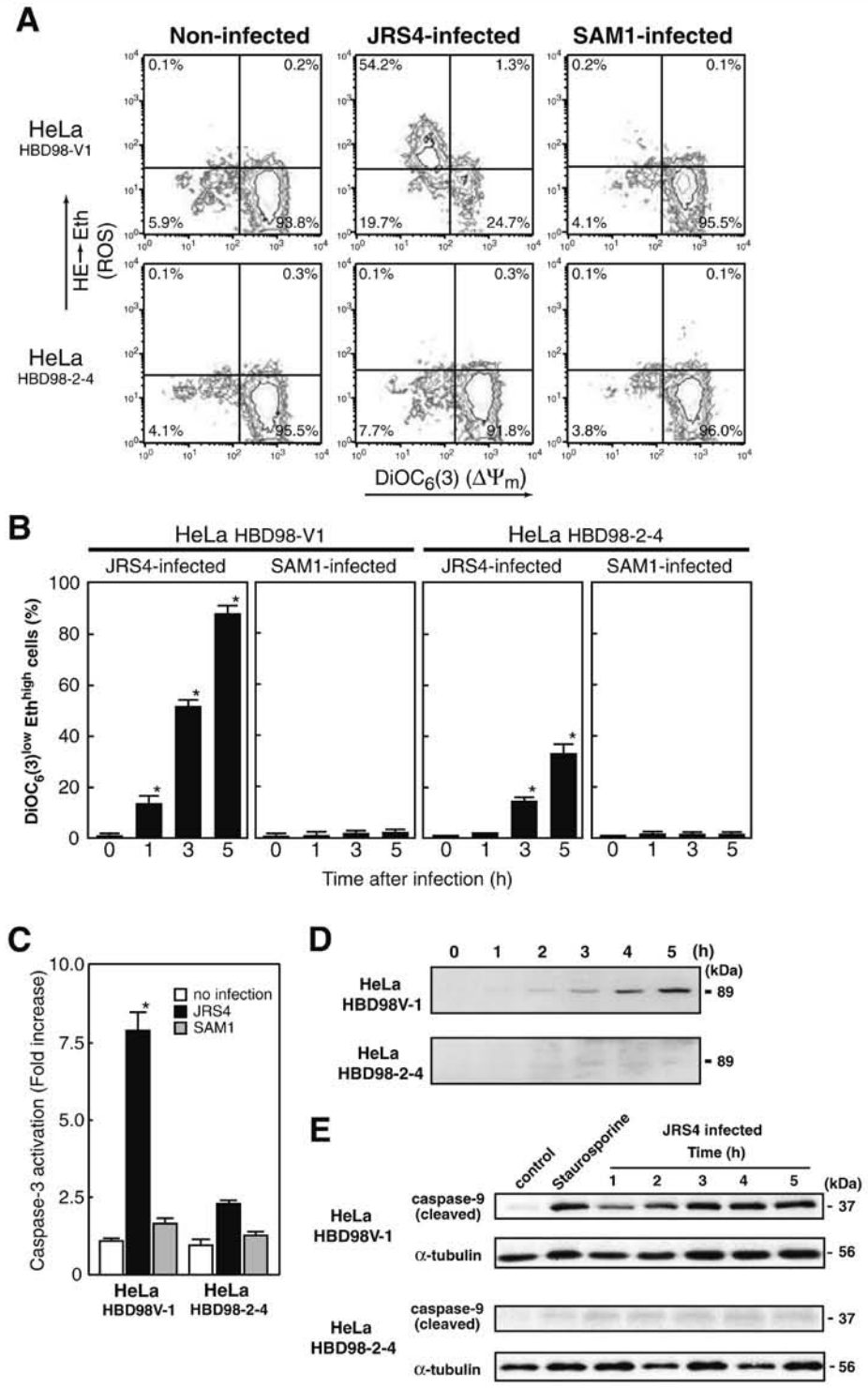
N.D., not determined.

Apoptotic cell death following GAS invasion mediates ROS production

During the apoptotic process, ROS have been suggested as major intermediaries in the signal transduction cascade. However, it remains unclear whether the ROS are related to GAS-infected epithelial cells, and how mitochondrial dysfunction is induced by the GAS infection. To address this question, we examined ROS production and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) reduction. For measuring simultaneously ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction, we used two specific dyes in flow cytometric analysis, one was dihydroethidium (HE), which is converted from dihydroethidium to monomeric fluorescent ethidium by ROS, and the other was 3,3′-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine [$DiOC_6(3)$] whose florescence is related to the mitochondrial membrane potential. Moreover, the fluorescence loss for $DiOC_6(3)$ staining implies mitochondrial dysfunction. The increase in HE-positive ROS production and reduced $\Delta\Psi_m$ cells were observed in JRS4-infected HeLa HBD98V-1 cells 3 h after infection (Fig. 2A). The number of damaged cells reached 90% of the infected cells 5 h after infection (Fig. 2B). Interestingly, in the Bcl-2-overexpressing HeLa HBD98-2-4 cells, the number of damaged cells was suppressed to 7% of the infected cells 3 h after infection and 34% 5 h after infection. In addition, for non-invasive SAM1-infected cells, such changes were not observed even in HeLa HBD98-V1 cells. Interestingly, mitochondrial membrane potential loss was strongly induced by carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (mCICCP) or staurosporine (ST) treatment (Zamzami *et al.*, 1995), whereas no significant production of ROS was observed by these treatments in HeLa HBD98-V1 cells, and mitochondrial membrane potential loss was completely inhibited in HeLa HBD98-2-4 cells (Fig. S1). We also used another mitochondrial specific dye to determine the level of mitochondrial membrane potential loss using the lipophilic fluorochrome 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Zuliani *et al.*, 2003). JC-1 is selectively incorporated into mitochondria in a monomeric form with strong fluoresnce emission at 527 nm. Dependent upon a high mitochondrial membrane potential, JC-1 forms aggregates (J-aggregates) with strong fluoresnce emission at 590 nm. Thus, breakdown of the mitochondrial membrane potential is indicated by a fluorescence shift from orange (590 nm) to green (527 nm). As shown in Table 1, J-aggregate-positive cells were found in 86.2 ± 2.2% of control cells and in 31.1 ± 3.3% of staurosporine-treated cells. In JRS4-infected HeLa HBD98V-1 cells, the number of J-aggregates-positive cells decreased from 52.5 ± 3.4% after 1 h infection to 1.8 ± 0.4% in 3 h after infection. In HeLa HBD98-2-4 cells, the decrease in J-aggregate-positive cells was suppressed to 68.7 ± 6.2% in JRS4-infected cells. These results indicated that GAS invasion induced mitochondrial potential loss more severely than staurosporine treatment. It should be noted that J-aggregate-positive cells were slightly decreased to 78.7 ± 4.2% in SAM1-infected cells after 3 h infection.

We further examined caspase-3 activation and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage during infection. In JRS4-infected HeLa HBD98-V1 cells, caspase-3 activation and PARP cleavage were clearly observed (Fig. 2C and D). However, in Bcl-2-overexpressing HeLa HBD98-2-4 cells, caspase-3 activation was suppressed to 30% of the level of that in HeLa HBD98-V1 cells (Fig. 2C) and PARP cleavage was not observed in HBD98-2-4 cells (Fig. 2D). Caspase-3 activation and PARP cleavage were not observed in non-invasive SAM1-infected cells. We also examined caspase-9 activation because activation of the caspase-9-dependent cascade is controlled by cytosolic cytochrome *c* from damaged mitochondria. In JRS4-infected HeLa HBD98-V1 cells, cleaved caspase-9 (activated caspase-9) was clearly observed in a time-dependent manner; however, such a change was not observed with HeLa HBD98-2-4 cells (Fig. 2E). These observations indicate that GAS invasion induces ROS production as well as mitochondrial dysfunction resulting in apoptotic cell death, and mitochondrial membrane stabilization by Bcl-2 overexpression suppresses apoptosis.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,



© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

Fig. 2. Overexpression of Bcl-2 suppressed ROS production and apoptosis in GAS-infected cells.
A. Flow cytometric analyses of ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction in GAS-infected epithelial cells. HeLa HBD98V-1 or HBD98-2-4 cells (5×10^5 cells) were infected with GAS strains JRS4 or SAM1 at moi 50 for 3 h. Cells were incubated with 3,3′-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine [$DiOC_6(3)$; 40 nM] and dihydroethidium (HE; 2 μM) for 10 min at 37°C immediately before cytometric analysis. HE was degraded to ethidium (Eth) by ROS. The percentage of $DiOC_6(3)^{low}$ Eth^{high} cells was analysed by using a flow cytometer. One of three experiments with similar results is represented.
B. Kinetics analysis of $DiOC_6(3)^{low}$ Eth^{high} cells in GAS-infected HBD98V-1 and HBD98-2-4 cells. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
C. Caspase activation was suppressed in Bcl-2-overexpressing cells. Caspase-3/-7 activation was analysed by the proteolysis of fluorogenic substrate Ac-DEQD-MCA. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
D. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) was suppressed in Bcl-2-overexpressing cells (HeLa HBD98-2-4 cells). The cleaved PARP fragment was detected by Western blotting. One of three experiments is represented.
E. Cleavage of caspase-9 was suppressed in Bcl-2-overexpressing cells. Cleaved caspase-9 was detected by Western blotting. For positive controls, cells were treated with staurosporine (5 μM) for 1 h. One of three experiments with similar results is represented.

GAS-induced ROS production and mitochondrial dysfunction depend on GAS invasion

We next examined the relationship between the number of invaded GAS- and ROS-induced apoptosis. As shown in Fig. 3A, HE-positive cells increased in a dose-dependent manner. Forty per cent of JRS4-infected cells were reduced in $\Delta\Psi_m$ 1 h after infection at a moi of 100, 15.5% at moi 50, and 9% at moi 10 in HeLa HBD-98V1 cells. However, reduced $\Delta\Psi_m$ cells amounted to only 10.5% in HeLa HBD 98-2-4 cells at moi 100. We further analysed the kinetics of the reduced $\Delta\Psi_m$ cells with time. The number of reduced $\Delta\Psi_m$ cells increased in a time-dependent manner; however, the increase in the rate of deletion of reduced $\Delta\Psi_m$ cells coincided with the moi (Fig. 3B).

To examine whether GAS invasion is accompanied by induction of ROS, we treated the cells with cytochalasin D to disrupt actin filaments, and ROS production and mitochondrial dysfunction were measured by flow cytometry (Fig. 3C). The increase of HE-high and reduced $\Delta\Psi_m$ cells was inhibited by the addition of cytochalasin D in a dose-dependent manner. These observations indicated that the induction of ROS and mitochondrial dysfunction were induced by GAS invasion, and the number of invaded GAS was highly associated with cellular damage.

Rac1 is activated during GAS invasion

The small GTPase Rac1 has emerged as a common mediator of ROS production in diverse signalling pathways and is induced by several bacterial pathogens during their invasion process. We have investigated into the molecular mechanism during GAS invasion and apoptosis. We examined the activation of Rac1 during GAS invasion. Phosphorylation of Rac1/cdc42 was induced in JRS4-infected HeLa cells and the amounts of phosphorylated Rac1/cdc42 increased in a time-dependent manner (Fig. 4A). However, phosphorylated Rac1/cdc42 was not found in SAM1-infected cells. Next, we examined whether endogenous Rac was activated during infection. Activated Rac1 was isolated from the cell lysates using the recombinant Rac-binding domain of PAK bound to agarose beads and was detected with anti-Rac antibodies by Western blot analysis of the precipitates. As a control, GTP was directly added to the lysates. After GAS infection, Rac-GTP levels increased transiently peaking between 60 and 90 min (Fig. 4B). Densitmetric analysis revealed a 4.2-fold increase in the levels of Rac activity (data not shown), which returned to basal levels after 120 min.

Rac1 is required for actin rearrangement during GAS invasion

To gain a insight into the mechanism used by Rac1 to trigger an increase in ROS production, we constructed several point mutants of Rac1, which selectively disrupt the effector domain, and the resulting transfected cells were infected with GAS JRS4. We determined the effects of these mutations on GAS entry into HeLa cells by using confocal microscopy. The actin rearrangements (green images) sites and GAS (red images) were colocalized at the GAS entry site (yellow) in Rac1 wild type (wt), and Rac1 constitutively dominant active mutant (V12) transfected cells (Fig. 5A). We also determined the transfection efficiency by staining with anti-HA antibody. The transfection efficiencies of these vectors into HeLa cells were 20–25% (data not shown). Specifically, the actin filaments were recruited to the sites of GAS entry (Fig. 5B) indicating that actin rearrangement is crucial for the GAS entry into HeLa cells. We also determined the effects of GAS viability on cytoskeletal rearrangements using phalloidin staining (Fig. S2). Live JRS4 cells were colocalized with actin filaments (yellow arrowheads), while heat-killed JRS4 cells attached to HeLa cells without significant actin accumulation. In live-SAM1-infected cells, actin accumulation was also observed; however, the level of the actin accumulation was significantly reduced as compared with that of JRS4 (Fig. S2B). Quantitative analysis showed almost 40% of the attached live JRS4 were phalloidin-positive, whereas only 5–8% of live-SAM1 were phalloidin-positive (Fig. S2C). In addition, only live-JRS4-infected cells resulted in apoptotic death (Fig. S2D).

