

SYIA-01

歯周炎モデルマウスを用いた抗酸化物質レスベラトロールの歯周組織に与える影響

2504

池田 恵莉

キーワード：レスベラトロール, 抗酸化, 酸化ストレス, 炎症性サイトカイン, 破骨細胞

歯周炎は歯の喪失の主要原因であり、罹患率の高い口腔内の慢性炎症疾患である。歯周炎は多因子疾患ではあるが、1つの側面では過剰な宿主免疫応答が歯周組織の破壊を引き起こし、歯の喪失をもたらしていると考えられている。我々は抗酸化かつ抗炎症作用のある植物由来ポリフェノール、レスベラトロール (RSV) が免疫炎症応答、破骨細胞に関与して歯周炎の改善に効果的に働くのではないかと考え歯周炎モデルマウスを用いて実験を行った。マウス上顎臼歯に糸を15日間留置し、歯周炎を誘発した。歯周炎の慢性化後にRSV (10mg/kg) を腹腔内に注射し、20日目に安楽死させた。上顎歯槽骨の骨吸収量を測定したところ、RSV投与群においてプラセボ投与群と比較して有意な骨再生が見られた。歯周組織の免疫染色により、RSV投与群において酸化ストレスの抑制が見られた。またqPCR法を用いて歯肉中の炎症性サイトカイン量を測定したところ、RSV投与群のIL-1βレベルが有意に減少していた。さらに、骨髄中の単球の単離培養による破骨細胞分化の観察から、RSV投与群は破骨細胞数の減少を認めた。骨吸収改善は、RSVの抗酸化作用・抗炎症作用により活性酸素の産生が抑制され、局所の酸化ストレスが減少し、さらに炎症が抑制されたためと考えられる。本研究からRSVを歯周炎患者の治療に併用する可能性が示された。

SYIA-03

蛍光/ラマン強度比を用いた歯石の有無の評価

3101

中村 紫野

キーワード：歯周炎, 歯石, セメント質, 象牙質, ラマン分光法

【目的】歯石除去の正確な評価は歯周治療の予後を左右する重要なポイントである。しかし、歯周基本治療中には歯肉縁下歯石を直視できず、術者の手指の感覚に頼ることが多い。これまでに、内視鏡型の歯石検出機器 (Perioscopy Inc, Oakland, CA, USA) や、蛍光測定による歯石沈着量測定機器 (Diagnodent™ Pen, KaVo, Biberach, Germany) が開発されてきた。しかし、主観的判断が存在することや、照射条件により術者間で判断や数値が異なることがある。本研究では、レーザー照射角度や照射距離による蛍光集光効率の変動を最小限にするために、ハイドロキシアパタイト (HA) のラマンバンド強度で規格化した蛍光強度、つまり蛍光/ラマン強度比を算出することにより歯石の有無の評価が可能かどうか検証を行った。

【材料と方法】本研究では歯根面に歯石が沈着した32本の抜去歯を使用した (昭和大学歯学部 医の倫理委員会 承認番号2013-002)。測定はポータブルラマン分光光度計 (ProRaman-L, Enwave Optonics, Inc) を用い、測定条件は励起波長785nm, 出力100mW, 露光時間10秒, 露光回数10回とした。規格化にはHAの960cm⁻¹のラマンバンド強度を利用し、ラマンスペクトルのフィッティング結果より蛍光/ラマン強度比を算出した。7本の抜去歯では、歯石沈着部位、部分的にスケーリングルートプレーニングを行いセメント質を露出された部位、歯質を削合し象牙質を露出させた部位の3つの異なる歯根面が存在する厚み1mmのスライスを作成し、蛍光/ラマン強度比の比較を行った。統計解析はWilcoxon rank sum testを用いた。25本の抜去歯では、スケーリング3ストロークごとに同部位を測定し、蛍光/ラマン強度比の変化を観察した。

