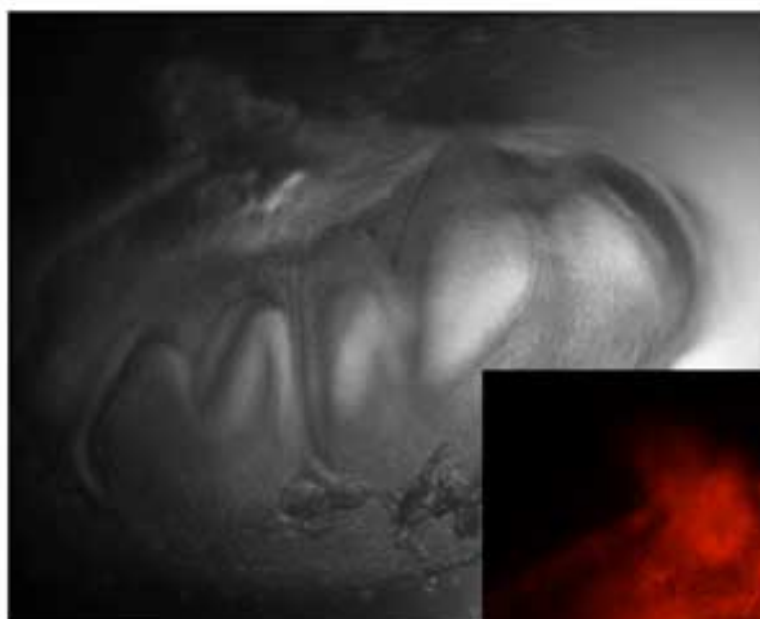




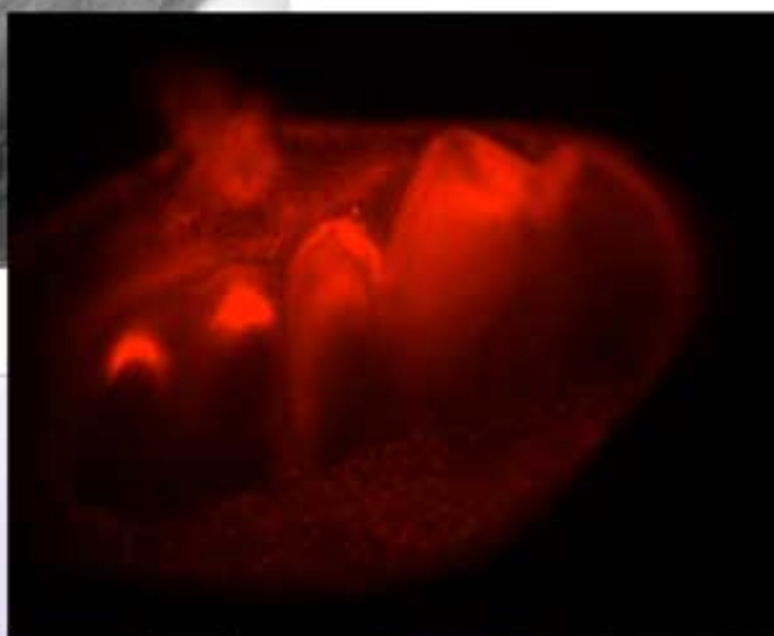
# 岩手医科大学・歯学部 オープンリサーチ・プロジェクト

Open Research Project 2007-2011  
Advanced Oral Health Science Research Center  
Iwate Medical University School of Dentistry

## 最終研究成果発表会



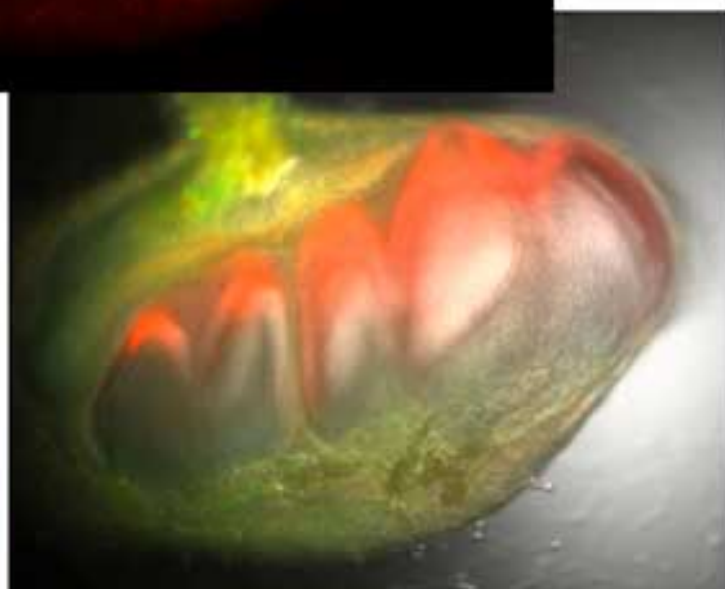
難治性歯科疾患克服に  
向けた  
cell therapyの基盤構築と  
dentistryの育成



2011 7/9 (Sat)  
9:00~18:30

岩手医科大学  
矢巾キャンパス  
中央棟 4階  
大会議室

参加費は無料です。  
詳しくは <http://dent-open.iwate-med.ac.jp/>





岩手医科大学歯学部オープン・リサーチ・プロジェクト  
研究成果発表会

プロジェクトテーマ：

「難治性歯科疾患克服に向けた cell therapy の  
基盤構築と dentistry の育成」

日 時：平成 23 年 7 月 9 日（土）午前 9 時～6 時半

場 所：岩手医科大学 矢巾キャンパス 本部棟 4 階 大会議室



# Program

09:20~09:30 開会の挨拶：歯学部長 三浦廣行

## 1<sup>st</sup> Session (座長 成石浩司 先生)

---

- 09:30~09:45 再生医療実現に向けた教育プログラムの開発と実践  
原田英光 (解剖学講座 発生生物・再生医学分野)
- 09:45~10:00 再生医療における患者報告型アウトカム評価方法の検討  
杉浦 剛 (口腔保健育成学講座 口腔保健学分野)
- 10:00~10:15 舌苔細菌叢と舌苔除去に関する研究  
岸 光男 (口腔保健育成学講座 口腔保健学分野)
- 10:15~10:30 組織再生に必要な脈管系の再生過程の検討  
藤村 朗 (解剖学講座 機能形態学分野)

10:30~10:45 *Coffee break*

## 2<sup>nd</sup> Session (座長 岸 光男 先生)

---

- 10:45~11:00 顎関節における組織の過形成に関する研究  
三上俊成 (病理学講座 病態解析学分野)
- 11:00~11:15 嗅覚系の機能発達と再生のメカニズム  
佐原資謹 (生理学講座 病態生理学分野)
- 11:15~11:30 間葉系幹細胞の分化を制御する因子の探索  
帖佐直幸 (生化学講座 細胞情報科学分野)
- 11:30~11:45 歯周組織再生に関わる環境因子と宿主細胞に対する作用  
木村重信 (微生物学講座 分子微生物学分野)
- 11:45~12:00 組織再生に及ぼす局所因子の影響  
佐々木 実 (微生物学講座 分子微生物学分野)