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

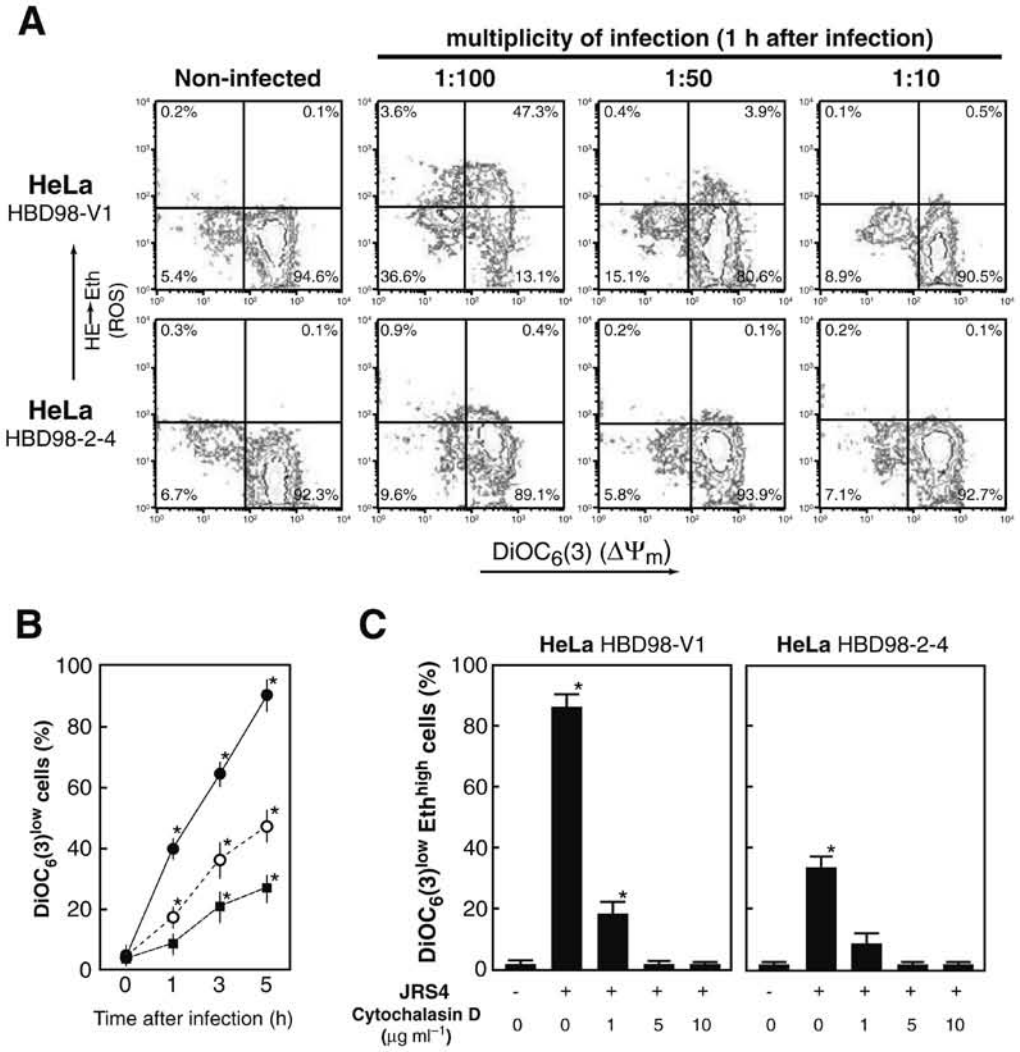


Fig. 3. Mitochondrial membrane potential loss ($\Delta\Psi_m$) and ROS production in GAS-infected cells were relative to the amount of invaded GAS.
A. Increased ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction were relative to the amount of invaded GAS. HeLa HBD98-V1 and HBD98-2-4 (5×10^5 cells) were infected with JRS4 or SAM1 at various moi for 1 h. For labelling, cells were stained with $DiOC_6(3)$ (40 nM) and HE (2 μM) for 10 min at 37°C immediately before cytometric analysis.
B. Kinetics of $\Delta\Psi_m$ reduction in JRS4-infeceted cells. Weakly $DiOC_6(3)$-stained cells were analysed with flow cytometry. HeLa HBD98-V1 cells were infected with various moi (closed circle, 100; open circle, 50; closed box, 10). Data represent means ± SEM of three individual experiments.
C. Effect of cytochalasin D on the $\Delta\Psi_m$ and ROS production. Various amounts of cytochalasin D were added to the cell culture 30 min before infection. $DiOC_6(3)^{low}$ Eth^{high} cells were analysed 5 h after infection with a flow cytometer. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.

These results suggested that GAS invasion, but not adhesion, induces Rac1 activation and apoptotic cell death.

The Rac1 L37 mutant prevents ROS production and apoptosis following GAS invasion

We next determined the effects of Rac1 mutations on GAS invasion. The number of invaded GAS was not affected by transfection with the Rac1 wt or the Rac1 L37 mutant and was slightly increased by transfection with the Rac1 dominant active mutants (V12 or L61). On the other hand, the number of invaded GAS was reduced by more than 30% in Rac1 dominant negative mutant (N17) transfected cells (Fig. 5C). These results indicated that the GAS invasion requires Rac1 activation. We further examined ROS production and mitochondrial dysfunction was

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

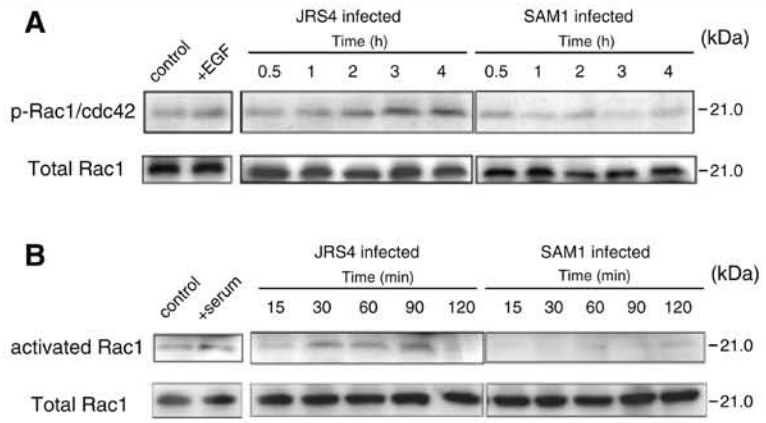


Fig. 4. GAS invasion induced Rac1 activation through fibronectin-mediated binding.
A. Activation of Rac1 was induced by GAS invasion but not by GAS adhesion. HeLa HBD98V-1 cells (2×10^6) were infected with two isogenic GAS strains JRS4 and SAM1 at a moi 100 for the indicated times. After cell lysis with Triton X-100 buffer, samples were analysed by Western blots. Activated Rac1 was precipitated with GST-fused PAK1-PBD and total Rac1 was detected by Western blotting with Rac1-specific antibody.
B. GAS invasion induced phosphorylation of Rac1/cdc42. HeLa HBD98V-1 cells (3×10^5) were infected with GAS strains JRS4 or SAM1. After the indicated time periods, cells were lysed with Triton X-100 buffer and cytosolic proteins (40 μg per lane) were separated on SDS-PAGE. Phospho-Rac1/cdc42 and total Rac1 were detected with Western blotting.

measured by flow cytometry in Rac1 mutant-transfected cells. As shown in Fig. 5D, the number of reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells increased in Rac1 wt, V12, L61 and V12L61 mutant-transfected cells as well as control cells following GAS invasion and reached 80–90% cells. In Rac1 N17-transfected cells, the number of reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells was reduced by more than 30%. Interestingly, the numbers of reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells were reduced by the transfection of Rac1 L37 or by Rac1 L37V12 mutant, whereas the number of invaded GAS was not affected or increased by the transfection of these mutants (Fig. 5C). Therefore, these results suggest that ROS induction during GAS invasion was induced by Rac1 activation, especially Rac1 L37 domain is important for the induction of ROS by GAS invasion.

ROS scavengers protect infected cells from apoptosis

It is unclear if ROS production via Rac1 activation directly induces apoptosis as a result of mitochondrial dysfunction or is the overall result of the apoptotic responses. Therefore, we determined whether the ROS scavengers, *N*-acetyl cysteine (NAC) and pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), can inhibit GAS-induced apoptosis. Monomeric fluorescent ethidium (Eth) staining was clearly observed in JRS4-infected cells, whereas Eth fluorescent was reduced by addition of ROS scavengers (Fig. 6A). Next, we examined the effects of these inhibitors on mitochondrial dysfunction. In the JRS4-infected cells, the number of reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells reached 86% after 5 h infection (Fig. 6B). The number of ROS-producing cells (reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells) was lowered to 8.6% by 1 mM NAC, and to 6.8% by 400 μM PDTC. In contrast, an increase in reduced $\Delta\Psi_m$-HE-positive cells was not observed in SAM1-infected cells. We further determined the effects of ROS inhibitors on apoptosis in GAS-infected cells (Fig. 6C). Pre-treatment with NAC or PDTC significantly inhibited GAS-induced apoptosis. Specifically histone release from JRS4-infected cells was reduced to 5.6% by pre-treatment with 400 μM PDTC. These data indicate that Rac1 activation following GAS invasion induced the ROS production, resulting in apoptotic cell death.

ROS-mediated p38 MAPK activation induces apoptosis

c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 mitogen activate protein kinase (MAPK) are important regulators of apoptotic cell death, and both MAPKs are activated by ROS. Therefore, we determined whether GAS-mediated ROS production led to the activation of p38MAPK or JNK. Activation of p38MAPK, but not JNK, was observed in JRS4-infected cells, whereas neither p38MAPK nor JNK activation was observed in non-invasive SAM1-infected cells (Fig. 7A). We then assessed the effects of ROS scavengers on the activation of p38MAPK. In the JRS4-infected cells, p38MAPK activation was inhibited by addition of PDTC but not by addition of NAC (Fig. 7B). We further determined the effects of a p38MAPK inhibitor on apoptosis in GAS-infected cells (Fig. 7C and D). Pre-treatment with SB203580 inhibited p38MAPK activation in a dose-dependent manner and apoptosis in a time-