【結果】セメント質および象牙質のラマンスペクトルはHAのラマンバンドである440, 580, 960cm⁻¹と有機質のラマンバンド2940cm⁻¹が確認できた。一方、歯石沈着部位では強い蛍光強度によってラマンバンドは検出されなかった。次に、歯根面の同部位をレーザー照射距離1mmから5mm, 照射角度を45度から135度まで変化させて規格化前後で比較したところ、規格化前の蛍光/ラマン強度比と比較して規格化後では一定値を示したため、本法を用いると照射条件により数値が変動しにくいことを示した。そして、7本の抜去歯で歯石沈着部位、セメント質、象牙質の蛍光/ラマン強度比を比較した。歯石沈着部位とセメント質、歯石沈着部位と象牙質には有意差が認められたが、象牙質とセメント質には有意差は認められなかった。最後に、歯根面の歯石沈着部位におけるスケーリング3ストロークごとの蛍光/ラマン強度比の変化を25本の抜去歯で測定した。25本中24本で、蛍光/ラマン強度比は測定ごとに減少した。更に、各測定値の差を算出すると、どの歯も0に漸近することが示された。

【結論】蛍光/ラマン強度比の変化が0に近似するときセメント質または象牙質が露出しており、歯石が除去された状態であることが示された。

SYIA-02

Aggregatibacter actinomycetemcomitansは腸内細菌叢・糖代謝を変化させ、NAFLDに影響を及ぼす

2402

駒崎 利奈

キーワード：Aggregatibacter actinomycetemcomitans, 非アルコール性脂肪性肝疾患, 腸内細菌

【目的】近年、歯周病が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の増悪因子となる可能性が示唆されている。本研究では、NAFLD患者における歯周病原細菌の感染とNAFLDの臨床/生化学的パラメーターとの関連を評価するとともに、Aggregatibacter actinomycetemcomitans ATCC 43718 (Aa) を経口投与したマウスを用いてAaの糖代謝、腸内細菌叢および肝脂肪化に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】NAFLD患者52名より末梢血を採取し、ELISA法により歯周病原細菌3菌種に対する血清抗体価を測定した。また、8週齢雄C57/BL6Jマウスに高脂肪食 (HF) または普通食 (NC) を与えるとともに、それぞれの群を更に2群に分け、10⁸ cellsのAa (HFAa, NCAa), または生理食塩水 (HFco, NCCo) を週6日経口投与した。6, 12週後に経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、μCTを用いた脂肪量の評価を行うとともに、組織切片による肝脂肪化の評価、肝臓マイクロアレイ解析及びマウスの便より抽出した16S rRNAを用いた腸内細菌叢解析を行った。

【結果と考察】NAFLD患者ではAaに対する血清抗体価と肝脂肪化との間に有意な相関が認められた。NCAa, HFAaともに耐糖能異常、インスリン抵抗性が認められ、HFAaでは体重、皮下・内臓脂肪体積の増加、肝脂肪化が認められた。NCCoとNCAaマウス肝臓でのマイクロアレイ解析により同定されたDEGを用いたKEGGパスウェイ解析では、glucagon signaling pathway, insulin resistanceの亢進が予測され、また腸内細菌叢解析においては属レベルでの細菌叢の構成の変化が認められ、機能予測解析においても有意な変化が認められた。

【結論】Aaの感染は腸内細菌叢を変化させ、NAFLDの増悪因子として働く可能性が示唆された。

SYIA-04

3次元培養骨髄間葉系幹細胞集塊Clumps of a MSC/ECM complexの細胞分化を制御するメカノトランスダクション機構の解析

3104

小松 奈央

キーワード：再生医療, 間葉系幹細胞, 三次元培養, メカノトランスダクション, YAP/TAZ

【目的】骨髄間葉系幹細胞 (MSC) と細胞自身が産生する細胞外基質 (ECM) を利用することでClumps of a MSC/ECM complex (C-MSC) が得られる。C-MSCは3次元での培養される細胞集塊で、効果的な組織再生能を示す (Cytotherapy, 2015)。一方、基質の固さ、細胞密度、浮遊状態などの因子がメカノトランスダクションを誘導し、転写制御因子YAP/TAZを介してMSCの細胞分化を制御するという報告がある。本研究では、C-MSC内においてもメカノトランスダクション機構が機能し、細胞分化能を制御するかを明らかにする。

