

大島 光宏 先生

略歴

1982年 日本大学歯学部卒
1987年 東京医科歯科大学大学院歯学研究科修了
1987年 日本大学歯学部生化学教室 助手
2006年 日本大学歯学部生化学教室 講師
2010年 奥羽大学薬学部 教授
現在に至る

カロリンスカ研究所がんセンター短期留学（2004年，2006年）

歯周炎のプレジジョン・メディシンに向けて

奥羽大学薬学部 生化学分野
大島 光宏

ヒトは37兆個の細胞（6割は赤血球）からできているとされ、細胞どうしの話し合いにより生命が成り立っている。「すべての細胞は細胞から」という標語で有名なシャリテーのRudolf Virchowはまた、「すべての疾病は細胞の異常に基づく」ことを提唱した。つまり歯周炎にも原因細胞が存在するはずである。

ヒトの体はよく“ちくわ”に例えられ、口から肛門までの消化管の表面は上皮に覆われ、実は体外である。この生体表面の上皮の連続性が唯一途切れているのが歯の萌出部分であり、常在菌に守られてはいるものの常にエイリアン侵入の危機にさらされている。

“歯周病”という言葉が一般に使われているが、歯磨きで治癒する歯肉炎と、アタッチメント・ロスが起こり、最終的に歯が抜ける歯周炎とを分けて考えるべきだと思っている。歯周炎も細菌が原因と考えられてきたが、歯を磨かない集団と磨く集団とで重度歯周炎の罹患率が8%程度で変わらない、世界全体でも1990年から2010年までの20年間で重度歯周炎罹患率が11%程度で推移しているなど、有効な治療法が確立、普及しているとはいえない状況であると思われる。

世界保健機構（WHO）によると、歯周病を含む口腔疾患は「noncommunicable diseases, NCDs」、すなわち非感染性疾患（日本語では『生活習慣病』と訳される）に分類されており、このことを記した文のはじめには、“Oral diseases are the most common noncommunicable diseases (NCDs) and affect people throughout their lifetime, causing pain, discomfort, disfigurement and even death.”と書かれている。特定の原因菌が体内に侵入して発症する感染症であれば、コッホの四原則を満たす原因菌が特定されているはずであるし、動物に原因菌を感染させれば、（骨吸収だけではなく）アタッチメント・ロスを起こした適切な動物実験モデルが容易に作製できているはずである。歯周炎は、加齢、糖尿病、肥満、アルコール依存症などの非感染性疾患（要因）（NCDs）と相関することが示されている。非感染性疾患と相関する非感染性疾患（WHO）でありながら感染症だといわれている歯周炎（歯周病）は、『ジキル博士とハイド氏』のような二重人格なのかも知れない。

本シンポジウムでは、私のほか5名の先生方にご登壇いただき、歯周炎のプレジジョン・メディシンの実現に向けた取り組みをご紹介いただく。山口洋子先生には、歯周炎の原因細胞である可能性が高い“歯周炎関連線維芽細胞（PAF）”を発見した経緯と、治療薬のスクリーニングを経て予備的なカニクイザルへの抗体投与に至った一連の展開をご紹介いただく。堀江真史先生には、理研FANTOM5プロジェクトでのPAFの解析結果についてご紹介いただく。齋藤 朗先生には、miRNAによる歯周炎診断の可能性について、青木章先生には、口腔内のHGF検出による歯周炎診断の可能性についてそれぞれご紹介いただく。山内恒人先生には、羽咋郡市中野プロジェクトと称する、糖尿病と歯周炎の関わりを統計学的に解析する始めて間もない試みをご紹介いただく。

最後にもう一度私から、インプラント周囲炎に関する最新の知見をご紹介し、総合討論へと移行したい。



山口 洋子 先生

略歴

東邦大学理学部卒業
中学校教諭（理科）、薬品会社企画開発を経て
1991年 日本大学歯学部副手（総合歯学研究所 組織培養室）
2001年 日本大学歯学部副手（生化学）
2007年 日本大学歯学部助手（生化学）
2013年 日本大学歯学部助教（生化学）
現在に至る