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

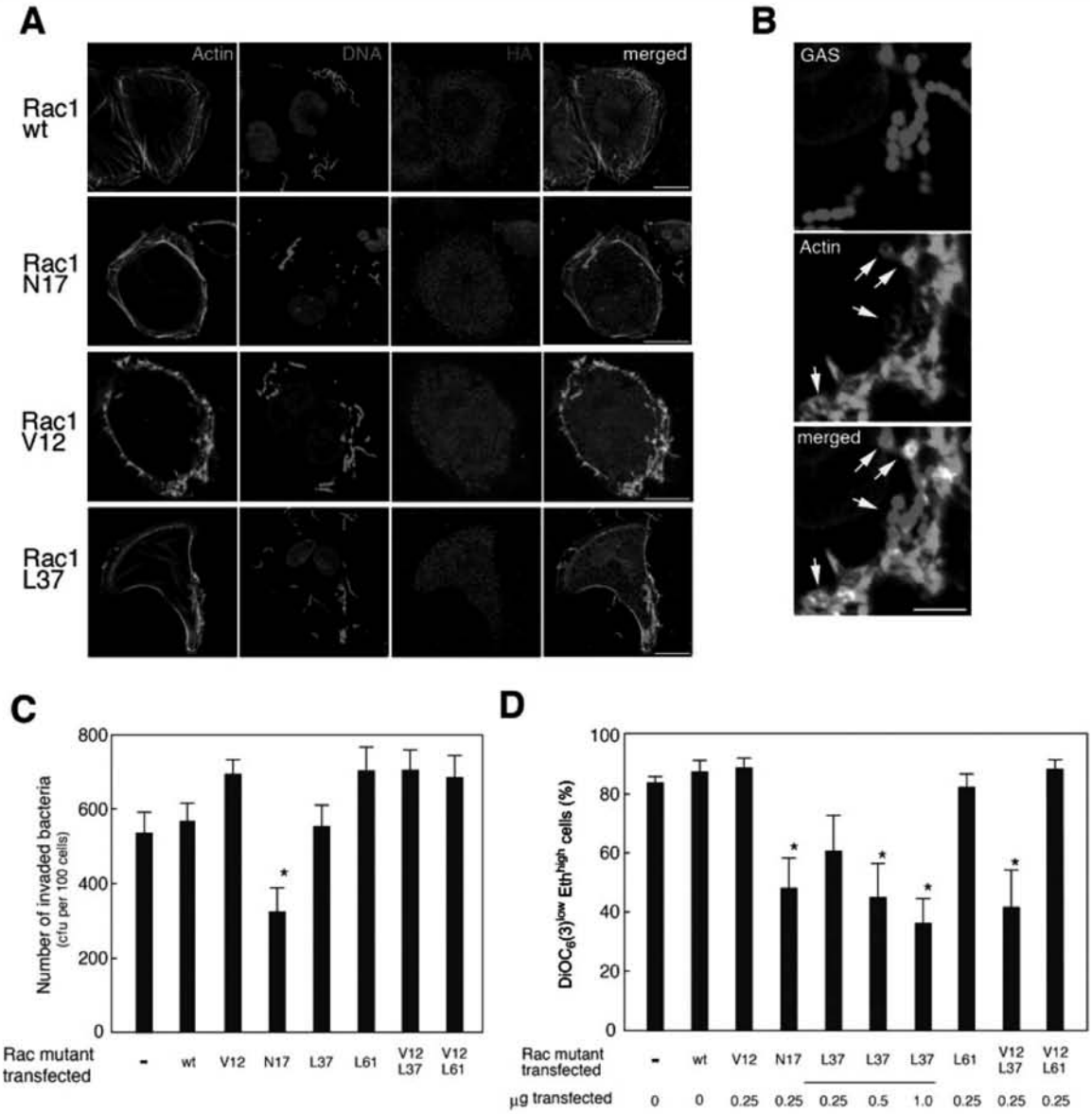


Fig. 5. The Rac1 L37 mutation protects infected cells from GAS-induced ROS production.
A. Effects of Rac1 point mutations on actin cytoskeleton organization. Rac1 mutant-transfected cells were infected with GAS for 1 h. After fixing with 4% PFA/PBS, cells were immunostained with anti-HA antibodies (blue). Then actin was stained with AlexaFluor488-conjugated phalloidin (green), and cellular and bacterial DNA were stained with propidium iodine (red). Stained cells were analysed with confocal microscopy. Bars, 10 μm.
B. Confocal microscopic image of actin organization at the GAS invasion site. Bars, 2 μm.
C. Effect of Rac1 point mutations on the invasion of GAS. HeLa HBD98V-1 cells were transfected with Rac1 mutant plasmids and GAS invasion was analysed with colony formation assays. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
D. Increased ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction were inhibited in a residue 37 disrupted mutant (L37) of Rac1. HeLa HBD98V-1 cells were transfected with Rac1 mutant plasmids and ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction were analysed by flow cytometry. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Cellular Microbiology*, **12**, 814–830

