

新潟歯学会学会抄録

第52回 新潟歯学会 総会

日時 平成31年4月13日(土) 午前10時20分～
場所 新潟大学歯学部講堂

[特別講演]

次世代器官再生としての口腔器官の機能再生を目指して

国立研究開発法人 理化学研究所 生命機能科学研究センター
器官誘導研究チーム チームリーダー
辻 孝

口腔器官はヒトの生活に密接に関係しており、その機能不全は生活の質にかかわる重要な課題となる。そのため健康長寿社会の実現には、歯や唾液腺などの口腔器官の医療において、新たな治療の確立に向けてパラダイムシフトが期待されている。歯科医療では、外傷や齲蝕、歯周疾患による歯を喪失に対する治療方法として入れ歯やブリッジ、インプラントによる歯の機能代替治療も広く普及しているものの、咬合系の機能的な回復につながる生物学的な治療法が期待されている。

歯科医療における大きな目標は、喪失した歯を再生により取り戻す「歯の器官再生治療」である。歯の再生治療は、審美的にも、生理的、機能的にも完全な回復につながる新たな生物学的治療技術として期待されている。私たちは、正常発生可能な歯胚を再生するための三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し(Nature Methods, 2007)、再生歯胚を歯の喪失部位へ移植することにより、再生歯が萌出、咬合し、歯根膜を介して骨と連結機能すると共に、外部からの侵害刺激を中枢に伝達しうる神経機能も再生することを明らかにした(PNAS, 2009)。さらに、早期の歯の機能改善に向けて、現在の骨結合型インプラント治療から歯周組織を有する次世代インプラントを開発し、生理的な歯の移動や知覚の回復が可能であることを実証した(Sci.Rep. 2014)。現在では、より早期の社会実装を目指して、大型動物であるイヌを用いた非臨床試験を進めている。

一方、口腔疾患として唾液腺の機能低下による口腔乾燥症が社会的な課題である。口腔器官再生医療の実現に向けて唾液腺の再生研究を進め、器官原基法により再生した唾液腺原基を唾液腺全摘出マウスの唾液腺導管に接続し、再生唾液を口腔内に分泌させ、口腔乾燥症の口腔

内の洗浄能や嚥下障害を機能的に回復できることを明らかにした(Nature Commun., 2013)。さらに最近、昭和大学との共同研究により、多能性幹細胞から誘導した唾液腺原基の同所的な移植により、成体での機能的な唾液腺再生に成功した(Nature Commun. 2018)。

これらのことから歯のみならず唾液腺を含めて、口腔器官の機能的な再生による包括的な口腔器官再生医療の実現可能性が示された。本講演では、歯科治療を含めた未来の口腔器官再生医療の実現に向けた基礎研究の戦略と進展を紹介すると共に、その現状と課題を考察したい。

[略歴]

新潟大学大学院理学研究科修了、九州大学大学院理学研究科博士後期課程を満期退学。山之内製薬(当時)研究員(昭和61～平成元年)、日本たばこ産業(株)医薬探索研究所主任研究員(平成6～13年)を経て、平成13年より東京理科大学基礎工学部、助教授。平成19年より教授。平成21年より東京理科大学・総合研究機構、教授。同大学院・基礎工学研究科、教授を兼務。平成26年より独立行政法人理化学研究所、発生・再生科学総合研究センター、グループディレクター、11月より組織改組により同研究所、多細胞システム形成研究センター、平成30年より同研究所、生命機能科学研究センター、器官誘導研究チーム、チームリーダー。博士(理学)。

平成20年より、株式会社オーガテクノロジーズ、取締役を兼任。平成20年、フランス・ルイ・パスツール大学、客員教授、東京歯科大学、東京理科大学、北里大学医学部、客員教授を歴任。平成28年より関西学院大学、神戸大学医学部、慶應義塾大学医学部、客員教授。Nature Publishing Group “Scientific Reports” Editorial Board Member。

[一般講演]

1 Sub-MICのグルコン酸クロロヘキシジンがin vitro複合バイオフィーム形成に及ぼす影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯学分野
○鈴木裕希, 大墨竜也, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野村由一郎

【目的】

近年、最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)の抗菌剤存在下で、バイオフィーム形成(Biofilm formation: BF)