Primary patient-derived cellsが教えてくれること

日本大学歯学部生化学講座
山口 洋子

たかが培養細胞，されど培養細胞。Primary patient-derived cellsは，とても有効な研究ツールである。私どもは，歯周炎におけるアタッチメント・ロスのモデルを作ろうと，patient-derived cellsとしてヒト歯周炎罹患部位の歯肉から，線維芽細胞と上皮細胞をそれぞれ初代培養し，三次元培養を行った。コラーゲンゼルの中に線維芽細胞を包埋培養してゲル化させ，その上に歯肉上皮細胞を播種した。次の日に浮遊培養を開始し，5日目にメッシュに載せて空気に曝して上皮を重層化させた。その後，HE標本を作製して観察した。すると，口腔癌細胞はコラーゲンゼル内に浸潤したが，初代培養した歯肉上皮細胞は全く浸潤しなかった。上皮細胞が浸潤すれば，アタッチメント・ロスのモデルができたのだが，残念ながら失敗に終わってしまった。ところが，重度歯周炎罹患歯肉由来の線維芽細胞のうち，ゲル内に包埋培養するとコラーゲンゼルをポロポロに溶かす細胞がいることを見つけた。もしかすると歯周炎の原因細胞かも知れないと思い，歯周炎関連線維芽細胞（PAF）と名付けた。同じ組織由来の細胞でも，このような現象を起こさない細胞もあり，こちらはnonPAFと呼ぶことにした。もちろん健康歯肉からは，PAFのような細胞は分離できていない。

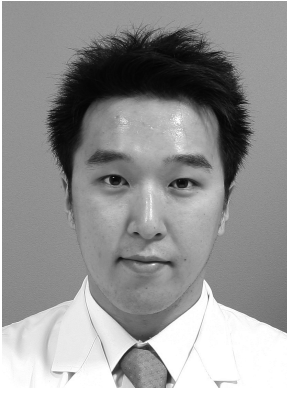
PAFを使ったコラーゲンゼル三次元培養を「生体外歯周炎モデル」と名付け，治療薬のスクリーニングを行っていたところ，メカブとその主成分フコイダンには，コラーゲンをさらに強く分解させる作用が見出された。フコイダンは線維芽細胞の肝細胞増殖因子（HGF）産生を促進するので，HGFをゲル中に加えたところ，ゲルは見事に溶けてしまった。そこで今度はゲル中に，抗ヒトHGF中和抗体（ポリクローナル）を加えたところ，コラーゲン分解は顕著に抑制され，この抗体が歯周炎治療薬となる可能性が見いだされた。

そこで，霊長類医科学研究センターに飼育されている，歯周炎を自然発症したカニクイザルで抗体の効果を試すことにした。まず歯周炎罹患部位由来歯肉からサルPAFを分離し，「サル生体外歯周炎モデル」で抗HGF中和抗体の効果を試した。ポリクローナル抗体だったので予想どおりサルのHGFともクロスし，コラーゲン分解は顕著に抑制された。予備試験として実際にサルの歯周炎罹患部位に抗体を注射したところ，歯肉の炎症は消退し，HE標本では炎症性細胞浸潤の減少が観察された。さらに抗体注射部位由来の線維芽細胞では，nonPAF化が観察された。現在，（実験用）完全ヒト抗体を入手し，歯周炎治療薬としての有効性を予測する研究を行っている。

がん治療の分野でも，ようやくprimary patient-derived (cancer) cellsの有用性が認識されつつあり，biopsyで採取した組織由来のがん細胞を初代培養し，その患者個人にとって有効な治療薬のスクリーニングに使う，個別化医療の研究が行われるようになってきた。

私どものこれまでの研究で，PAFにもsubtypeがあることが予想されており，患者や部位ごとに有効な治療薬が異なる可能性が示唆されている。つまり，抗HGF中和抗体が有効な例，c-Met阻害剤が有効な例，他の抗体や低分子阻害剤，はたまた生薬が有効な例があると考えている。

以上のように，私どもはprimary patient-derived cellsの培養を通じて，歯周炎のプレジジョン・メディシンに貢献できる日が来ることを願っている。



堀江 真史 先生

略歴

2005年 東京大学医学部医学科卒業
2014年 東京大学医学系研究科博士課程修了（呼吸器内科学専攻）
2016年 東京大学 保健・健康推進本部 助教
2017年 Keck School of Medicine of USC Division of Pulmonary and
Critical Care Medicine
2019年 7月 大阪大学医学系研究科 がんゲノム情報学 准教授