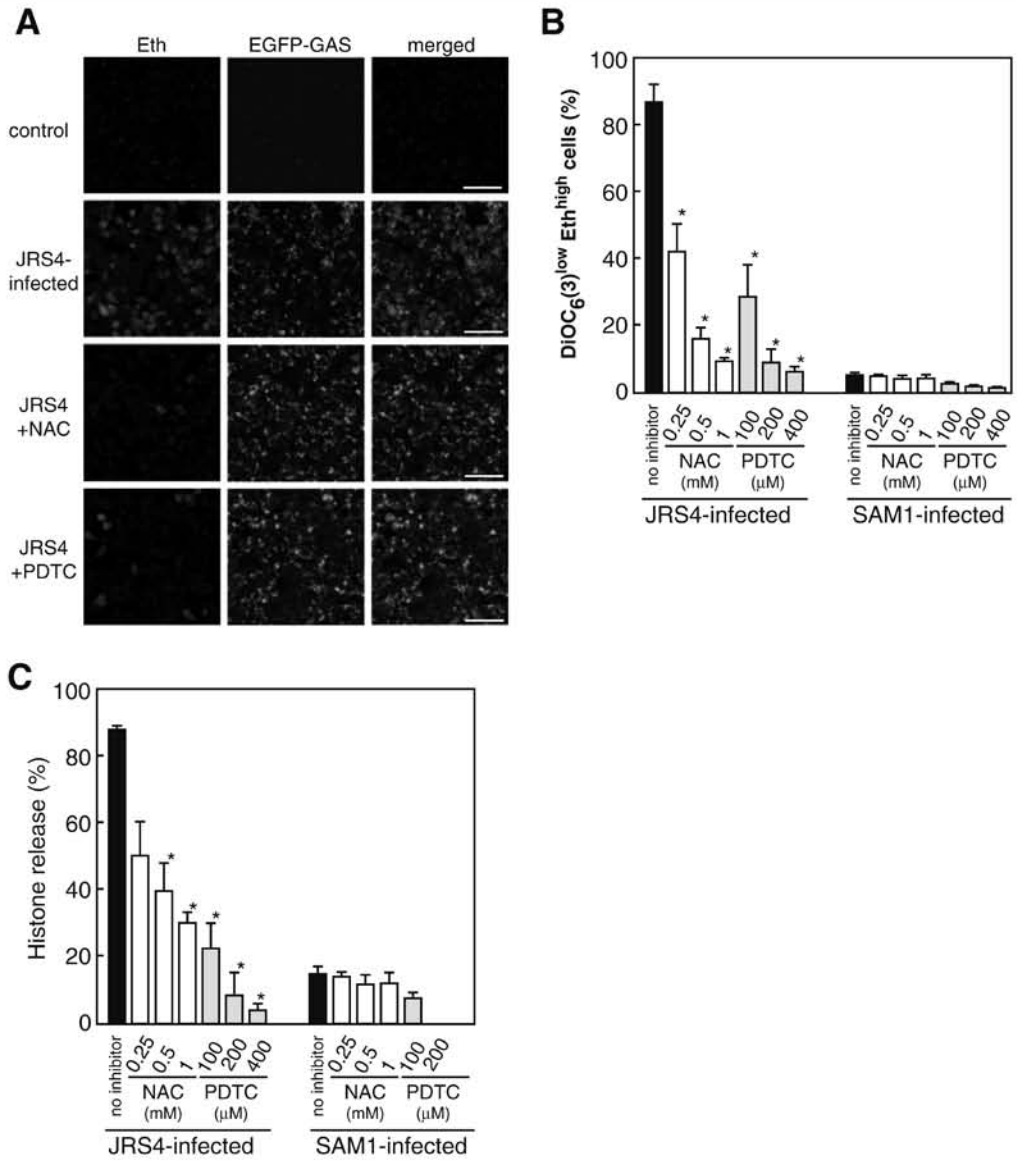


Fig. 6. ROS scavengers inhibited GAS-induced apoptotic cell death.
A. Scavengers of ROS inhibited the GAS-induced production of ROS. HeLa HBDV-1 cells were infected with EGFP-expressing GAS JRS4 at a moi 100 for 1 h. ROS scavengers [*N*-acetyl cysteine (NAC), 1 mM; pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC), 400 μM] were added 1 h before infection. After 2 h of infection, cells were stained with dihydroethidium for 10 min and fixed with 4% PFA/PBS. Images were analysed with confocal microscopy. Bars, 50 μm.
B. ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction were inhibited by addition of ROS scavengers. HeLa HBD98V-1 cells were treated with NAC or PDTC 1 h before infection. After 5 h of infection, cells were stained with $DiOC_6(3)$ and HE-Eth as described previously and cells were analysed with a flow cytometer. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
C. Apoptosis induced by GAS invasion was inhibited by ROS scavengers. Various concentrations of ROS scavengers were added 1 h prior to infection. HeLa cells were infected with GAS JRS4 for 5 h and histone release of infected cells was analysed with ELISA. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Cellular Microbiology*, **12**, 814–830

Fig. 7. Production of ROS activates p38MAPK and resulted in apoptosis.
A. Activation of p38MAPK was induced by GAS invasion but not by adhesion. HeLa HBD98V-1 cells (3×10^5 cells) were infected with two isogenic GAS strains, JRS4 and SAM1 at a moi 100. After the indicated time periods, the cells were washed with ice-cold PBS and lysed with Triton X-100 buffer. Cytosolic proteins (30 μg per lane) were separated on SDS-PAGE and Western blot analyses were performed with anti-p42/44, anti-phospho p42/44 (p-p42/44), anti-p38, anti-phospho p38MAPK (p-p38), anti-JNK and anti-phospho JNK (p-JNK) antibodies. One of three experiments is represented.
B. Activation of p38MAPK was inhibited by ROS scavengers. HeLa cells (3×10^5) were infected with GAS for 1 h. Cells were lysed with Triton X-100 buffer after 30 min of infection and cytosolic proteins (30 μg per lane) were analysed by Western blotting.
C and D. p38MAPK-specific inhibitor SB203580 can inhibit ROS-induced apoptosis. p38MAPK-specific inhibitor SB203580 (dissolved in DMSO) and DMSO were added 1 h prior to infection. GAS JRS4 was infected for 30 min and cytosolic proteins were analysed by Western blotting. After 5 h infection with GAS JRS4, histone release of infected cells was analysed with ELISA. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
E. SP600125 (dissolved in DMSO) and DMSO were added 1 h prior to infection. GAS JRS4 infected the cells for 5 h. Histone release of infected cells was analysed with ELISA. Data represent means ± SEM of three individual experiments.

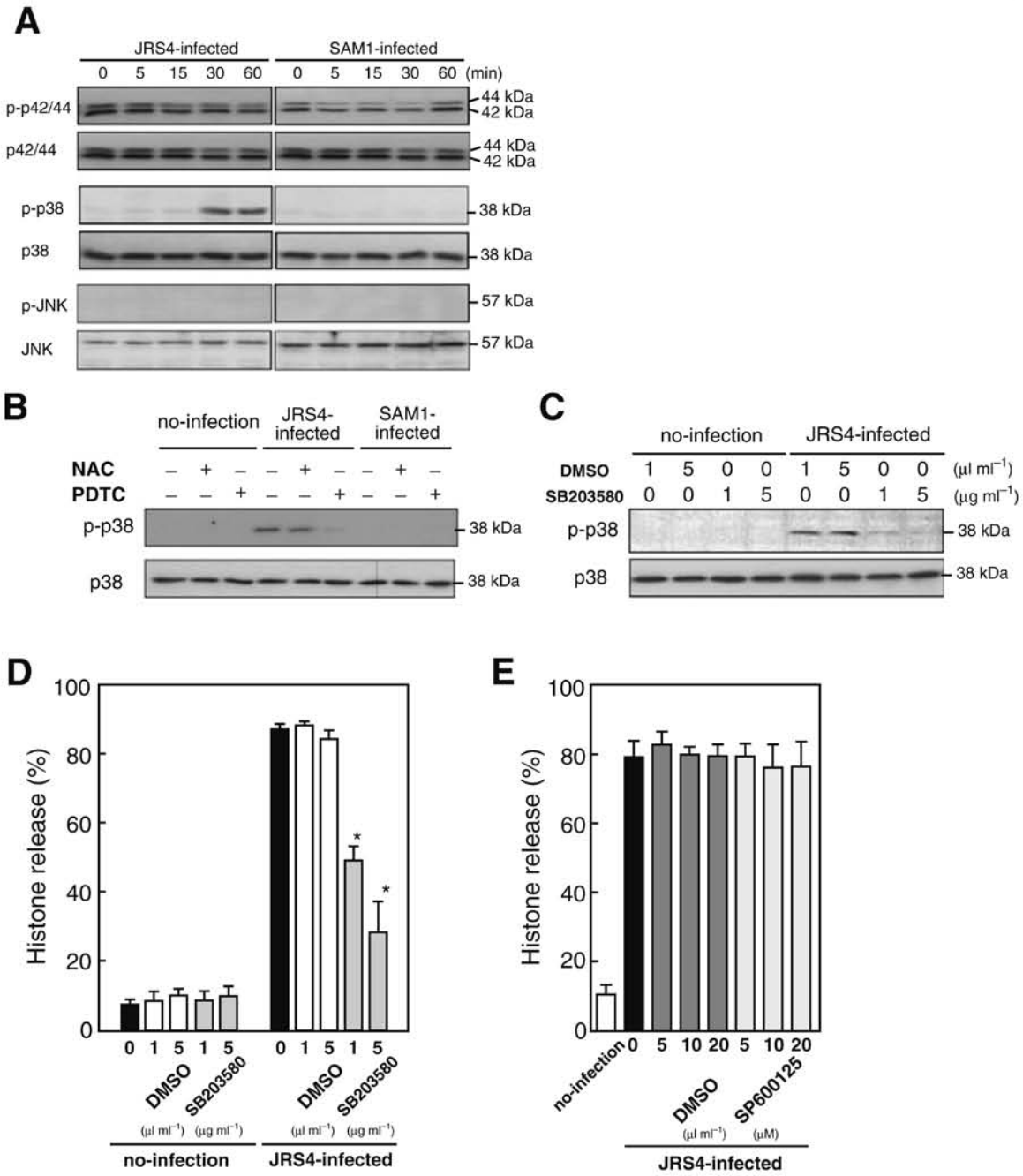
dependent manner in JRS4-infected cells. In addition, pre-treatment with SP600125 (a JNK-specific inhibitor) did not inhibit the apoptosis in JRS4-infected cells (Fig. 7E). These results indicate that GAS-induced ROS production induced p38MAPK, which subsequently results in apoptotic cell death.

Discussion

We have demonstrated that internalization but not adhesion of GAS to epithelial cells induced apoptotic cell death, and the apoptosis is inhibited by Bcl-2, one of the anti-apoptotic proteins. In this regard, *Staphylococcus aureus* was reported to activate FAS or TNF-α signalling pathways following invasion into epithelial cells and induced cell death through the activation of caspase (Baran *et al.*, 2001; Haslinger *et al.*, 2003). Cytolysin-mediated translocation (CMT) is a recently described process involved in infection by GAS (Madden *et al.*, 2001). GAS translocates an effector with the characteristics of a signal transduction protein, the *S. pyogenes* NAD-glycohydrolase (SPN), into the cytoplasm of a host cells through streptolysin O pores in the host cell membrane (Madden *et al.*, 2001; Meehl and Caparon, 2004). Although the relation between CMT and cell death is unknown, GAS infection-induced cell death appears to be induced by the internalizaion of GAS into epithelial cells.