が促進されるという報告が散見される。口腔において洗口液をはじめとする抗菌成分は、唾液により希釈され、時間経過とともに sub-MIC となるため、逆に BF を促進する可能性がある。そこで本研究では、う蝕病原細菌である *Streptococcus mutans* と、*Streptococcus oralis* および *Actinomyces naeslundii* の 3 菌種から成る in vitro 複合バイオフィームモデルを確立し、sub-MIC のグルコン酸クロルヘキシジン (CHG) を作用させた際の複合 BF に及ぼす影響について検討した。

【方法】

Tryptone-yeast extract (TYE) 培地で培養した菌液を 1 : 1 : 10³ [*S. mutans* : *S. oralis* : *A. naeslundii*] の割合で混合し、Calgary Biofilm Device を用いて培養した。12 時間初期付着させた後、0.05% sucrose 含有 TYE 培地 (TYE+S) で 4 日間培養した。4 日後、1/10MIC (0.06 μg/ml) の CHG 添加 TYE+S で 2 日間培養した。コントロール群として CHG 無添加 TYE+S で 2 日間培養した。バイオフィーム形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した。生菌数をコロニーカウント法で算出し、各種細菌の割合と *S. mutans* の BF 関連遺伝子の転写量をリアルタイム PCR で解析した。

【結果および考察】

SEM 像より、両群とも球菌を主体とするバイオフィームが観察された。CLSM 像より、CHG 作用群は、コントロール群と比較してバイオフィームの厚みが増したが、生菌数は 7.4×10^7 CFU (CHG 群) および 7.0×10^7 CFU (コントロール群) で有意差はなかった。各細菌種の割合は 9 割以上を *Streptococcus* 属が占有していた。CHG 作用後の *S. mutans* は、全ての BF 関連遺伝子の発現が増加傾向を示した。Sub-MIC の CHG 作用後にバイオフィーム量は増加したが、生菌数は増加せず、マトリックス量の増加と推測された。また、バイオフィームの空隙が減少し、付着界面を密に覆うようなバイオフィーム構造の変化が観察され、厚みよりも密度を増加させていると推察された。

【結論】

Sub-MIC の CHG は *S. mutans* の BF 関連遺伝子に影響を与え BF を促進することが示唆された。

2 心理ストレスによるセロトニン (5HT) 機構の変調は大縫線核 (NRM) での咬筋侵害応答を増大させる

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生理学分野

² 新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面口腔外科学分野

○清水志保^{1,2}, 中谷暢佑^{1,2}, 高木律男², 岡本圭一郎¹, 山村健介¹

【目的】

顎顔面部への侵害情報は、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) を経由し、上位脳に伝えられる。また上位脳から Vc への下行路として、下行性疼痛制御系がある。その主役として大縫線核 (NRM) が知られ、Vc の興奮性を調節することで顎顔面部の侵害応答を制御する。我々は最近、ストレスに伴う顎顔面痛の増大は、Vc の興奮性の増大を基盤とすることを解明した。一方、ストレスは NRM などの下行性疼痛制御系の変調をきたし、Vc の興奮性を増大させると考えられているが、詳細な脳機構は不明である。本研究の目的は、NRM での咬筋侵害応答に対するストレスの影響と、同部でのセロトニン (5HT) 機構の関与を、神経興奮のマーカーである Fos タンパクの発現を指標に解明することである。

【方法】

SD 雄ラットを用い、繰り返し強制水泳ストレス処置 (FST, 10 分/日×3 日) または非ストレス処置 (Sham) を実施した。翌日、咬筋へのホルマリン刺激による NRM での Fos の発現を免疫組織化学的手法にて定量した。検討項目は FST による NRM での 1) Fos または 5HT 陽性細胞数に対する影響、2) Fos/5HT の共発現細胞数への影響、3) 5HT 再取り込み阻害薬 (SSRI, FST 処置後、腹腔内投与) の繰り返し投与による Fos 発現への影響である。

【結果】

NRM での Fos 陽性細胞数/切片は、Sham 群 (19.5 個) と比べ、FST 群 (35.8 個) で有意な増加を認めた。一方、5HT 陽性細胞数/切片は、有意に減少した (Sham 群 : 28.3 個, FST 群 : 20.5 個)。Fos・5HT 共発現細胞数/切片に差はなかった (Sham 群 : 5.3 個, FST 群 : 6.3 個) が、全 Fos 陽性細胞数/切片に対する Fos・5HT 共発現細胞数/切片の割合は Sham 群 (27.5%) と比較し FST 群 (17.6%) では有意に減少した。SSRI の繰り返し投与は、FST 群で Fos 陽性細胞数を有意に減少させたが、Sham 群では変化は見られなかった。