12:00~13:00 *Lunch*

3<sup>rd</sup> Session (座長 佐々木 実 先生)

---

- 13:00~13:15 再生医療の基礎としての自己溶菌酵素の同定と機能解析  
田村晴希 (薬理学講座 病態制御学分野)
- 13:15~13:30 IL-6 が歯髄細胞に与える影響  
八重柏 隆 (口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野)
- 13:30~13:45 IL-1ra-sgp130 融合蛋白による IL-1 および IL-6 誘導 VEGF  
産生抑制のリカバリー  
成石浩司 (口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野)
- 13:45~14:00 ナノ構造を有する次世代の口腔インプラントの開発  
武部 純 (歯科補綴学講座 冠橋義歯補綴学分野)
- 14:00~14:15 *Coffee break*

4<sup>th</sup> Session (座長 平 雅之 先生)

---

- 14:15~14:30 口腔内から採取された自家骨の細菌学的汚染度の検討  
近藤尚知 (歯科補綴学講座 口腔インプラント学分野)
- 14:30~14:45 ヒト下顎第三大臼歯を用いたヒトエナメル上皮細胞培養法の確  
立と再生歯胚への可能性  
間山寿代 (口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)
- 14:45~15:00 ラット口唇における癒痕組織形成のメカニズムの解明と口唇組  
織再生の検討  
若林香枝 (口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)
- 15:00~15:15 iPS 細胞を用いた歯胚再生への試み  
大津圭史 (先進歯科医療研究センター)
- 15:15~15:30 *Coffee break*

**5<sup>th</sup> Session** (座長 大津圭史 先生)

---

- 15:30～15:45 再生医療を目指した **HERS** 上皮鞘細胞株の樹立と歯根形成誘導因子の検索  
藤原尚樹 (解剖学講座 発生生物・再生医学分野)
- 15:45～16:00 歯科再生医療のための生体材料の開発と応用に関する研究  
平 雅之 (医療工学講座)
- 16:00～16:15 **bFGF** 徐放性材料を用いた骨再生モデルにおける骨再生と血管新生の検討  
杉山芳樹 (口腔外科学講座 歯科口腔外科学分野)
- 16:15～16:30 骨代謝評価方法としての **<sup>18</sup>F-FDG** を用いた **PET** の役割  
小豆島正典 (総合歯科学講座 歯科放射線学分野)

**Last Session** (座長 原田英光 先生)

---

16:30～ 総合討論

閉会の挨拶：先進歯科医療研究センター長 木村重信

## 再生医療実現に向けた教育プログラムの開発と実践

原田英光，大津圭史，藤原尚樹，石関清人，及川 愛

岩手医大 解剖学講座 発生生物・再生医学分野

### 【目的】

再生医療を歯科で普及させるためには技術開発と共にとリサーチマインドをもった歯科医師の育成が重要であると考えている。そこで、学部2年生向けの統合講義において「再生医学特論」を開講し、今年度で3回目となる。この講義は、基礎的歯科医学教育の意義や基礎的な研究が実際の臨床とどのように関わってくるのかを理解するとともに、リサーチマインドを育成するのが目的である。線維芽細胞成長因子-2の歯周組織治療薬開発なども含めた再生医療の現状から、数十年後の先端的歯科治療を思考するために必要な知識を学ぶアドバンス講義からなる。今回は、3年間にわたって実施してきたこの講義についての学生アンケートとこの講義コース終了後の試験結果を解析して、学生の知識の定着の程度とリサーチマインドの育成に対する効果を検討した。

### 【成果と考察】

再生医療に対して高い興味やその勉強の必要性を認識していると考えられ、将来の歯科医療を意識した前向きな姿勢を示している。一方で、勉強に意欲を持たない学生がいるのも否定できない。「再生医学特論」の講義については、学生自身がその必要性を感じているものの、実質的な学習態度に効果があったかは不明である。なぜならば、日常生活において科学的あるいは医療問題などについて積極的に情報を取り入れる学生は数が少なく、受け身的な学習態度で臨んでいる学生が大半である。ただ、基礎医学の重要性を認識してもらうという当初の目的については、多くの学生が理解したと答えており、講義の有用性は確認できた。再生医療のトピックに関するキーワードの認識は学生によって千差万別であるが、iPS細胞やES細胞など新聞やテレビでよく話題になる単語はほとんどの学生が知っている。しかし、サイナスリフトやティッシュエンジニアリングなどの多少専門的な言葉になるとその言葉さえ知らない学生がいることは知識の定着には至っていないと言える。興味の高い分野であってもその情報を積極的に自己学習に取り入れる必要性については、学生は意識していない。今後も基礎研究や先端医療といったアドバンス的な講義や実習が必要であると思われる。実質的な教育効果をどのように上げていくかは今後の課題であるが、3年めについては終了後に試験を実施したことによって自己復習した効果もあり、リサーチマインドの向上や知識の定着度は上がっていると考えられる。

### 【成果の概要】

1. 学生へ再生医学についての学習意欲の向上と理解を深めることができた。
2. 学生の再生医学に対する理解の現状を認識することができた。
3. 学生のリサーチマインド向上や知識の定着度に一定の効果が見られた。



# 再生医療における患者報告型アウトカム評価方法の検討

杉浦 剛, 相澤文恵, 岸 光男, 米満正美

岩手医大 歯 口腔保健育成学講座 口腔保健学分野

## 【目的】

これまで我々は口腔領域での医療的介入が QOL に及ぼす影響について検討すると同時にテキストマイニング手法による自由回答型テキストの数量化方法など、患者あるいは被験者からの報告に立脚したアウトカム評価の手法を検討してきた。その中で以下の3点について調査をおこなった。

- 1) 今後再生医療が普及した際には術後のメンテナンスが必要であることが予想されるため、本学予防歯科外来における定期歯科受診者の中断に関わる要因分析を行った。
- 2) インプラント治療は歯根膜再生の課題を有することから今後再生医療の発展によりさらに進歩が期待される臨床領域であるが、他の欠損補綴治療に比べ治療費が高額であるため、受療を希望しても実際に受療行動につながらない場合も少なくない。そこで、インプラント治療の受療行動につながる患者の意思決定要因を分析した。
- 3) 今後、本プロジェクトの成果を実用化するに当たり、再生医療を歯科で普及させるためには身近な医療技術として広めていく必要があると考え、「歯の再生医療」に対する認知度とイメージについて Web 調査を行った。

## 【成果と考察】

- 1) 定期歯科受診を中断した者は口腔関連 QOL が低く、受診継続期間が短い傾向にあった。また、決定木分析により、定期歯科受診に対し「安心」「気持ち良い」と感じている者は受診を継続する傾向がみられた。結果より定期歯科受診の継続には患者の主観的状态が影響することが示唆された。
- 2) インプラント治療の必要性について説明した後、治療を受けた者と受けなかった者について診療録の記載をもとに決定木分析を行った結果、義歯未使用の者がインプラント治療を受療する傾向にあった。一方、義歯使用者で定期健診を受診していない者は100%インプラント治療を受療しなかった。インプラントの受療行動には義歯使用経験と定期歯科受診行動が関連していると考えられた。
- 3) Web 調査の結果、「歯の再生医療」という言葉を知っている者は対象者の31%であった。「歯の再生医療」に対するイメージとして自由回答より「高額」「わからない」「良い」「不安」などの頻出語が抽出された。結果より、「歯の再生医療」に対する認知度はまだ低く、「高額で良いものだがどこか不安」という漠然としたイメージをもたれていると考えられた。