Evidence indicates that mitochondria play an important role in the intrinsic pathway of apoptosis. A number of changes occur in mitochondria following apoptotic signalling such as the loss of mitochondrial transmembrane potential, generation of ROS, opening of the permeability transition (PT) pore and release of apoptotic factors such as cytochrome *c* into the cytosol (Tsujimoto and Shimizu, 2000; Zamzami and Kroemer, 2001; Rajalingam *et al.*, 2007). We previously reported that the invasion of GAS into epithelial cells is necessary and sufficient for the induction of apoptosis, which is in turn initiated by mitochondrial dysfunction (Nakagawa *et al.*, 2001; 2004). Therefore, in this study we carefully examined mitochondrial alterations in epithelial cells in response to GAS infection. Our approach is based on the assumption that mitochondria are one of the possible targets of the major intracellular source of free radicals (Teshima *et al.*, 1998). We found here that internalization of GAS into epithelial cells triggered a reduction in the mitochondrial transmembrane potential and the generation of ROS as well as subsequently inducing apoptotic cell death in host cells. The mitochondrial membrane potential loss was clearly induced by the mCICCP or staurosporine treatment, whereas these treatments were not affected to the ROS production. Thus, we concluded GAS-induced apoptotic cell death was affected by both mitochondrial dysfunction and ROS production by Rac1 activation via different cascade. Calvino-Fernandez *et al.* reported that loss of mitochondrial transmembrane potential and increased levels of ROS are induced in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells and that these mitochondrial alterations may lead to apoptosis associated with infection (Calvino-Fernandez *et al.*, 2008). Furthermore, GAS-induced ROS production and mitochondrial dysfunction were suppressed by anti-apoptotic Bcl-2 overexpression. Moreover, caspase-3/9 activation and PARP cleavage during infection were also suppressed by Bcl-2 overexpression. These data indicate that ROS production and mitochondrial dysfunction induced by GAS invasion may enhance apoptotic cell death in epithelial cells.

Rac1, a member of Rho family of GTPases, has been shown to play a fundamental role in a wide variety of cellular processes, including actin cytoskeletal reorganization, cell transformation, the induction of DNA synthesis, superoxide production, axonal guidance and cell migration (Bosco *et al.*, 2009). The family of p21-activating kinases (PAK) is activated by Rac1 effector proteins. PAK binds Rac1 in a GTP-dependent manner, potently stimulating PAK kinase activity, which leads to dynamic cytoskeletal alterations, adhesion and the stimulation of transcription (Brown *et al.*, 1996; Frost *et al.*, 1996). Nerlich *et al.* reported that Src kinases and Rac1 but not phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) are essential to mediate *S. pyogenes* internalization (Nerlich *et al.*, 2009); however, the relationship between Rac1 activation



and ROS production has been unknown. We showed that Rac1 enabled GAS to invade into epithelial cells efficiently and increased ROS production. In addition, Rac1 is essential for activation of NADPH oxidase, a defence against invading microbes in phagocytic cells (Bokoch, 1995). However, it is not known if Rac1 plays an important role in ROS production and GAS-induced cell death in epithelial cell. We revealed that activated Rac1 increased with time and Rac1 binding to PAK increased transiently peaking between 60 and 90 min in GAS-infected cells. In this regard, Cywes *et al.* (2001) reported that interaction of the GAS hyaluronic acid capsule with CD44 resulted in

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

Rac1-dependent disruption of intercellular junctions and membrane ruffling and promoted tissue penetration by GAS through a paracellular route. In this regard, we demonstrated that Rac1 was also activated by the interaction of FnBPs with Fn, which contributed to GAS invasion into epithelial cells.

Although the actin filaments were recruited in Rac1 wt- or V12 (dominant active) mutant-transfected cells, the number of invaded GAS was significantly reduced in Rac1 N17 (dominant negative) mutant-transfected cells. The actin rearrangements induced by Rac1 activation could be crucial for GAS invasion into epithelial cells. Joneson and Bar-Sagi (1998) previously reported that the Rac1 L37 mutant, an effector-binding loop mutant of Rac1, effectively induced superoxide production by activating the NADPH oxidase but was defective in inducing actin recruitment. Rac1 activation induced by *Vibrio vulnificus* infection triggered ROS production and subsequently induced cell death in phagocytes (Kim *et al.*, 2008). In our study, the number of invaded GAS was not altered; however, ROS production was significantly reduced by transfection with the Rac1 L37 mutant. Taken together, the increase in ROS production by NADPH oxidase activation was induced by Rac1 activation following bacterial invasion into epithelial cells. In addition, cytoskeletal rearrangements following GAS invasion and apoptotic cell death were only induced with live bacterial infection and invasion. These results suggest that Rac1 activation is required for live bacterial infection, and this Rac1 activation induces ROS production, resulting in apoptotic cell death.

Although structurally different, both PDTC and NAC are radical scavengers and act as anti-oxidative agents in viable cells through alterations in ROS metabolism (Meyer *et al.*, 1993; Zafarullah *et al.*, 2003). Blocking of NF-κB activation with the anti-oxidants PDTC as well as NAC was recently reported to prevent endothelial cells from inducing apoptosis (Aoki *et al.*, 2001; Zafarullah *et al.*, 2003). PDTC has further been shown to inhibit ionizing radiation and TNF-induced ROS formation, which also led to attenuation of apoptosis (Schreck *et al.*, 1992; Garg and Aggarwal, 2002). Moreover, NAC has been reported to possess a two to three times reduced distinct anti-oxidative effect than PDTC (Zhu *et al.*, 2002). In our study, ROS production, mitochondrial dysfunction and cell death were significantly inhibited following the addition of NAC or PDTC. Therefore, ROS production induced by the activation of Rac1 may trigger mitochondrial dysfunction and subsequently induces apoptotic cell death in GAS-infected epithelial cells.

We found that GAS infection activated p38MAPK through ROS production and p38MAPK is activated during oxidative stress responses. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK)-1-p38MAPK pathway which depends on ROS production plays a critical role in the immune system triggered by Toll-like receptor (TLR)-4 (Matsuzawa *et al.*, 2005). Since a marked increase in the ASK1 activity is observed following transcriptome analysis carried out in GAS-infected cells (Nakagawa *et al.*, 2004), GAS-induced cell death could be caused by the activation of the ASK–p38MAPK pathway. Since the activation of p38MAPK was inhibited by addition of PDTC and cell death was inhibited by addition of SB203880, it is possible that the activation of p38MAPKK depends on ROS production and GAS-induced cell death is dependent on p38MAPK activation.

In summary, the small GTPase Rac1 is activated during Fn–FNBPs complex formation and recruits actin filaments, which in turn stimulates GAS invasion into epithelial cells. Furthermore, Rac1 activates NADPH oxidase and induces ROS production. The increase in ROS production results in mitochondrial dysfunction followed by activation of caspase-3 and activates p38MAPK which subsequently leads to apoptotic cell death (Fig. S3). Therefore we conclude that epithelial cells can mediate invasion by preventing the expansion of infection regulated by apoptotic cell death.

Experimental procedures

GAS strains

Wild-type serotype M6 strain JRS4 ($M6^+$ $F1^+$) and its isogenic mutant SAM1 ($M6^+$ $F1^-$) were used in this study. The SAM1 mutant was constructed by genetic replacement of the *prtF1* allele with *prtF*::Ω-1 (Hanski and Caparon, 1992). These organisms were kindly provided by Dr E. Hanski (The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel), and were grown in Todd-Hewitt broth (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) supplemented with 0.2% yeast extract (THY) as described previously (Nakagawa *et al.*, 2001). EGFP-expressing JRS4 was previously described (Nakagawa *et al.*, 2001).

Cell cultures

HeLa HBD98V-1 cells (control vector-transfected cells) and HeLa HBD98-2-4 cells (Bcl-2-overexpressing cells) were kindly provided by Dr Y. Tsujimoto (Osaka University Medical School). These cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; JRH Biosciences), 20 μg ml^{-1} gentamicin (Sigma-Aldrich), and maintained at 37°C under 5% CO_2.