【材料と方法】ヒトMSCsを24-well plateに2.0 × 10⁶ cells/wellで播種し、50μg/mlアスコルビン酸含有の増殖培地で4日間培養し十分なECMを産生させた。これを純的に剥離し、細胞シートの状態で浮遊させ、さらに増殖培地で5日間培養することで細胞集塊C-MSCを得た。または、このC-MSC作製過程を骨分化誘導培地で培養することで、骨分化誘導を施されたC-MSC (OIM-C-MSC) を作製した。この培養過程におけるC-MSCおよびOIM-C-MSCについて、I型コラーゲンの発現、F-actinの形態、YAP/TAZの局在と活性、分化能を解析した。

【結果と考察】C-MSC作製過程における浮遊培養状態では、F-actinの脱重合が促進した。これと一致して、経時的なYAP/TAZの核外移行、発現量の低下、およびその転写活性の低下が確認された。さらに、C-MSCは骨分化能のより脂肪・軟骨分化能が高かった。しかし、F-actinの脱重合の必須のcofilin1に対するsiRNAを導入したところ、YAP/TAZ活性が増加し、脂肪・軟骨分化能が低下し、骨分化能が上昇した。一方、OIM-C-MSCではC-MSCと比較して豊富なI型コラーゲンで形づくられており、高いYAP/TAZ活性を示した。このYAP/TAZ活性は、Integrinβ1 siRNA導入、もしくはF-actin重合阻害剤であるY-27632とblebbistatininによって抑制された。以上ことから、3次元培養されるC-MSCでは、浮遊状態であることでメカノトランスダクションが生じ、MSCsのYAP/TAZの核外移行を促進し、その活性を減弱させる可能性が示された。さらに、OIM-C-MSCでは豊富なI型コラーゲンを足場とすることで、F-actinの伸展を介してYAP/TAZ活性の低下が抑制されたと考えられる。

【結論】C-MSCにおいてメカノトランスダクションが機能し細胞分化を制御することが明らかとなった。

キーワード：歯根膜由来間葉系幹細胞，骨芽細胞RNA-seq，転写因子

【目的】 間葉系幹細胞は骨芽細胞分化誘導培地により骨芽細胞に分化することが知られており，その分化の過程についてはさまざまな転写因子が関与していると考えられているが，未だそのメカニズムは不明な点が多い。そこで我々は，ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）を実施し，誘導培地により発現が大きく変動した遺伝子を選定し，同遺伝子が骨芽細胞分化に与える影響について詳細な機能解析を実施することとした。

【材料と方法】 ヒトの抜去歯牙より歯根膜を採取し，酵素処理により単離したヒト歯根膜由来間葉系幹細胞を用いて，継代数3から6の間で実験を行った。RNA-seqにより2群間において有意な発現変動を認めた遺伝子（Differentially expressed genes: DEGs）を選別し，特定のDEGsに関してqRT-PCRとWestern blotting法により，骨芽細胞分化過程における発現を確認した。詳細な機能解析のため，siRNAを用いて特定の因子をノックダウンさせ，骨芽細胞分化に与える影響について調査した。さらに，転写因子-DNA相互作用を確認するためChromatin Immunoprecipitation（ChIP）assayを実施した。

【結果と考察】 RNA-seqの結果では，転写因子であるZBTB16が骨芽細胞分化誘導培地により著明な発現上昇を認め，同遺伝子はqRT-PCRとWestern blotting法でも有意な発現上昇を認めた。またsiZBTB16により，骨芽細胞分化は抑制された。さらに，ChIP assayの結果から，転写因子であるOsterixがZBTB16のプロモーター領域に結合することがわかった。

【結論】 ZBTB16は骨芽細胞分化誘導培地を用いた分化誘導において，歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を正に制御しており，同遺伝子はOsterixにより制御されていることが示唆された。