FANTOM5プロジェクトによる歯周炎関連線維芽細胞の解析

大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム生物学講座 がんゲノム情報学
堀江 真史

ヒトやマウスのゲノム配列が解読されて15年以上経つがゲノムの機能の全容はいまだに十分に解明されてはいない。ゲノムの機能を明らかにする手法の1つとして転写産物全体のトランスクリプトーム解析が盛んに行われており、近年の次世代シーケンサー（NGS: Next Generation Sequencer）の技術革新により様々なアプローチが可能となってきている。そのうちの一つであるCAGE法（Cap Analysis of Gene Expression法）とは、タンパク質コードRNA・タンパク質非コードRNAの区別を問わず、また3'端がポリアデニル化されている・いないを問わず、RNAの5'端にキャップ構造を付加する転写開始点をゲノムワイドにプロファイルする、理化学研究所で独自開発された技術である。CAGE法の活用により「全ゲノムの70%以上がRNAとして転写されていること、そしてその大半がタンパク質をコードしないnon-coding RNAである」ことが報告され「RNA新大陸」が発見されたことは記憶に新しい（Science. 2005;309:1559-1563）。

FANTOM（Functional ANnotation Of the Mammalian Genome）プロジェクトとは2000年に理化学研究所の林崎良英博士が中心となり設立された国際共同研究体であるが、当初の目標であったマウス cDNAの機能データベース構築の範囲を超えて、CAGE法を活用したマウスゲノムにおける転写地図の構築やヒト単芽球から単球への分化過程におけるダイナミックな転写ネットワークの変化の解明など、数々の成果を挙げて来た。さらに第5期であるFANTOM5プロジェクトでは約1,000種類のサンプル（初代培養細胞やヒト手術組織、細胞株）を収集しCAGE法により約185,000個のプロモーター、約44,000個のエンハンサーを測定し、「正常細胞」の状態を定義した（Nature. 2014;507(7493)）。

演者らはFANTOM5プロジェクトに提供した歯肉線維芽細胞や歯根膜線維芽細胞、歯肉上皮細胞のCAGEデータに基づいて、世界で初めて歯肉線維芽細胞の「正常状態」の定義を行った。さらに歯周炎患者から採取された極度にコラーゲン分解能を有するPAF（Periodontitis Associated Fibroblasts）を解析することにより、PAFが正常歯肉線維芽細胞と比較して特異的なプロモーター活性を有し、それらが歯周炎の重要な病態形成要因の一つである局所のコラーゲン分解に寄与している可能性を見出した（Sci Rep. 2016;6:33666）。歯周炎領域におけるトランスクリプトーム解析の現状や今後の可能性等も含めて議論したい。



齋藤 朗 先生

略歴

1998年 東京大学医学部卒業
2005年 東京大学医学系研究科博士課程修了（分子病理学講座）
2008年 スウェーデン・カロリンスカ研究所（Cancer Center Karolinska）
2011年～ 東京大学保健・健康推進本部

歯周炎患者の歯肉溝滲出液における microRNA プロファイル

東京大学 保健・健康推進本部
齋藤 朗

Non-coding RNA（蛋白質に翻訳されないRNA）の一種である microRNA は、21 - 25 塩基長の1本鎖 RNA（mature microRNA）である。同定されている microRNA 数は増加傾向で、最新のデータベース（miRBase v22）には、ヒトでは2654種類の microRNA が記載されている。microRNA は mRNA の3'-UTR 領域の部分相補的な配列に結合し、標的となる mRNA を不安定化し、さらに蛋白翻訳を抑制する。各々の microRNA は数百個の遺伝子を標的にすると想定されている。TargetScanなどのウェブツールを用いて、microRNA の標的遺伝子の予測が可能であり、ヒト遺伝子（mRNA）の半数以上が microRNA による制御を受けているとの報告もある。

細胞の種類によって microRNA の発現プロファイルは異なっており、発現量の多い数十種類の microRNA が、各々の細胞における microRNA 全発現量の殆どを占めている。たとえば歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞では、発現量の多い microRNA 50種類で、microRNA 全発現量の90%以上を占めている（FANTOM5 miRNA atlasに基づいて試算）。したがって各々の細胞や疾患病態によって、特徴的な microRNA-mRNA 調節機構が存在すると考えられている。このように microRNA は遺伝子発現の転写後調節機構として、細胞の増殖や分化・器官形成・炎症・発癌など多彩な生命現象に関与しており、その機能的な重要性が注目されている。

さらに近年では、血液・唾液・尿などの体液には、microRNA が安定して存在しており、これが疾患病態を反映する診断バイオマーカーとして有用であることが明らかとなってきた。特に血液中の microRNA を検出することで、がんの早期発見が可能であることが示され、非侵襲的・簡便かつ比較的安価な診断法として実用化が迫っている。網羅的な microRNA の検出法として、定量的 PCR、microRNA アレイ、RNA シーケンス、などが活用されている。このうち定量的 PCR 法は感度・特異度とも優れており、最近では核酸誘導体である LNA（Locked Nucleic Acid）をプライマーに用いる技術によって、752種類の microRNA を同時に定量できる PCR パネルが開発されている。