【結論】

繰り返しストレスによる NRM での咬筋侵害応答の増大は、5HT 機構の変調によることが示唆された。

3 糖尿病治療薬メトホルミンは口腔扁平上皮癌細胞の遊走と増殖を阻害する

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生化学分野

²新潟大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面口腔外科学分野

○伊藤元貴^{1,2}, 高木律男², 照沼美穂¹

【目的】

2型糖尿病の第1選択薬であるメトホルミンは、膵臓・肝臓・肺・結腸、および乳腺など様々な組織の癌において抗癌効果を有することが報告されている。しかしながら、口腔癌においてはその病態生理学的な作用機序はわかっていない。そこで本研究では、口腔癌の中でも最も多い口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) におけるメトホルミンの抗癌効果の有無を、形態学的・生化学的に検討することにした。

【材料と方法】

日本人男性患者から採取し作製されたヒト歯肉扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 細胞を用いて、メトホルミン 5mM で細胞を刺激した。細胞の増殖と形態学的変化はタイムラプスイメージング法による経時的な顕微鏡画像および MTS アッセイにより解析した。癌細胞の悪性化の指標となる細胞遊走は、スクラッチアッセイにより検証した。また生化学的分析としては、癌細胞の代謝および抗癌効果に関連するタンパク質の発現・活性変化を、ウェスタンブロットリング法にて解析した。

【結果と考察】

タイムラプスイメージング法、MTS アッセイ、そしてスクラッチアッセイから、メトホルミンは Ca9-22 細胞の増殖と遊走を有意に抑制していることがわかった。これらの抑制には、細胞の収縮と細胞表面の著しい形態変化が伴っていたことから、これらの変化が OSCC の転移能を軽減させていることが示唆された。ウェスタンブロットリング法では、メトホルミンにより、細胞内のエネルギー代謝を調節する分子である AMP キナーゼの活性化と、AMP キナーゼの下流にあり脂肪酸合成の律速段階の酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼの不活化が認められた。このため、メトホルミンが Ca9-22 細胞の脂肪酸合成を阻害している可能性が考えられた。今回の結果は、口腔癌細胞では脂肪酸合成が活発であり、この経路を特異的に遮断することが抗癌効果をもたらすことを示唆している。本研究を踏まえ、今後、脂肪酸合成をより特異的に阻害する薬剤の開発へとつなげていきたい。

4 イタチザメ (*Galeocerdo cuvier*) の歯胚におけるエナメロイド形成と鋸歯形成

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 硬組織形態学分野

²東京医科歯科大学大学院医歯学研究科 硬組織構造生物学分野

○牛村英里¹, 大島勇人¹, 田畑 純²

鋸歯は進化の過程で幾度も表れた形質で、軟骨魚類のイタチザメやホホジロザメ、爬虫類のコモドオオトカゲや獣脚類、哺乳類ではサーベルタイガー等に見られる。このように鋸歯は主に肉食性の脊椎動物の歯の切縁にみられるもので、ステーキナイフの刃に例えられることもある。その鋸歯ひとつひとつの大きさ、その切縁上での向きとそれによって生じる空隙等が歯の切断機能を高め、肉食性の動物に有利に働くと考えられてきた。しかし、こうした形状の形成過程には不明の点が多い。そこで、本研究では魚類を用いて、鋸歯の発生について調べることにした。ただし、魚類の歯には、他の動物と異なる点がいくつかある。例えば他の動物の歯の最表層がエナメル質であるのに対して、魚類ではエナメロイドという硬組織であることである。魚類の歯の発生を調べるにはそれらの理解も必要であるため、エナメロイド形成も併せて解析する。

材料はイタチザメの仔魚 (全長 12 ~ 15cm) を用い、顎堤の連続切片を作製して、組織観察した。その結果、イタチザメの歯の発生は、粘膜上皮から陥入した歯堤が分岐せずに、屈曲しながら伸長することによって次々と歯胚を形成することがわかった。すなわち、この屈曲部内湾に歯胚が形成され、鐘状期初期まで進むと伸長した歯堤がまた小さな屈曲を作り、そこで次の歯胚が形成される。連続して発生する歯胚では急速に石灰化が始まり、歯胚形成時には鋸歯が形成される。鋸歯部分の上皮では核が基底側に偏移していること、また歯胚上皮が重層になるという特徴がみられる。それ以外の上皮細胞ではイタチザメ歯胚の上皮細胞は単層立方~円柱上皮であったが、エナメロイド形成が始まっても顕著な極性は見られなかった。むしろ、細胞核の偏位などを見る限り、エナメル芽細胞とは反対の極性に近く、その役割が大きく異なることが示唆された。