## 【成果の概要】

1. 定期歯科受診行動に関連する要因を分析することができた。
2. インプラント受療行動に関連する要因を分析することができた。
3. 「歯の再生医療」について一般の方の認知度、イメージが明らかとなった。

# 舌苔細菌叢と舌苔除去に関する研究

岸 光男, 阿部晶子, 米満正美

岩手医大 歯 口腔保健育成学講座 口腔保健学分野

## 【目的】

口腔細菌のコントロールは再生医療の成否に関わる要因のひとつである。これまで口腔細菌に関する研究は、口腔の二大疾患と呼ばれる齲蝕と歯周病のリスク要因である歯垢について検討されてきた。しかし、唾液や舌背をはじめとする粘膜表面は細菌が高密度に存在する場所があるにもかかわらず、とくに舌背に付着する舌苔細菌叢については検討がほとんどなされてこなかった。我々は、歯垢と舌苔には唾液を介した相互の影響があると考え、舌苔細菌叢における歯科疾患関連細菌の分布を検討した。また、歯周病罹患以前に口腔内に歯周病原性細菌が存在することは歯周疾患のリスク要因であると考えられるため、歯周病健全者に対する口臭測定を利用した非侵襲的かつ簡便な歯周疾患病原性定着予測モデルを考案することを目指した。さらに、口腔への齲蝕病原性細菌の定着についても検討し、これらにより、再生医療の術後メンテナンスにおける口腔細菌の新たな評価方法ならびにコントロール法の開発を目的とした。

## 【成果と考察】

85歳高齢者集団において舌苔から、PCR法により歯周病原性細菌を検出し、口腔内状況と比較したところ、無歯顎者では検出率が著明に低く、また、有歯顎者においても歯周ポケットがない場合には有意に検出率が低いことが認められた。また、歯周ポケットのない若年成人集団において、舌苔と歯垢の両方から歯周病原性細菌をPCR法で検出した結果、両検体からの検出には高い相関関係が認められた。さらに歯周病原性細菌検出の有無と口中気体VSC濃度にも高い相関があり、口臭測定という簡便かつ非侵襲的な検査により、口腔の歯周病原性細菌の早期定着を高い確率で予測することが可能であった。さらに、舌苔を専門的かつ機械的に除去する方法を開発した。その方法ではセルフケアに比べて舌苔の除去効率が高く、細菌数の減少も著明であることが確認できた。また、母親の唾液中 *Streptococcus mutans* と *S. sobrinus* を定量的PCR法により弁別定量し、子のミュータンスレンサ球菌の定着時期、齲蝕発生状況を検討した結果、母親の *S. mutans* と *S. sobrinus* のレベルがいずれも高い場合に子の定着時期が早くかつその後の齲蝕発生も多いことが確認された。

## 【成果の概要】

1. 高齢者において、舌苔の歯周病原性細菌分布と口腔内状況の関連を確認できた。
2. 歯周病健全な若年成人において、口臭を測定することで舌苔中と歯垢中の歯周病原性細菌の定着を予測することが可能であった。
3. 専門的な舌清掃がセルフケアに比べ口腔細菌の制御に有効である可能性を示した。
4. 母親の唾液中 *S. mutans* と *S. sobrinus* を弁別定量することで、子のミュータンスレンサ球菌早期定着を予測することが可能であった。

# 組織再生に必要な脈管系の再生過程の検討 —特に、排導系について—

藤村 朗

岩手医大 解剖学講座 機能形態学分野

## 【目的】

組織の再生には栄養供給を行う脈管系の再生（新生）が不可欠な要素となっている。そのため、血管系の研究は比較的行われているが、リンパ管構築についてはほとんど検索されていない。リンパ管は排導系の 10～20%を担っている構造であり、リンパ管吸収の停滞は組織に浮腫を起こす。組織再生の場における浮腫は栄養供給を含めた組織全体の環境の悪化につながることになる。環境の改善には再生組織独自の排導系を構築する必要がある。そこで、口腔諸臓器のリンパ管に関する微小循環、構築を明らかにし、リンパ管の再生やリンパ循環の再生を促す際の基礎データを作成することを目的としている。

## 【研究成果】

マウスを中心に口腔諸臓器の検索を進めている（岩手医科大学動物実験委員会承認 19-010）。また、ヒトを対象として、歯周外科手術の際の摘出歯肉から正常と考えられる部位のリンパ管構築を検索している。また、比較として全身の皮膚のリンパ管構築も検索した（岩手医科大学歯学部倫理委員会承認 01065、01098）。その結果、口腔粘膜下のリンパ管は皮下に比べて極めて細かな亀甲状網目構造を形成しており、この網目構造から粘膜下結合組織乳頭内に、皮下ではほとんど認められない盲端の派出が認められた。口腔粘膜の中では歯間乳頭歯肉のリンパ管構築が盲端の数が最も多かった。

## 【考察】

口腔領域におけるリンパ管構築では特に歯肉のリンパ管の盲端の形態が吸収効率の高いことを推測させるものであった。特に、歯間部は薬剤の設置には有効な形態であり、吸収効率が高く、薬剤投与部位としては有望な部位であると推測できた。今後は、リンパ管再生（新生）を促進することが報告されている各種 VEGF の分布状況を臓器ごとに明らかにし、その欠損部位での組織再生に必要な因子の投与方法を検索する必要がある。また、投与する因子の濃度調整、投与部位に限局した持続的投与方法が必要となり、そのためには諸因子の徐放化が必要である。現在、組織における貯留方法として、リポソーム化徐放剤の開発を進めており、この技術を応用することを検討している。

## 【成果の概要】

1. 口腔粘膜下は皮下よりリンパ管密度が高く、吸収効率が高いことが推測できた。
2. 歯肉粘膜下リンパ管構築は口腔粘膜の中でもリンパ管構築が密であった。
3. 歯間乳頭部歯肉のリンパ管構築は最もリンパ管の密度が高く、吸収孤立の高い形態を示していた。しかも、経粘膜薬剤の設置には有望な形態をしていた。

# 顎関節における組織の過形成に関する研究

三上俊成

岩手医大 病理学講座 病態解析学分野

## 【目的】

顎関節は組織学的に骨組織、軟骨組織、線維組織、関節液など多くの組織により構成され、形態的にも機能的にも他の関節に比べて複雑である。全身的原因あるいは局所的原因により結晶性関節炎が起こると、関節腔内に様々な結晶変性物が形成されて周囲組織は破壊され、また正常な組織再生が阻害されることもある。また一方では滑膜軟骨腫症のように顎関節を構成している組織がなんらかの原因で多量に過形成されることもある。これらのメカニズムはいずれも明らかではないが、詳細な症例分析を行うことでそれらの発症機序や調節因子を解明できれば、組織の破壊抑制、あるいは組織再生による修復の促進が可能になると考えられる。本研究では顎関節の結晶性関節炎で生じた石灰化物、滑膜軟骨腫症で形成された遊離軟骨について病理組織学的に解析し、それらの形成機序について検討した。