Infection protocol

For GAS infection, bacteria grown up to the mid-log phase were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). The number of bacteria was determined by measuring the colony-forming units (cfu). For dead bacterial infection, a part of the bacterial suspention was used to determine cfu and the rest of the culture was heat treated at 65°C for 20 min. The

bacteria were added to cell cultures without antibiotics at an appropriate moi. The experimental infection was then initiated (time zero of infection). The cells were incubated with GAS for 1 h and the infected cells were thoroughly washed with PBS, and 10% FBS/DMEM containing antibiotics (100 μg ml^{-1} gentamicin and 100 U ml^{-1} penicillin G). The cells were further incubated for the indicated periods.

Assessment of apoptosis

The kinetics of apoptotic cell death was determined by flow cytometric analysis (FACScan, or FACSCANTO II, BD Biosciences), or by enzyme-linked immunosorbent assays (Cell Death Detection ELISA; Roche Diagnostics). After infection with the GAS strains, cells were stained with propidium iodine (PI, Sigma, 1 μg ml^{-1}) and AlexaFluor488-conjugated annexin V (Molecular Probes, 500 U ml^{-1}) for 10 min before flow cytometric analysis. For ELISA detection, 100% of the histone release was defined as the amount of whole cellular lysate from 1×10^5 uninfected HeLa cells. Caspase-3/-7 activation was analysed by the proteolysis of fluorogenic synthetic substrate Ac-DEQD-MCA as described previously (Nakagawa *et al.*, 2001). Cleavage of PARP and caspase-9 activation was determined with Western blotting using specifically cleaved PARP or cleaved caspase-9 antibodies respectively (Cell Signalling Technologies). The p38MAPK-specific inhibitor (SB203580) was purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) and SP600125, the JNK-specific inhibitor, was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

Measurement of mitochondrial membrane potential loss ($\Delta\Psi_m$) and ROS production

Accurate determination of the mitochondrial membrane potential and ROS production in infected cells were determined by flow cytometry. HeLa cells (5×10^5 in six-well plates) were infected with GAS. For the positive control of mitochondrial membrane potential loss, cells were incubated with the uncoupling reagent mCICCP (50 μM, Sigma) or Staurosporine (1 μM; Sant Cruz Biotechnology) for 2 h. After the indicated times, cells were stained with $DiOC_6(3)$ (40 nM, Molecular Probes) and HE (2 μM, Molecular Probes) to measure simultaneously the mitochondrial membrane potential loss and ROS production for 15 min at 37°C. To measure mitochondrial membrane potential loss with high sensitivity, cells were stained with JC-1 (1 μg ml^{-1}) for 15 min. The cells were then detached from the plates by pipetting, and resuspended in ice-cold PBS. ROS scavengers (NAC, 1 mM; PDTC, 400 μM, Sigma-Aldrich) were added prior to 1 h prior to infection.

Bacterial viability assays

HeLa cells were cultured in 24-well culture plates. After 1 h of infection, cells were further incubated 1 h with DMEM/10% FCS with antibiotics to kill the extracellular organisms. Infected cells were lysed in sterile distilled water and serial dilutions of the lysate were plated on THY agar plates and the number of intracellular GAS was determined as described previously (Nakagawa *et al.*, 2001). Data represent mean cfu ± SEM of recovered bacteria for three independent experiments.

Construction of Rac1 expression vectors and transfection of Rac1 mutants

Human Rac1 cDNA was amplified with PCR from human PBMC cDNA libraries by using primer pair Rac1-F: 5′-GATC GGATCCATGCAGGCCATCAAGTGTGT and Rac1-R: 5′-GATC GAATTCTTACAACAGCAGCATTTTC. Underlines indicate the BamHI and EcoRI site respectively. PCR products were digested with BamHI and EcoRI, then ligated into pcDNA3.1Zeo(+) vector (Invitrogen). The synthetic oligonucleotides corresponding to the triple HA epitope Tag (3xYPYDVPDYA) was introduced between the HindIII and BamHI sites of pcDNA3.1 Zeo(+) was used for immunodetection of expressed Rac1 products. Point mutations of Rac1 cDNA were introduced with the MutanK Express kit (Takara Shuzo, Otsu, Japan). Rac1 dominant negative mutants (Rac1 V12 and L61) were constructed by introducing point mutation using GTGGGAGACGTAGCTGTAGGTAAA. These plasmids were transfected into HeLa cells with FuGene6 (Roche Applied Sciences) according to the manufacturer's instruction.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described (Nakagawa *et al.*, 2001). Non-infected cells and GAS-infected cells were lysed in Triton lysis buffer [1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM EDTA and Complete Protease Inhibitors cocktail (Roche Applied Sciences)]. Cellular lysates (30–40 μg protein) were subjected to immunoblot analysis. The primary antibodies against cleaved caspase-9 and the MAPK cascade were purchased from Cell Signalling Technologies. Anti-human Rac1, activated Rac1 and GST-fused PAK1-PBD were purchased from Transduction Laboratories (BD Biosciences). The secondary antibody was HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Cell Signalling Technologies). Blots were visualized using ECL-Plus reagent (Amersham Biosciences).

Fluorescence microscopy

Immunostaining of cells was performed as previously described (Nakagawa *et al.*, 2001). The primary antibody was anti-HA epitope antibody diluted 1:400 (Cell Signalling Technologies). The secondary antibody used was Cy5-conjugated anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research) diluted 1:200. To label bacterial and cellular DNA, cells were stained with 0.2 μg ml^{-1} propidium iodide (Sigma) in PBS. To visualize the actin filaments, cells were stained with AlexaFluor488-conjugated phalloidin (Molecular Probes). All fluorescence micrographs are confocal images acquired with a FV1000 laser-scanning microscope (Olympus).

Acknowledgements

This work was supported by grants-in-aids for scientific research (#21390487 and #17019021) from the Japan Society for the Promotion of Science, and Japan Science and Technology Agency.

References

Aoki, M., Nata, T., Morishita, R., Matsushita, H., Nakagami, H., Yamamoto, K., *et al.* (2001) Endothelial apoptosis

induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB: antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* **38:** 48–55.

Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., and Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272:** 217–221.

Baran, J., Weglarczyk, K., Mysiak, M., Guzik, K., Ernst, M., Flad, H.D., and Pryjma, J. (2001) Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69:** 1287–1297.

Bessen, D.E., Sotir, C.M., Readdy, T.L., and Hollingshead, S.K. (1996) Genetic correlates of throat and skin isolates of group A streptococci. *J Infect Dis* **173:** 896–900.

Bokoch, G.M. (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* **5:** 109–113.

Bosco, E.E., Mulloy, J.C., and Zheng, Y. (2009) Rac1 GTPase: a 'Rac' of all trades. *Cell Mol Life Sci* **66:** 370–374.

Brown, J.L., Stowers, L., Baer, M., Trejo, J., Coughlin, S., and Chant, J. (1996) Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol* **6:** 598–605.

Calvino-Fernandez, M., Benito-Martinez, S., and Parra-Cid, T. (2008) Oxidative stress by *Helicobacter pylori* causes apoptosis through mitochondrial pathway in gastric epithelial cells. *Apoptosis* **13:** 1267–1280.

Cleary, P.P., McLandsborough, L., Ikeda, L., Cue, D., Krawczak, J., and Lam, H. (1998) High-frequency intracellular infection and erythrogenic toxin A expression undergo phase variation in M1 group A streptococci. *Mol Microbiol* **28:** 157–167.

Cue, D.R., and Cleary, P.P. (1998) High-frequency invasion of epithelial cells by *Streptococcus pyogenes* can be activated by fibrinogen and peptides containing the sequence RGD. *Infect Immun* **66:** 4577.

Cue, D., Southern, S.O., Southern, P.J., Prabhakar, J., Lorelli, W., Smallheer, J.M., *et al.* (2000) A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin α5β 1-fibronectin–M1 protein complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 2858–2863.

Cunningham, M.W. (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13:** 470–511.

