



山田 聡 先生

略歴

1991年 大阪大学歯学部卒業
1995年 大阪大学大学院歯学研究科修了 博士（歯学）
1995年 米国国立衛生研究所（NIH）研究員
1996年 日本学術振興会海外特別研究員
1999年 日本学術振興会特別研究員
2002年 大阪大学大学院歯学研究科 助手
2004年 大阪大学歯学部附属病院 講師
2017年 東北大学大学院歯学研究科 教授

Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた侵襲性歯周炎の分子病態解析

東北大学大学院歯学研究科歯内歯周治療学分野

山田 聡

我々は、結合組織の異常により大動脈瘤や弁閉鎖不全を呈するマルファン症候群患者において、歯根膜の脆弱性が慢性歯周炎あるいは侵襲性歯周炎の発症原因になり得ると考え、国立循環器病研究センターとの共同研究により、同病院に開設した歯周病外来においてマルファン症候群患者および類縁疾患を対象に歯周炎罹患の実態調査を行い、同症候群と歯周炎との関連性を解析してきた。その結果、マルファン症候群および類縁疾患の患者120名（男56名、女64名、平均年齢38.7歳）は、対応する年代の対照群に比べ、4mm以上の歯周ポケットを有する者の割合が有意に高く、歯周病が進行していることが明らかとなった。歯周病を伴ったマルファン症候群患者の多くは、慢性歯周炎と考えられる病態であることが示された。一方で、興味深いことに、マルファン症候群類縁疾患の一つであり、TGF- β 受容体の遺伝子変異が原因となり発症するLoeys-Dietz（LDS）症候群患者において、プラークコントロールは比較的良好であるものの限局した垂直性の骨吸収部位が多数みられる侵襲性歯周炎様の病状を呈している患者を1名見出した。そこで、LDS症候群における侵襲性歯周炎発症メカニズムを分子・遺伝子レベルで解明することを目的として、実際のLDS症候群患者におけるTGF- β 受容体遺伝子変異をノックインしたLDS症候群モデルマウスを作製した。同マウスの循環器組織および歯周組織における表現型、歯周炎に対する疾患感受性を解析した結果、同マウスでは、LDS症候群患者と同様に、大動脈組織における弾性線維のねじれや微細な断裂像が確認され、早逝傾向を示すことが明らかとなった。大動脈の弾性線維の構造異常が起これ、大動脈瘤や大動脈解離などの病態が引き起こされ、早逝傾向を示すと考えられた。一方で、同マウスの歯周組織は、野生型マウスと比較して、恒常状態では、歯槽骨吸収量、歯周組織の状態に明らかな差異は認められなかった。しかしながら、*Porphyromonas gingivalis*を経口投与する実験的歯周炎モデルにおいて、野生型マウスと比較して歯周組織における破骨細胞数が増加し、歯槽骨吸収が有意に増加していることが示された。以上のことから、組織の修復・再生や免疫炎症反応に重要な役割を担っているTGF- β シグナルの異常が、侵襲性歯周炎の分子病因の一つとなっている可能性が示された。



水野 智仁 先生

略歴

1996年 広島大学歯学部歯学専門課程卒業
2000年 広島大学大学院歯学研究科歯学臨床系修了
広島大学歯学部附属病院助手（第二保存科）
2001年 広島大学歯学部助手（歯科保存学第二講座）
2005年 日本歯周病学会専門医 第835号 取得
2007年 広島大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病態学分野助教
2012年 米国Missouri大学Kansas City校 Department of Oral Biology 留学
2013年 日本歯周病学会指導医 第244号 取得
2015年 広島大学病院講師
広島大学病院診療准教授
現在に至る

家族症例を用いた侵襲性歯周炎原因遺伝子の解明

広島大学大学院医歯薬保健学研究院歯周病態学研究室

水野 智仁, 栗原 英見

侵襲性歯周炎は若年者に発症し、プラークの残存は比較的軽度であるにもかかわらず、急速に著しい歯周組織破壊を惹起する歯周炎である。侵襲性歯周炎に関する報告は数多く存在し、家系内に集積する症例が存在することはよく知られている。しかし、原因遺伝子の同定を含め、分子あるいは遺伝子レベルでの発症の原因の解明は十分になされていないのが現状である。

Exome解析法は、全ゲノムのうちエキソン配列のみを網羅的に解析する方法である。エキソンのサイズは全ゲノムの約1-1.5%に過ぎないが、タンパク質に翻訳される領域であることから、機能的に重要であり、遺伝性疾患の多くがエキソン領域の変異によって引き起こされると推定されている。そのため全ゲノム配列解析に比べ、効率よく疾患関連遺伝子を同定できる方法として注目されている。Exome解析法を用いれば、linkage解析法によって、絞り込まれた関連遺伝子の含まれる染色体候補領域内に存在する遺伝子変異を効率よく検出することができる。遺伝学的手法で関連遺伝子を同定しようとする場合、同一遺伝子座に関連遺伝子が存在することが重要であるため、発症者が複数存在する家系の存在が必要となる。現在、少子化の影響もあり、大家系の数は少なくなっているのは事実であるが、広島大学病院歯周診療科に通院する侵襲性歯周炎患者の家系で、常染色体優性遺伝性の遺伝形式をとり、同一家系内に複数の患者が3世代にわたって認められる大きな家系が存在した。