## 【成果と考察】

本プロジェクトのこれまでの研究成果として、顎関節に生じたピロリン酸カルシウム結晶(CPPD)沈着症でみられる結晶にはハイドロキシアパタイト(HAP)も含まれており、結晶の組成がCPPDからHAPへ経時的に変化していくことが明らかとなった。関節腔内に様々な結晶変性物が形成されて周囲組織は破壊されると、正常な組織再生が阻害されることもあったことが分かった。次に、顎関節に生じた滑膜軟骨腫症で手術により摘出された軟骨遊離体を観察することで、新たな遊離体は個々の遊離体が分割されていくことで形成され、数的に増殖していることが示唆された。また、関節洗浄で採取された滑液に含まれていた細胞成分を分析した結果、顎関節症と診断されていた患者の上関節腔から微細で幼若な軟骨組織が見つかった。滑膜軟骨腫症の典型例における軟骨遊離体と病理組織学的に比較した結果、軟骨組織は非常に微細であるが、他症例における典型的な遊離軟骨対と軟骨形成に関与するタンパクの発現が同じであることが分かった。

## 【成果の概要】

1. 結晶性関節炎において石灰化物が成熟していく過程が明らかとなった。
2. 滑膜軟骨腫症における遊離軟骨体の発生機序について新しい仮説が得られた。
3. 滑膜軟骨腫症における遊離軟骨体の成長過程を詳しく分析することができた。

# 嗅覚系の機能発達と再生のメカニズム

佐原資謹

岩手医大 生理学講座 病態生理学分野

## 【目的】

嗅覚は、嗅覚系と鋤鼻系の2つのシステムで情報処理がなされている。鋤鼻系はフェロモンなどの非揮発性の匂い情報処理に関与し、嗅覚系とは異なる独立した経路をもつ。受容体は鋤鼻器の鋤鼻上皮細胞に存在し、鋤鼻細胞は副嗅球の糸球体へ投射し、僧帽・房飾細胞とシナプスを作る。この糸球体の形成と機能発達の過程における、嗅細胞や鋤鼻細胞の中樞投射をコントロールするメカニズムを明らかにする目的で、遺伝子欠損マウスを用いた解析を行った。

## 【研究成果と考察】

マウスでは生後1週間前後で、鋤鼻細胞は副嗅球の糸球体において僧帽・房飾細胞とシナプスを形成する。この中樞投射をコントロールする要因が、ノルアドレナリン、BDNFなど神経活動に起因する物質なのか、Fezなどプログラムされた遺伝子によるものかを検索した。BDNF, sema 3F, neuropilin-2(nrp-2)など神経活動に起因する物質の遺伝子欠損マウスの副嗅球糸球体では、鋤鼻神経の投射、僧帽・房飾細胞とのシナプスに大きな変化が見られなかった。これに対して、zinc-finger 遺伝子の1つ Fez1 の遺伝子欠損マウスでは、鋤鼻神経の副嗅球への投射は見られるが、副嗅球糸球体の形成が見られず、僧帽・房飾細胞の樹状突起にも大きな変化がみられた。それにともない、糸球体を形成する中樞並びに末梢のグリア細胞のマーカーである、GFAP や S100 の分布様式にも変化が見られた。Fez1 は、zinc-finger 遺伝子の Fez 遺伝子ファミリーに属しており、Fez 遺伝子の欠損マウスでは、嗅球の糸球体の形成がみられず、大脳皮質の錐体細胞（皮質脊髄路細胞）の異常も報告されている。これらの事実を考え合わせると、Fez1 遺伝子は、鋤鼻神経が副嗅球の僧帽・房飾細胞の樹状突起とシナプスを形成する過程に働くことで、副嗅球糸球体の形成に関与していると考えられる。

## 【成果の概要】

副嗅球の糸球体においては、機能と形態的の両方が密接に関連してその形成が行われている。中でも、zinc-finger 遺伝子の Fez 遺伝子ファミリーの Fez1 遺伝子が重要な役割を果たすことを明らかにした。

## 間葉系幹細胞の分化を制御する因子の探索

帖佐直幸<sup>1</sup>, 大久保直登<sup>2</sup>, 西平宗功<sup>3</sup>, 高橋典子<sup>1</sup>, 長谷川智一<sup>4</sup>  
杉山芳樹<sup>3</sup>, 田中光郎<sup>4</sup>, 石崎明<sup>1</sup>

岩手医大 生化学講座<sup>1</sup>細胞情報科学分野分野,<sup>2</sup>医歯薬総合研究部門,<sup>3</sup>歯学部 口腔外科学講座 歯科口腔外科学分野,<sup>4</sup>口腔保健育成学講座 小児歯科学分野

### 【目的】

再生医療の実現化には間葉系幹細胞 (MSC) の増殖や分化を制御することが重要な課題となっている。近年、骨髄等から得られた MSC を骨や心臓などの再生医療に用いる試みが始められつつある。しかしながら、実際に骨髄中より採取した MSC を *in vitro* で培養すると採取後数週間で増殖・多分化能ともに激減する。そこで本研究では MSC の多分化能を維持するための培養法を確立することを目指し、MSC の分化を制御する新規因子の探索と機能解析を行う。

### 【成果と考察】

MSC を *in vitro* において培養する過程で発現量が大幅に変動する因子に着目し、分化制御因子としての可能性を検討した。具体的にはシステインリッチペプチド SCRG1 (scrapie responsive gene 1)、血管内皮細胞接着因子 VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) および R-cadherin (retinal-cadherin) の発現変動や発現制御機構が、MSC の性状にどのような影響を及ぼすのかについて解析した。

- 1) SCRG1: 骨分化に伴って減少する SCRG1 を骨髄由来 MSC に添加すると遊走能が促進された。また、SCRG1 は細胞外マトリックスの I 型コラーゲンやフィブロネクチンによく結合した。そこで、MSC の SCRG1 をノックダウンしてインテグリンの細胞内シグナル伝達分子である FAK のリン酸化を調べた結果、チロシンリン酸化の増加が認められた。
- 2) VCAM1: 骨髄由来 MSC を *in vitro* で培養すると細胞密度依存的に VCAM1 の発現が増加した。この VCAM1 の発現は PI3K、Src、PKC、IKK および PDGF 受容体の阻害剤で抑制され、さらに MSC の主要な細胞間接着因子である N-cadherin の dominant negative mutant の過剰発現によっても抑制された。また、VCAM1 の発現増加は MSC の遊走能を抑制した。
- 3) R-cadherin: 永久歯歯髄由来 MSC 様細胞は乳歯歯髄由来のそれと比較して R-cadherin の高い発現が認められた。永久歯歯髄由来 MSC 様細胞や R-cadherin を強制発現させた乳歯歯髄由来 MSC 様細胞は高い遊走能を示した。さらに、R-cadherin の過剰発現によって歯髄由来 MSC 様細胞または骨髄由来 MSC は骨や脂肪への分化が抑制された。