Cywes, C., and Wessels, M.R. (2001) Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* **414:** 648–652.

Cywes Bentley, C., Hakansson, A., Christianson, J., and Wessels, M.R. (2005) Extracellular group A *Streptococcus* induces keratinocyte apoptosis by dysregulating calcium signalling. *Cell Microbiol* **7:** 945–955.

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., and Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27:** 1–20.

Fischetti, V.A. (1989) Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin Microbiol Rev* **2:** 285–314.

Freeman, J.L., Abo, A., and Lambeth, J.D. (1996) Rac 'insert region' is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* **271:** 19794–19801.

Frost, J.A., Xu, S., Hutchison, M.R., Marcus, S., and Cobb, M.H. (1996) Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol* **16:** 3707–3713.

Garg, A.K., and Aggarwal, B.B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol* **39:** 509–517.

Hanski, E., and Caparon, M. (1992) Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89:** 6172–6176.

Haslinger, B., Strangfeld, K., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., and Sinha, B. (2003) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor-alpha and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* **5:** 729–741.

Hasty, D.L., Ofek, I., Courtney, H.S., and Doyle, R.J. (1992) Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* **60:** 2147–2152.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75:** 241–251.

Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., *et al.* (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275:** 1649–1652.

Jadoun, J., Ozeri, V., Burstein, E., Skutelsky, E., Hanski, E., and Sela, S. (1998) Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis* **178:** 147–158.

Joneson, T., and Bar-Sagi, D. (1998) A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem* **273:** 17991–17994.

Joyce, D., Bouzahzah, B., Fu, M., Albanese, C., D'Amico, M., Steer, J., *et al.* (1999) Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* **274:** 25245–25249.

Kim, S.G., Kim, S.T., Kang, S.Y., Wang, Y., Kim, W., and Kang, K.Y. (2008) Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. *Plant Cell Rep* **27:** 363–375.

Lee, J.M. (1998) Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene* **17:** 1653–1662.

Madden, J.C., Ruiz, N., and Caparon, M. (2001) Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* **104:** 143–152.

Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., *et al.* (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6:** 587–592.

Meehl, M.A., and Caparon, M.G. (2004) Specificity of streptolysin O in cytolysin-mediated translocation. *Mol Microbiol* **52:** 1665–1676.

Meyer, M., Schreck, R., and Baeuerle, P.A. (1993) H_2O_2 and

antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* **12:** 2005–2015.

Molinari, G., Rohde, M., Guzman, C.A., and Chhatwal, G.S. (2000) Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol* **2:** 145–154.

Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E., and Falkow, S. (1996) *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 9833–9838.

Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., and Hamada, S. (2001) Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* **3:** 395–405.

Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., and Hamada, S. (2004) Transcriptome analysis and gene expression profiles of early apoptosis-related genes in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol* **6:** 939–952.

Nerlich, A., Rohde, M., Talay, S.R., Genth, H., Just, I., and Chhatwal, G.S. (2009) Invasion of endothelial cells by tissue-invasive M3 type group A streptococci requires Src kinase and activation of Rac1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* **284:** 20319–20328.

Page, K., Li, J., Hodge, J.A., Liu, P.T., Vanden Hoek, T.L., Becker, L.B., *et al.* (1999) Characterization of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274:** 22065–22071.

Rajalingam, K., Oswald, M., Gottschalk, K., and Rudel, T. (2007) Smac/DIABLO is required for effector caspase activation during apoptosis in human cells. *Apoptosis* **12:** 1503–1510.

Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B., and Baeuerle, P.A. (1992) Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *J Virol* **66:** 6288–6293.

Shimizu, S., Shinohara, Y., and Tsujimoto, Y. (2000) Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19:** 4309–4318.

Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5:** 189–200.

Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., and Kamata, T. (2000) Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275:** 13175–13178.

Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T., and Kishi, K. (1998) Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* **115:** 1186–1196.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279:** L1005–L1028.

Tomasini-Johansson, B.R., Kaufman, N.R., Ensenberger, M.G., Ozeri, V., Hanski, E., and Mosher, D.F. (2001) A 49-residue peptide from adhesin F1 of *Streptococcus pyogenes* inhibits fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem* **276:** 23430–23439.

Tsai, P.J., Lin, Y.S., Kuo, C.F., Lei, H.Y., and Wu, J.J. (1999) Group A *Streptococcus* induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect Immun* **67:** 4334–4339.

Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466:** 6–10.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003) Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* **60:** 6–20.

Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2:** 67–71.

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., *et al.* (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* **182:** 367–377.

Zhu, B.Z., Carr, A.C., and Frei, B. (2002) Pyrrolidine dithiocarbamate is a potent antioxidant against hypochlorous acid-induced protein damage. *FEBS Lett* **532:** 80–84.

Zuliani, T., Duval, R., Jayat, C., Schnebert, S., Andre, P., Dumas, M., and Ratinaud, M.H. (2003) Sensitive and reliable JC-1 and TOTO-3 double staining to assess mitochondrial transmembrane potential and plasma membrane integrity: interest for cell death investigations. *Cytometry A* **54:** 100–108.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. A. Flow cytometric analyses of ROS production and $\Delta\Psi_m$ reduction in HeLa cells by chemical reagents affecting mitochondrial membrane potential. HeLa HBD98V-1 or HBD98-2-4 cells (5×10^5 cells) were treated with 50 μM carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (mCICCP) or 1 μM straurosporine (ST) for 2 h. Cells were incubated with 3,3′-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine [$DiOC_6(3)$; 40 nM] and dihydroethidium (HE; 2 μM) for 10 min at 37°C immediately before cytometric analysis. HE was degraded to ethidium (Eth) by ROS. The percentage of $DiOC_6(3)^{low}$ Eth^{high} cells was analysed by using a flow cytometer. One of three experiments with similar results is represented.

B. Kinetics analysis of $DiOC_6(3)^{high}$ Eth^{low} cells (normal cells; black bar) and $DiOC_6(3)^{low}$ Eth^{high} cells (damaged cells; white bar) in HBD98V-1 and HBD98-2-4 cells by chemical reagents affecting mitochondrial membrane potential. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.

Fig. S2. Live GAS infection induces cytoskeletal rearrangement and apoptotic cell death.

A. Confocal microscopic image of actin accumulation of live or dead JRS4. HeLa cells (4×10^4 per well) were infected with live JRS4 or dead JRS4 at a moi 100. After 1 h of infection, cells were washed with PBS and further incubated for 1 h with DMEM/10% FCS and antibiotics to kill the extracellular bacteria. After fixation with 4% PFA, actin was stained with AlexaFluor488-conjugated phalloidin (green), and cellular and bacterial DNA were stained with propidium iodine (red). Yellow arrowheads indicate phalloidin-positive GAS. Stained cells were analysed with confocal microscopy. Bars, 10 μm.

B. Confocal microscopic image of actin accumulation with live or dead SAM1 invaded cells. Stained cells were analysed with confocal microscopy. Bars, 10 μm.
C. Quantification of phalloidin-positive GAS. After phalloidin and PI staining, confocal images were analysed with Image-J software to count the numbers of bacteria. Red images were used for total count of attached and invaded bacteria and merged images were used for phalloidin-positive bacteria. At least 40 cells from three individual experiments were analysed. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.
D. Live JRS4 infection could induce apoptotic cell death in infected HeLa cells. GAS JRS4 (live or dead) or SAM1 (live or dead) was infected at a moi 100. After 1 h of infection, cells were washed with PBS and further incubated for 1 h with DMEM/10% FCS with antibiotics to kill the extracellular bacteria. After 5 h infection, histone release in infected cells was analysed with ELISA. Data represent means ± SEM of three individual experiments. $^*P < 0.01$.

Fig. S3. Schematic diagram of GAS invasion-induced apoptosis through the activation of GTPase Rac1, which constitutes a novel mechanism for GTPase-mediated ROS production.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd, *Cellular Microbiology*, **12**, 814–830

MEMO

東京医科歯科大学

歯と骨の分子疾患科学 国際教育研究拠点

～デント・メドミクスのインテリジェンスハブ～

平成22年度 実績報告書