我々は歯肉溝滲出液（GCF：gingival crevicular fluid）に含まれる microRNA を、PCR パネルにより検出した。健常者および歯周炎罹患患者から採取された GCF における microRNA の発現パターンを比較検討し、歯周炎患者において特徴的な microRNA 群を同定した（FEBS Open Bio. 2017;7(7)）。GCF 中の microRNA を検出することで、非侵襲的な方法により、歯周炎の診断精度を高めることができるかもしれない。唾液や GCF に含まれる microRNA の歯周炎診断への応用、さらに歯周炎病態における microRNA の機能的意義について議論したい。



青木 章 先生

略歴

- 1989年 東京医科歯科大学歯学部卒業
- 1989年 東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第二講座 研修医・医員
- 1996年 東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第二講座 リサーチ・アソシエイト
(日本学術振興会研究員)
- 1998年 東京医科歯科大学歯学部歯科保存学第二講座 助手
- 2003～2004年 米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校
Visiting Assistant Professor (文部科学省在外研究員)
- 2007年 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 助教
- 2011年 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 講師
- 2017年 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 准教授
- 2019年 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 歯周光線治療学
担当 教授

歯周病診断における肝細胞増殖因子 (HGF) の応用

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歯周光線治療学
青木 章

現在、歯周病の診断は、主にプロービングやエックス線検査などの臨床評価に基づいて行われている。これら臨床パラメーターの評価は、歯科医の経験と技術に大きく左右される。今後、歯周炎の客観的かつ定量的な生物学的診断法の開発が求められており、そのような診断法は大規模集団でのスクリーニング法としても有用であると考えられる。

これまでに、歯周病診断のために、大島らは唾液中の潜血（ヘモグロビン）を検出するイムノクロマトグラフィー試験紙（ペリオスクリーン「サンスター」®）を開発した。本試験紙は、口腔内の炎症の検知に非常に優れ有用であるが、高感度であるため健常者でも偽陽性を生ずる欠点を有している。従って歯周病のスクリーニングにおいて、中等度以上の歯周炎患者をより正確に診断するためには、他のバイオマーカーを検討する必要がある。

唾液には、GCF、成長因子、サイトカイン、マイクロRNAを含む様々なタンパク質や核酸などが含まれているため、歯周病の診断に有効な多くの情報を得ることができる。特に、GCF中には、宿主由来の酵素やその阻害因子、炎症性メディエーター、宿主応答修飾因子、組織破壊の副生成物などがあり、それらは歯周炎を検出するための有用なバイオマーカーとして考えられてきたが、汎用されるまでには至っていない。

私達は、その一つとして、GCF中の肝細胞増殖因子（HGF）に注目している。これまでに大島らは、HGFが歯根膜や歯肉の線維芽細胞から産生され、歯肉上皮細胞の主な化学誘引因子であることを報告し、歯周炎の進行における上皮の深行増殖への関与を示唆している。加えて、大島らの提唱する歯周炎局所から検出される歯周炎関連線維芽細胞（PAF）において、HGFの遺伝子発現が上昇しており、HGFはコラーゲン分解に関与することが示され、また、一方で破骨細胞形成にも影響を及ぼす可能性も報告されている。従って、HGFは歯周炎の重症度との密接な関連が予想され、これまでの研究では、GCFにおけるHGFと歯周炎の重症度との相関が臨床的に明らかにされている。

そこで、私どもが歯周炎患者を対象として実施した臨床研究では、洗口吐出液中においても、HGF濃度が臨床パラメーターと正の相関を示し、歯周炎の重症度に伴って増加することが確認された。さらに、そのHGF濃度は歯周炎における歯槽骨吸収とも有意な関連を示した。よって、洗口吐出液中のHGF量は歯周病の状態を評価する指標として有用であると考えられる。

さらにHGF試験紙を試作し用いたところ、洗口吐出液では反応ラインの発色が低いため視認陽性率が全体的に低く、臨床パラメーターとの相関が低い結果ではあったが、重度の歯周炎では陽性率が有意に上昇した。従って、さらなる改良により感度・特異度を増加させることができれば、HGF試験紙は歯周炎診断において有用になる可能性がある。