骨髄中に保持されている MSC は経血管的に各組織へとホーミングし、様々なサイトカインやケモカイン等の誘導によって適切な場へと遊走して分化を開始する。よって、遊走能の保持は MSC の多分化能を維持する上で重要なファクターであるといえる。本研究において MSC が分泌する SCRG1 が MSC の遊走を促進することが示された。また、MSC の細胞表面に発現する VCAM1 は遊走能を抑制し、一方、R-cadherin の発現増加は遊走能を促進することが示された。このことから SCRG1 や R-cadherin の発現は、MSC をより多分化能を保持した未分化な状態で維持する可能性が示唆された。

### 【成果の概要】

1. 細胞間接着因子である VCAM1 は細胞遊走能を抑制した。
2. MSC が分泌する SCRG1 や、細胞間接着因子である R-cadherin は細胞遊走能を促進した。
3. 遊走能を促進する SCRG1 や R-cadherin は、MSC の多分化能を維持する可能性が示唆された。

## 歯周組織再生に関わる環境因子と宿主細胞に対する作用

木村重信, 下山 佑, 石河太知, 平 雅之, 佐々木 実  
岩手医大 微生物学講座 分子微生物学分野

### 【目的】

口腔という場における組織再生では二つの環境を考慮する必要がある。一つは歯周組織のように再生すべき組織が口腔と連絡のある場合で、もう一つは顎骨再生のように連絡のない場合である。前者では、唾液中の細菌が容易に付着・感染し、組織再生に抑制的に働くとともに、それら細菌に由来する種々の成分、特に LPS などの病原因子が宿主細胞に作用し、炎症を惹起して組織の再生/再生誘導に影響を及ぼすと考えられる。また、歯科材料からの金属イオンも歯周組織再生に影響する局所の環境因子となる。本研究では、歯周組織再生に関わる局所の環境因子として慢性歯周炎の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* およびその内毒素 (LPS) ならびに歯科材料からの金属イオン (Ni イオン, Cu イオン, sub- $\mu$  Ti 粒子) を、宿主細胞として歯肉上皮細胞、マクロファージおよび間葉系幹細胞を用いて、その相互作用について検討した。

### 【研究成果と考察】

歯肉上皮細胞に対しては、*P. gingivalis* の全菌体および LPS (Pg-LPS) のいずれの刺激によっても炎症性サイトカインの産生とともに自然免疫因子 (分泌型白血球プロテアーゼインヒビター) の産生が増強された。しかし、歯周炎病巣への細菌侵入が少ないことを勘案すると、歯周組織再生に関わる細菌性因子としては LPS が主体であることが示唆された。Pg-LPS は大腸菌由来の LPS (Ec-LPS) と比較して Schwartman 反応などの内毒素活性が低いことが示されている。しかし B 細胞に対する増殖活性、サイトカイン産生について検討した結果、Pg-LPS は (Ec-LPS 同様) 細胞内チロシリン酸化経路を介して有意の活性を示すことが明らかとなった。つぎに、マクロファージに対する LPS と金属イオンの作用について検討した結果、マクロファージに対し LPS は炎症性サイトカインおよび NO 産生を誘導することが明らかとなった。Ni イオンも単独で同作用を示したが、Ni イオン存在下では LPS のマクロファージ活性化が増強された。しかし、Cu イオンは高濃度でマクロファージに対して脂質損傷作用を示し、細胞内泡沫 (泡) 化現象を誘導した。一方、間葉系幹細胞に対しては、LPS は細胞増殖を起こさないと報告されているが細胞分化は誘導することが示唆された。また、Ni イオンは単独で間葉系幹細胞に対して細胞分化作用を示すことが示唆された。以上の研究結果から、歯周病原性細菌の病原因子や歯科材料として多用される金属イオンといった局所の環境因子によって歯周組織再生が大きく影響されることが強く示唆されたことから、口腔という「場」での組織再生、特に歯周組織再生では様々な局所の環境因子についても考慮する必要があることが明らかとなった。

### 【成果の概要】

1. 歯周組織では歯周病原性細菌の病原因子により免疫反応が誘導されているが、金属イオンの存在により増強される可能性が明らかとなった。
2. 歯周病原性細菌の病原因子、金属イオンは、間葉系幹細胞に対しても単独あるいは関連して作用することが明らかとなった。

## 組織再生に及ぼす局所因子の影響 -口腔レンサ球菌のFbp62の組織付着活性と病原因子としての役割-

佐々木 実, 古玉芳豊, 下山 佑, 木村重信  
岩手医大 微生物学講座 分子微生物学分野

### 【目的】

歯周疾患罹患歯の歯周組織再生に際し、患部への唾液の侵入はさけ難く、唾液タンパク質による被覆とそれに続く唾液中の細菌の定着が結合組織性付着に先立って起こるものと考えられる。このことは、*in vitro* の無菌状態下で認められた生体吸収性材料による再生誘導が、実際の歯周組織欠損部においては得られない可能性を示唆するもので、歯周組織再生誘導療法の成否に関わる問題である。しかし、現時点では、口腔細菌の定着メカニズムと定着状況、定着に関わる細菌間相互作用、さらに細菌と宿主細胞間の相互作用などに関して不明な点が数多く残されている。本研究では、口腔レンサ球菌のフィブロネクチンに対する結合タンパク質 (Fbp) の遺伝子 (*fbp62*) を単離しその性状を検討した。また、*Streptococcus anginosus* リコンビナント Fbp62 および抗 Fbp62 抗血清、*fbp62* の欠失変異株を作製し、上皮細胞ならびにフィブロネクチンに対する付着活性を検討した。

### 【成果と考察】

*S. anginosus* Fbp62 遺伝子をジーンウォーキング等の手法により単離したところ他のレンサ球菌種のそれと高い相同性が認められた。さらに Fbp62 の CDS を pGEX-4T-2 にクローニングして得られたリコンビナントタンパク質は、フィブロネクチンに対して付着活性を示した。また、Fbp62 をウサギに免疫して得られた抗血清は *S. anginosus* のフィブロネクチンおよび上皮細胞に対する付着を阻害した。*fbp62* の欠失変異株のフィブロネクチンおよび上皮細胞に対する付着は親株 (*S. anginosus* NCTC 10713) に比べ有意に低かった。以上の成績より、*S. anginosus* の Fbp62 はフィブロネクチン付着活性を有し、上皮付着因子として機能していること明らかとなり、歯周組織再生において局所因子として影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 【成果の概要】

1. 口腔レンサ球菌がフィブロネクチン結合タンパク質、Fbp62、を保有していることが明らかとなった。
2. 口腔レンサ球菌は Fbp62 をリガンドとし、上皮細胞に付着することがあきらかとなった。
3. 口腔レンサ球菌の Fbp62 は本菌の組織定着における局所因子として働き、歯周組織再生療法に影響を及ぼす可能性が示唆された。



# 再生医療の基礎としての自己溶菌酵素の同定と機能解析

田村晴希

岩手医大 薬理学講座 病態制御学分野

## 【目的】

再生医療を確実に施術するためには病原性細菌に対する感染制御が重要であり、病原性細菌を選択的に除菌できれば、再生医療を成功に導くことができると考えられる。

*S. mutans* の自己溶菌酵素 At1A はムラミダーゼ活性を示し、*S. mutans* と *S. sobrinus* を特異的に溶菌するが、*S. sanguis* は溶菌しないという溶菌活性の菌種特異性が報告され、同酵素を利用したう蝕原性細菌の除菌システムが提案されている。そこで、口腔レンサ球菌の自己溶菌酵素を比較検討することで、同酵素を母体とした口腔内病原性細菌溶菌酵素の開発につなげることを最終目標として研究を進めてきた。