私どもは、本家系内の侵襲性歯周炎発症者3名のDNAを用いて、Exome解析法によって候補遺伝子変異を7つに絞り込んだ。さらに、本家系DNAサンプルを用いたLinkage解析とセグリゲーション解析の結果、1つのミスセンス変異を、本家系に発症する侵襲性歯周炎の原因遺伝子候補変異として同定した。

他の家系や約100例の孤発例からは本変異が認められなかったため、in vivoにおける解析を進めることとし、TALENを用いたゲノム編集を行うことによって、本変異をもつノックイン（KI）マウスを作成した。その際、様々なdeletionおよびinsertionを持つ個体が得られたが、7bpのdeletionを持つ個体はframeshiftを起こすことからノックアウト（KO）マウスとして実験に使用した。

これらのマウスの上顎第二臼歯にligature結紮を行ったところ、wild type マウスに比べてKI heteroマウス、KI homoマウスおよびKOマウスにおいて有意な歯槽骨の吸収が認められた。本変異を有する遺伝子は宿主の免疫機構に関与することが考えられることから、本変異を有する遺伝子の機能不全によって宿主の免疫機構に変化が起こり、歯周組織の高度な破壊が起こったことが示唆された。

本シンポジウムでは侵襲性歯周炎の原因遺伝子の同定の重要性、さらに原因遺伝子変異が、細胞レベルで病態メカニズムに関与することを調べるためにKIマウスを作成することによって、本家系侵襲性歯周炎の病態解明を目指した研究成果について発表する。



鵜飼 孝 先生

略歴

1992年 長崎大学歯学部卒業
1996年 長崎大学大学院歯学研究科修了
1996年 長崎大学歯学部附属病院医員（第二保存科）
1997年 長崎大学歯学部助手（歯科保存学第二講座）
2004～2006年 米国ボストン大学Postdoctoral Fellow
2006年 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科助教（歯周病学分野）
2010年 長崎大学病院講師（歯周病治療室）
日本歯周病学会学術賞受賞，日本歯周病学会教育賞受賞
日本歯周病学会専門医・指導医
日本歯科保存学会専門医・指導医

歯周炎における骨吸収の制御にむけて

長崎大学病院 歯周病治療室
鵜飼 孝

歯周炎では細菌感染やlipopolysaccharide（LPS）に対する歯周組織の炎症反応の結果として，歯槽骨吸収が引き起こされると考えられている。骨吸収は単球／マクロファージ系細胞より分化する破骨細胞により誘導されるため，破骨細胞の分化制御は効果的な骨吸収抑制に重要である。破骨細胞分化誘導因子（receptor activator of NF κ B ligand: RANKL）やそのデコイレセプターであるosteoprotegerin（OPG）が同定され，破骨細胞の形成や活性化メカニズムの解明が急速に進んできた。また破骨細胞は形成促進系のサイトカインであるtumor necrosis factor α （TNF α ），抑制系のサイトカインであるinterferon γ （IFN γ ）やinterleukin-4（IL-4）などによっても調整されている。

TNF α はLPS刺激による骨吸収において，中心的な役割を果たしている因子の一つであることが多くの研究で示されている。また我々は歯周病原細菌の一つである*Porphyromonas gingivalis*刺激による破骨細胞形成促進にも，TNF α が重要な働きをしていることを報告している。そのため歯周炎による骨吸収の効果的な抑制には，TNF α による破骨細胞形成促進を抑制することが有効ではないかと考えられる。歯根膜細胞はRANKLを発現していることが確認されているので，歯根膜にはRANKL刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が存在していると考えられる。破骨細胞前駆細胞をRANKLと同時にTNF α で刺激をした場合と比較して，それのみでは破骨細胞を形成しない程度の低濃度のRANKL刺激をあらかじめ与えた破骨細胞前駆細胞にTNF α 刺激を加えた方が，破骨細胞形成が促進された。しかしOPG，IFN γ やIL-4などの破骨細胞形成抑制系のサイトカインでは，この破骨細胞形成の抑制は困難であった。

緑茶などに含まれるポリフェノールの一つであるカテキンは幅広い生物活性を有しており，骨吸収抑制にも関与することが報告されている。我々もLPS注入によるマウス炎症性骨吸収やLPSの歯肉溝への頻回投与によるラット歯周炎モデルにおいて，茶カテキン抽出物が骨吸収を抑制することを示してきた。また，緑茶カテキンの主要成分であるエピガロカテキンガレート（EGCG）は，*in vitro*でRANKL刺激によるマウス骨髄マクロファージからの破骨細胞形成を抑制した。さらにEGCGは破骨細胞形成抑制系のサイトカインでは抑制できなかった，低濃度のRANKL刺激を与えた破骨細胞前駆細胞からのTNF α による破骨細胞形成も効果的に抑制した。これは歯周炎のようなTNF α が関与すると考えられる炎症性骨吸収において，EGCGが効果的な骨吸収抑制剤となり得る可能性を示していると考えられる。本講演ではこれまでに得られた研究成果を中心に歯槽骨破壊のメカニズムと歯槽骨吸収抑制の可能性について考察してみたい。