山内 恒人 先生

略歴

1981年 東京都立大学理学部数学科卒業
1984年 慶應義塾大学工学研究科修了（修士）
1986年 筑波大学大学院経営政策科学研究科修了（修士）
1984年 外資系保険会社勤務（アクチュアリー・数理統計）～2012年まで
2013年 サムスン生命保険勤務（顧問）～2015年まで
2005年 慶應義塾大学理工学研究科非常勤講師～現在
2006年 東京大学理学部数学科（アクチュアリー・統計プログラム）非常勤講師
～2013年まで
2016年 慶應義塾大学理工学研究科特任教授～現在
現在、慶應義塾大学のほか、東京大学、大阪大学、首都大学東京などでアクチュアリーとして保険数学の講義を担当。

羽咋郡市中野プロジェクト（糖尿病と歯周病の関連）の統計解析

慶應義塾大学理工学部

山内 恒人

「歯周病は糖尿病の第6番目の合併症」と言われてから久しいが、糖尿病専門医が外来で歯周病を発見し、歯科を紹介するというシステムは未だ確立されていない。羽咋郡市医師会糖尿病地域連絡協議会副会長・志賀クリニック院長・中野茂先生、金沢医科大学・糖尿病・内分泌内科・臨床准教授・小西一典先生、羽咋郡市医師会、羽咋歯科医師会、ならびに志賀町のご協力を得、ペリオスクリーン「サンスター」®を用いて糖尿病患者の歯科受診勧奨を行う羽咋郡市中野プロジェクトが立ち上がっている。

志賀クリニックを受診した生活習慣病を有する患者から洗口吐出液を採取し、ペリオスクリーンによる歯周病検査を実施して歯科受診を勧奨し、残りの洗口吐出液を用いて肝細胞増殖因子（HGF）およびヘモグロビンの定量（参考値）を行った。また血液検査とともに、歯周病の自覚症状に関するアンケート調査も実施した。その後、歯科医院にて患者の残存歯数および地域歯周疾患指数（CPI）を調査した。（日本大学歯学部倫理委員会許可番号：EP17D007-1、奥羽大学倫理委員会承認番号：第194号）

得られた患者データをグラフ上で整列させたときに屈折点が観察され、これが何らかの病理学的なシグニフィカントを持つのではないかとこの観点から数学的な解析を試みた。まず、統計的に意義のある手法によって患者群を分割する際に回帰木の手法を使用した。手法としては古くからあるものだが、それを反復的に使用することによって、現状の中野プロジェクトのデータから、albumin-to-creatinine ratio（ACR）31.5mg/g Crに分割点がみられ、糖尿病学会ガイドライン値である糖尿病腎症の判定基準ACR 30mg/g Crに非常に近い値が得られた。この手法の利点は数学的な分布を想定しないで実行できる点である。仄聞にして誤りがあるかもしれないが、基準値範囲設定に正規分布などの分布を仮定し、平均 μ に標準偏差 σ を用いて、 $\mu \pm 2\sigma$ などの値で基準値を設定する、あるいは分布形を用いて後付けで斯くの如しと説明するなどの方法があるや聞いている。しかし、正規分布を仮定すること自体かなり厳しい条件であり、データのヒストグラムがいわゆるbell shapeであっても正規分布が適用できる場合はかなり限定的であることに鑑みると、よりデータ特性を活かしながらも簡便で誰でもできる手法の開発が必要と思われる。更に、この手法では、患者データを直接使用しながら、データの分割点の周囲が何らかの病変の変化点をもたらしていないかの考察の候補を提供することである。もちろん、無意味な候補点多数挙げてしまう可能性はあるものの統計解析者と医療者との自由なコミュニケーションの場も期待できるのではないかと考えている。無論、演者はこれが最も良い手法であるとの主張をするものではなく、従来の手法と併せながらも、グラフ屈折点の数学的解析により、より適切な検査閾値の再設定が行える可能性がある、との主張に留まるものであることは特記したい。

当初の計画は糖尿病専門医による歯科受診勧奨であったが、地域歯科医の協力もあって糖尿病患者の歯周病の特徴まで把握でき、さらには屈折点による新しい検査閾値の決定法（特願2018-148587）が生まれるなど、非常に有意義なプロジェクトとして現在も進展中である。

このような一連の研究を通して、歯科医が重症歯周病患者を診た際に、背後に糖尿病の存在を積極的に疑い、歯科医から内科医に円滑に紹介できるシステムの構築が望まれる。