## 【成果と考察】

*S. sobrinus*, *S. downei*, *S. criceti* の3菌種から自己溶菌酵素 (Atlg, Atlh, Atla) をコードする遺伝子を新規に同定した。自己溶菌酵素遺伝子欠失株を作製できた *S. mutans* と *S. downei* では、同遺伝子産物が菌体分離とバイオフィーム形成に関与していることが明らかとなった。次に、*S. mutans* の血清型 *c/e/f* の各菌株について、自己溶菌酵素遺伝子の塩基配列を決定したところ、良く保存されており、C 末側に酵素ドメインがあることがわかった。さらに Atla の酵素ドメインについて *Streptomyces coelicolor* cellosyl のタンパク質立体構造をもとにホモロジーモデリング法で構造解析を行ったところ、Atla の酵素ドメインは  $\alpha$ -ヘリックス ( $\alpha$ 1-5) と  $\beta$ -ストランド ( $\beta$ 1-4) から構成され、cellosyl の TIM バレル様構造と異なることがわかった。また、活性中心周辺のアミノ酸残基を置換させた Atla 変異体の溶菌酵素活性への影響を検討したところ、655 位と 747 位のアスパラギン酸残基が酵素活性に重要であることを明らかにした。次にフィブロネクチンとの結合について調べると、At1A は結合するが、Atla は結合しないことがわかった。このように自己溶菌酵素はムラミダーゼ活性をもつ酵素でありながら、それぞれの菌種で異なる性質を有していることが示唆された。これらの成果をもとに、*S. mutans* に加えて、*S. anginosus* などの他菌種を視野に入れた溶菌酵素を開発することが今後の課題である。最後に菌株を快く分譲して下さった九州大学の山下喜久先生と柴田幸江先生に感謝致します。

## 【成果の概要】

1. *S. sobrinus*, *S. downei*, *S. criceti* の自己溶菌酵素をコードする遺伝子を新たに同定した。
2. Atla 酵素ドメインの立体構造を予測し、655 位と 747 位のアスパラギン酸残基が酵素活性に重要であることを明らかにした。
3. At1A はフィブロネクチンと結合するが、Atla は結合しないことがわかった。

## IL-6 が歯髄細胞に与える影響

八重柏 隆, 藤原英明, 成石浩司

岩手医大 歯 口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野

### 【目的】

歯髄は、齲蝕や外傷などによって炎症が発症すると、インターロイキン (IL) -1, IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$ などの炎症性サイトカインが複雑にネットワークを形成することが知られている。我々はこれまでに歯髄細胞の nodule 形成とアポトーシスの関係や IL-6 が培養歯髄細胞の FGF-2 発現に与える影響等について検討した。今回、我々は歯髄炎の増悪機序の一端を解明するために、培養歯髄細胞を用いて齲蝕関連細菌による IL-6 シグナル関連分子の産生性と IL-6 による VEGF 産生性について検討した。

### 【成果と考察】

岩手医科大学附属病院歯科医療センター保存科を受診した患者より治療上の理由で抜去された歯から、採取・分離し、4-9 代継代培養した培養歯髄細胞を実験に供した。実験の対照として同条件下で培養した歯根膜細胞を供した。歯髄細胞および歯根膜細胞における IL-6 刺激伝達を調べるため、各々の培養細胞に IL-6 (10 ng/ml), IL-6+sIL-6R (各 10 ng/ml) および sIL-6R (10 ng/ml) を 10 および 60 分間作用させた後、MAPKs (ERK1/2) のリン酸化の程度を調べた。また歯髄細胞を IL-6 (10 ng/ml), IL-6+sIL-6R および sIL-6R (10 ng/ml) で刺激し、24 および 48 時間培養した後、ELISA 法で VEGF 産生量を定量した。また歯髄細胞を *Streptococcus mutans* Xc (*S. mutans*) 粗抗原によって 0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml の濃度で刺激し、24 および 48 時間培養した後、培養上清を回収し、ELISA 法で IL-6, sIL-6R および可溶性 gp130 (sgp130) の産生量を定量した。その結果、歯髄細胞では、IL-6 単独で MAPK (ERK1/2) のリン酸化が誘導された。さらに sIL-6R の添加によって、IL-6 による MAPK のリン酸化が増強した。一方、歯根膜細胞では、IL-6 による MAPK のリン酸化は sIL-6R の添加時のみ誘導された。歯髄細胞では、IL-6 単独で VEGF 産生が誘導された。さらに sIL-6R の添加によって、IL-6 による VEGF 産生性が亢進した。一方、歯根膜細胞では、IL-6 による VEGF 産生は sIL-6R の添加時のみ亢進した。*S. mutans* 粗抗原の刺激では、歯髄細胞の IL-6, sIL-6R および sgp130 の産生性は誘導されなかった。

歯髄細胞は、歯根膜細胞とは異なり、IL-6 単独で細胞内シグナル伝達系が活性化される特徴を有することが示された。一方、歯髄細胞は、*S. mutans* 粗抗原刺激によって IL-6, sIL-6R および sgp130 を産生しなかった。これら歯髄炎症における IL-6 シグナル関連分子の由来については、更なる歯髄炎の病態研究の進展が必要であると考えられた。

### 【成果の概要】

1. 歯髄石灰化現象にアポトーシスは密接な関係があることが示唆された。
2. IL-6 は歯髄細胞による FGF-2 産生を抑制することが明らかとなった。
3. IL-6 は歯髄細胞による VEGF 産生を誘導することが明らかとなった。

# IL-1ra-sgp130 融合蛋白による IL-1 および IL-6 誘導 VEGF 産生抑制のリカバリー

成石浩司, 澤田俊輔, 藤原英明, 伊東俊太郎

岩手医大 歯 口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野

## 【目的】

Angiogenesis は、骨折部位や歯槽骨吸収部位などに期待される組織再生の起始現象として重要である。また血管内皮増殖因子 (VEGF) は、線維芽細胞などの細胞から産生されるサイトカインであり、強力な angiogenesis の促進作用を持つ。一方、炎症性サイトカイン IL-1 や IL-6 は、線維芽細胞の VEGF 産生性を制御することが知られる。本研究の目的は、歯肉由来線維芽細胞を標的として、IL-1 や IL-6 のアンタゴニスト IL-1ra および sgp130 の融合蛋白を合成し、それぞれのサイトカイン刺激によって制御される VEGF 産生性を人為的に操作することで、組織再生へのベクトルに向かわせることが出来るかどうかを検討することである。