大島 光宏 先生

略歴

東京都立九段高校卒（1976年，高28回）
日本大学歯学部卒（1982年，学部30回）
東京医科歯科大学大学院歯学研究科修了（1987年）歯学博士
日本大学歯学部生化学教室 助手（1987年）
日本大学歯学部生化学教室 講師（2006年）
奥羽大学薬学部 教授（2010年）
カロリンスカ研究所がんセンター短期留学（2004年，2006年）

歯周炎関連線維芽細胞の発見と歯周炎診断・治療のパラダイムシフト

奥羽大学 薬学部
大島 光宏

歯周病は世界で最も罹患率の高い病気とされ、歯磨きによって治癒する歯肉炎と、歯を失う歯周炎（歯槽膿漏）とに大別される。有史以来1960年代前半まで長い間原因が不明とされてきた歯周炎であるが、1965年にLöeらにより細菌性プラークが“歯肉炎”の原因だと証明されたことをきっかけに、なぜか“歯周炎”の原因も細菌であるというパラダイムが構築された。しかし、“歯周炎細菌原因説”は、① 歯周病菌は口腔常在菌である、② 歯磨きの有無で重度歯周炎罹患率は変わらない、③ PMTCでは抜歯数を減らせない、④ ワクチンができない、⑤ 加齢、糖尿病、肥満、アルコール依存などの非感染性疾患（要因）と相関する、など多くの矛盾を抱えている。私どもは、歯周炎は腫瘍と同じ“創傷治癒”反応が原因ではないかと考えた。すなわち、歯は生体表面の上皮の連続性を破って露出している唯一の硬組織であり、歯の周囲を生体が創傷と認識してしまうことで歯根を上皮で覆う反応が起き、皮膚の傷が治癒するとかさぶたが剥がれ落ちるのと同様に歯が抜けるのではないかと考えた¹⁾。

歯周炎研究には適切な動物モデルが存在しないため、日本大学歯学部生化学の山口らは、細胞培養法による「生体外歯周炎モデル」を確立した²⁾。歯周炎罹患歯肉由来の線維芽細胞をコラーゲンゲル内で三次元培養すると、わずか数日後にコラーゲンが極度に分解されたため、この細胞を“歯周炎関連線維芽細胞（PAFs）”と名付け、歯周炎の原因細胞ではないかと推測した。次に歯周炎分子標的治療薬の候補を探すべく、このモデルを用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、FLT-1（VEGFR1）が重要な原因候補遺伝子であることを見出し、その遺伝子産物が新たな治療標的となることを提案した³⁾。さらに東京大学医学部呼吸器内科の堀江らは、理化学研究所FANTOM5プロジェクト⁴⁾のCAGEデータ解析により、PAFsでは石灰化のマスター遺伝子であるRunx2の転写開始点に明らかな相違があることを見出した⁵⁾。すなわち、PAFsが通常の歯肉線維芽細胞とは明らかに異なる細胞であることを証明した。

また、演者の発明品ペリオスクリーン「サンスター」は、一部の歯肉炎患者も陽性となる。このため、歯周炎の進行に強く関与が疑われる肝細胞増殖因子（HGF）を唾液（洗口吐出液）中に検出することで歯周炎患者だけをスクリーニングする試験紙の作製を目指し、東京医科歯科大学歯周病学分野の和泉・青木らのメンバーと実用化に向けた取り組みを行っている（投稿準備中）。さらに東京大学医学部呼吸器内科の齋藤らは、東京医科歯科大学歯周病外来で採取した歯肉溝滲出液（GCF）中のmiRNA発現パターンを調べ、全く新しいタイプの部位別歯周炎診断法が確立できることを明らかにした⁶⁾。

これらの研究を基に、PAFsをターゲットとした歯周炎の分子標的治療や遺伝子治療の前臨床試験を行う準備を進めている。また、すでにPAFsを作製する方法も見出しており、100年後には歯周炎が過去の病気になることを夢見ている。

文献

- 1) 大島光宏，山口洋子，日薬理誌（総説）141, 314-320, 2013
- 2) Ohshima M, et al., J Dent Res 89, 1315-1321, 2010
- 3) Ohshima M, et al., J Clin Periodontol 43, 128-137, 2016
- 4) Forrest AR, et al., Nature 507, 462-470, 2014
- 5) Horie M, et al., Sci Rep 6, 33666, 2016
- 6) Saito A, et al., FEBS Open Bio 7, 981-994, 2017