興味深いことに鋸歯の根元の部分では、鋸歯縁に対して縦断した場合、歯胚上皮が同心円状に並ぶ特有の像が観察され、鋸歯縁形成に関与している可能性を示唆していた。

5 Relationship between clinical periodontal parameters and changes in liver enzymes levels over an 8-year period in an elderly Japanese population

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 予防歯科学分野

² Dental Hygiene Program, Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

³ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命福祉学科

⁴ Department of Preventive Dentistry and Dental Public Health, Faculty of Dentistry, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁵ 明倫短期大学 衛生士学科

○ウイディタ エラストリア^{1,2}, 葭原明弘³,
ハニンドリオ リスドリアント⁴, 宮崎秀夫⁵

【Aims】

An association between periodontal disease and liver enzymes has been reported previously. This study examined the relationship between clinical periodontal parameters (CPP) and changes in liver enzymes levels in 265 non-institutionalized Japanese elderly aged 72 years over 8 years.

【Materials and methods】

The number of sites with probing pocket depth (PPD) ≥ 6 mm and clinical attachment level (CAL) ≥ 6 mm were measured. Changes in liver enzymes (alanine transaminase [ALT] and aspartate transaminase [AST]) was grouped based on any elevation of concentrations. The relationship was determined by logistic regression with adjustment for confounders. Interaction test and stratified analysis were then performed according to smoking status and alcohol drinking habits, separately.

【Results】

Elevation in ALT, but not AST, was significantly associated with PPD (odds ratio [OR] =1.10) and CAL (OR=1.03). A significant interaction of CPP on ALT was observed with smoking status, but not with alcohol drinking habit. The stratified analysis suggested that ALT was found to be significantly correlated with PPD (OR=1.20) and CAL (OR=1.04) to those who were smoker.

【Conclusion】

The elevation in ALT levels might be associated with clinical periodontal parameters among non-institutionalized Japanese elderly, and this association was modified by smoking status.

6 下歯槽神経再生における血管内皮細胞増殖因子の関与について

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯科麻酔学分野

² 新潟大学大学院医歯学総合研究科 高度口腔機能教育研究センター

³ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔解剖学分野

○西田洋平¹, 山田友里恵², 大峯 淳³, 前田健康²,
瀬尾憲司¹

【目的】

末梢神経損傷は、神経に並走する血管の損傷を伴う。近年、これらの血管の再生が損傷神経の再生に関与することが報告されているが、その詳細は不明な点が多く残されている。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は脈管形成および血管新生に重要な役割を担う糖タンパクである。しかし、損傷末梢神経の再生と VEGF の関連については、ほとんど知られていない。そこで本研究では末梢神経再生における VEGF の関与について検討した。

【方法】

7～8 週齢の C57BL/6 マウスを使用し、全身麻酔下で下歯槽神経を露出させた後マイクロ剪刀で完全切断した。神経切断後 1, 2, 3, 5, 7 日後の血管再生と神経軸索再生を免疫染色で観察した。次に、各時点での VEGF 受容体 (VEGFR)-1,2 の発現を免疫染色で、VEGFA, B の発現をウエスタンブロットで観察した。さらに、神経切断から 5 日間、24 時間毎に抗 VEGF 抗体 (1 μ g/日) を局所投与し、切断後 7 日目における神経再生を免疫染色によって評価した。

【結果】

神経切断後 2 日目に、切断部断端からの再生血管の伸長を認めた。3 日目には両断端から伸長した血管の再接合が観察された。一方で、再生軸索は血管再生に遅れ、5 日目に末梢側断端へ到達した。VEGFA, B は神経切断後 2 日目に最も強い発現を認め、その後経時的に減衰した。その受容体である VEGFR-1,2 は 2～3 日目に切断部周囲に多く分布していたが、5 日目以降は認められなかった。抗 VEGF 抗体投与群では、再生軸索の伸長抑制が認められた。

【結論】

VEGF-VEGF 受容体系は神経損傷により活性化し、末梢神経再生に寄与することが示唆された。