## 【成果と考察】

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE7T13 より得られた RNA を鋳型として IL-1ra の全長および gp130 の可溶性ドメインを RT-PCR で増幅し、それぞれの cDNA を得た後、IL-1ra-sgp130 発現ベクターを構築した。なお、1. 大腸菌による発現系では、ジスフィルド結合の形成ができないために不溶性となるタンパクが存在する、2. 接着 HEK293 よりも数十倍のタンパク発現能力を有する、3. 哺乳動物由来の細胞を用いることによって組換えタンパク質がより生体内に近い生理活性を保持する、という理由から、融合蛋白の大量発現系には、浮遊 HEK293 細胞を用いた。

IL-1ra-sgp130 融合蛋白を歯肉線維芽細胞に作用した後の細胞障害作用を MTT 法によって調べたところ、100 ng/ml までは概ね細胞の増殖活性に影響を及ぼさなかった。さらに、歯肉線維芽細胞を IL-1 および IL-6+sIL-6R で刺激すると、VEGF 産生は抑制された。また、その実験系に IL-1ra-sgp130 融合蛋白を添加すると、VEGF 産生性はベースレベルにまでリカバリーされた。このことから、新規に合成した IL-1ra-sgp130 融合蛋白は、IL-1 および IL-6+sIL-6R の刺激を同時に遮断できる可能性が示唆された。さらに VEGF 産生の抑制をリカバリーできたことは、IL-1ra-sgp130 融合蛋白は、炎症性サイトカインを広くブロックして、組織再生を誘導するサイトカインネットワークの構築に貢献し得るものと期待される。

## 【成果の概要】

1. IL-1ra-sgp130 融合蛋白を合成した。
2. IL-1ra-sgp130 融合蛋白による細胞障害作用が現れない適正濃度を決定した。
3. IL-1ra-sgp130 融合蛋白は、IL-1 および IL-6+sIL-6R 誘導 VEGF 産生の抑制をベースレベルにまでリカバリーした。

# ナノ構造を有する次世代の口腔インプラントの開発 -陽極酸化・水熱処理チタンインプラントの骨伝導能に関する評価-

武部 純

岩手医大 歯 歯科補綴学講座 冠橋義歯補綴学分野

## 【目的】

生活の高質化・多様性、社会の高齢化に伴い、Quality of life (QOL)を高めるような歯科医療が求められている現代においては、補綴歯科治療に要求される内容も変化してきている。口腔内の歯列や歯周組織の状態は、年齢・性別・社会環境などにより多様な変化を呈しているため、老齢期にいたるまでのライフサイクルを考慮した治療方針の設定が求められている。口腔内環境に調和して改善された歯周組織、顎口腔環境に調和した補綴装置が長期的に機能するためには、歯列や歯周組織の健康を維持するための徹底した口腔管理が必須となる。生活機能をいかに維持・改善するかが健康の本質となり、加齢にともなう健康維持・増進には顎口腔諸組織が安定した状態にあるとともに十分な咀嚼能力で“食べることの楽しみ”を維持することが重要である。そこで、本プロジェクトは、全身の健康とも関連する口腔の健康へ寄与する歯科医療を実践することにより、高機能生体材料としての口腔インプラント表面処理法の研究に焦点を当て、それらの開発と評価を行ったので報告する。

## 【成果と考察】

インプラント埋入後の治癒期間の短縮や骨質の劣る部位での生着率向上による適応範囲拡大を目的に、インプラント表面性状に関する研究を行ってきた。純チタン表面に放電陽極酸化・水熱処理を行うことで、ナノ構造を有する陽極酸化被膜上に HA 結晶を析出させる表面処理法(SA 処理)の開発に携り、骨伝導能のメカニズムを分子細胞レベルから解析してきた。ナノ構造と HA 結晶を有する表面性状が骨芽細胞の増殖・分化能を促進させていることを確認した。また、インプラント埋入後の創傷治癒過程の初期に出現するマクロファージに着目し、マクロファージが接触・付着・伸展することで表現形質が影響を受け BMP<sub>2</sub>が発現されることを確認した。SA 処理チタンの表面性状により、biological な現象が起こることで細胞分化が促進され早期に骨形成が行われることが示された。これらのことは、Bioinert と Bioactive の性質を兼ね備えた本表面処理法は、次世代の口腔インプラントとして有用であることを示唆するものである。

## 【成果の概要】

1. 純チタン表面に放電陽極酸化・水熱処理を行うことで、HA 結晶の析出の他、陽極酸化被膜はナノ構造を有していることが確認された。
2. 陽極酸化・水熱処理チタンインプラントの表面性状は骨芽細胞の増殖・分化を促進させ、さらにマクロファージの表現形質に影響を与えることが確認された。

# 口腔内から採取された自家骨の細菌学的汚染度の検討

丸尾 勝一郎, 近藤尚知

岩手医大 歯 歯科補綴学講座 口腔インプラント学分野

## 【目的】

インプラント治療は、その普及に伴い欠損補綴の重要な選択肢の一つとなりつつあるが、骨量が不足する症例も少なくない。近年さまざまな骨補填材が開発されているが、いまだに自家骨移植が骨造成法のゴールドスタンダードであると考えられている。外科的侵襲をできるだけ小さくするために、口腔内から骨採取を行う機会が増加している。しかし、口腔内から採取した自家骨が唾液の混入等により細菌学的に汚染され、その結果術後感染を起こすこともある。そこで本研究においてわれわれは、ブタ下顎骨より採取した削片骨を意図的に唾液中に汚染させ、異なる量の生理食塩水で洗浄しその細菌の減少率および骨残存率を調べた。また、骨量が十分にあるインプラント手術の 20 症例において、インプラント埋入窩形成時にフィルターを装着した吸引装置を用いて集めた削片骨の細菌による汚染を調査し、さらに生理食塩水による洗浄効果も合わせて検討した。

## 【成果と考察】

今回採取した削片骨中の細菌数は、60～1240(cfu/ml)であった。この際検出された細菌は、 $\alpha$  - Streptococcus , Streptococcus 属, Neisseria 属, S.epidermidis 等のいわゆる口腔内常在菌であった。また、採取骨群に比べ洗浄骨群はすべての症例において、著しく減少しており、細菌数の減少率は 52%～100%であった。

口腔内から手術中に吸引装置を用いて採取した骨は、細心の注意を払っていても細菌に汚染されていることがわかった。しかし、この削片骨を生理食塩水で洗浄することで著明に細菌数を減少させることができることが明らかになり、このことにより手術後の感染等の合併症を防止できることが示唆された。今後、さらに有効な洗浄法についての検討をおこなう予定である。

## 【成果の概要】

1. 術中に吸引装置を用いて採取された削片骨は細菌に汚染されていることがわかった。
2. 異なる量の生理食塩水で洗浄することにより、骨残存率に差が認められた。
3. 汚染された削片骨を生理食塩水で洗浄することにより細菌数を減少させることができた。

# ヒト下顎第三大臼歯を用いたヒトエナメル上皮細胞培養法の確立と再生歯胚への可能性

間山寿代<sup>1</sup> 原田英光<sup>2</sup> 藤原尚樹<sup>2</sup> 三浦廣行<sup>1</sup>

岩手医大 <sup>1</sup>歯 口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野

<sup>2</sup>解剖学講座 発生生物・再生医学分野

## 【目的】

小児・矯正歯科では永久歯の先天欠如を伴う不正咬合が少なくなく、これらの患者にとって歯の再生は夢の治療法である。しかし、歯の再生に関するこれまでの報告の多くはヒト以外の動物細胞を用いており、ヒト細胞では歯髄や歯根膜、脱落した乳歯から間葉系幹細胞は発見されているものの、エナメル上皮細胞は分離が難しく、十分な上皮幹細胞が得られにくい。将来的に患者さんへの歯の再生治療を目指すためには、ヒト細胞による、組織工学的に作製された歯、bio-tooth（再生歯胚）を実証する必要がある。

細胞を用いた歯の再生技術の確立に必要なのは、まず第1に組織から上皮系幹細胞と間葉系幹細胞を分離することであり、第2にその幹細胞を培養して増殖させ、最終的に移植により歯を再生させることである。従って、歯の上皮幹細胞の分離・同定と細胞の培養技術を確立させることは歯の再生技術を臨床応用するうえで重要である。そこでヒトbio-toothの作製を目的に、ヒト下顎第三大臼歯歯胚から上皮細胞を分離し培養する技術の開発を行い、さらにそれらの細胞と間葉細胞を再結合させ SCID マウスに移植しヒトbio-toothの作製の可能性について検討した。

## 【成果と考察】

最初にヒトエナメル上皮細胞に適した無血清培養方法を決定し、その条件下で間葉細胞の培養と上皮細胞のコロニーが形成されるのを確認した。この時期の下顎第三大臼歯は幹細胞を含む未分化な間葉細胞や上皮細胞が多く存在していると考えられ、エナメル質形成以前の歯胚を用いることにより内エナメル上皮中の未分化な上皮系細胞をエナメル芽細胞へ誘導できる可能性も高いと考えられた。また、摘出したヒト下顎第三大臼歯について染色を行った結果、歯胚と口腔粘膜上皮の間には残存する歯堤上皮が認められ、この上皮には上皮幹細胞マーカーの一つであるp63などが発現していたことから、ヒト歯原性上皮幹細胞の供給源として有効であることが示された。さらに、培養した上皮細胞と間葉細胞を再結合してSCIDマウスに移植した結果、それらの上皮が蕾状期歯胚様に成長することを認めたことから、ヒトエナメル上皮細胞が、歯の再生療法への適応が期待できることが示され、将来的に全てヒト細胞によるbiotoothの作製が期待できることが示唆された。

## 【成果の概要】

1. エナメル上皮細胞を分離培養することができた。
2. ヒト下顎第三大臼歯歯胚はヒト歯原性上皮幹細胞の供給源として有効であることが示された。
3. 将来的に全てヒト細胞によるbiotoothの作製が期待できることが示唆された。

# ラット口唇における癒痕組織形成のメカニズムの解明と 口唇組織再生の検討

若林香枝<sup>1</sup>, 間山寿代<sup>1</sup>, 坂東三史<sup>1</sup>, 藤原尚樹<sup>2</sup>, 大津圭史<sup>3</sup>  
原田英光<sup>2</sup>, 三浦廣行<sup>1</sup>

岩手医大<sup>1</sup> 歯 口腔保健育成学講座歯科矯正学分野, <sup>2</sup>解剖学講座 発生生物・再生医学分野, <sup>3</sup>先進歯科医療研究センター

## 【目的】

唇顎口蓋裂患者では生後3か月前後に口唇形成術が、1歳頃には口蓋形成術が施行される。しかし術後、創部は癒痕組織を形成し、上顎骨の成長抑制や上顎前歯の舌側傾斜など顎発育の不調和や反対咬合などの不正咬合を惹起する要因となる。特に口唇の癒痕組織は人中付近に比較的明瞭に残存するため、患者に与える心理的影響も大きい。唇顎口蓋裂患者の抱える様々な形態的、機能的、心理的問題の解決のため、主に口唇における癒痕組織形成のメカニズムを解明していくとともに、口唇組織を再生するための技術開発を目的としている。

## 【成果と考察】 (今後の研究計画)

現在、6週齢雄性 Wister 系ラット口蓋に組織欠損を形成した段階にあり、今後再生過程で形成された組織について光学顕微鏡による観察、免疫組織学的観察ならびに *in vivo* イメージングシステムによる観察を行う予定である。さらに口唇組織についても同様の観察を行うため、ラットの口唇に人工的に組織欠損を形成して、その修復ならびに再生過程の実験モデルを作成する。口唇と口蓋のそれぞれにおける癒痕組織形成の差異について検討を行うとともに、口唇と口蓋の癒痕組織あるいは組織欠損部位に様々な増殖因子を投与し、その有効性について検討を行う予定である。

口唇の組織欠損部位に対する増殖因子の投与に対する効果としては、筋線維芽細胞の減少や血管内皮細胞の増殖促進活性の増加などが生じることが考えられ、これらは口蓋のそれとは明らかに異なることが推測される。また口唇は他の組織に比較して毛細血管や筋線維に富み、骨の裏打ちのない組織であることから、口唇組織の再生には筋組織の再生を含む十分量の結合組織が必要となる。そのためスキャホールド（細胞の足場となる材料）と増殖因子の組み合わせが重要な鍵となると考えられる。

## 【成果の概要】

1. 口唇における癒痕組織形成および創傷治癒過程をより詳細に観察する。
2. 癒痕組織形成に対する様々な増殖因子の有効性について検討する。
3. 将来的には口唇の再生を誘導するような薬剤の開発や手術方法の改良に寄与する。

## iPS 細胞を用いた歯胚再生への試み

大津圭史<sup>1</sup>, 藤原尚樹<sup>2</sup>, 原田英光<sup>2</sup>

岩手医大<sup>1</sup> 先進歯科医療研究センター, <sup>2</sup>解剖学講座 発生生物再生医学分野

### 【目的】

歯の再生研究においては、マウス切歯形成端 (apical bud)、胎生期歯胚、ヒト乳歯歯髄、歯根膜などに幹細胞が存在していることが示されており、これらの細胞などを組織工学技術と組み合わせることにより実際に歯を作り出せることが報告されている。しかしながら、ヒトの歯の再生を考えた場合、胎生期の歯胚を用いることは不可能であり、また歯胚再生に十分な数の幹細胞を歯髄、歯根膜から獲得することは困難である。この問題を解決するために本プロジェクトでは、成体組織から樹立して多分化能を持つ iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) から歯胚上皮、間葉系細胞への分化誘導法を確立させ、人工的に歯胚を作り出す歯の再生療法の開発を目指した。

### 【成果と考察】

我々は理化学研究所バイオリソースセンターから、京都大学、山中伸弥教授のグループが樹立した iPS 細胞の分与を受け、研究をスタートさせた。はじめに、未分化 iPS 細胞が歯胚細胞からの分化シグナルを受け取り、歯を構成する細胞に分化するかどうかを、歯胚細胞との組み合わせ移植実験にて検討した。その結果、未分化 iPS 細胞はエナメル芽細胞や象牙芽細胞に分化して歯胚に成長することを示したが、その歯胚形成率は非常に低いことがわかった。そこで次に iPS 細胞から歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞に類似した分化度の細胞を獲得することを目的として、1) iPS 細胞が形成する奇形腫中に含まれる歯胚上皮、間葉細胞の探索と、2) *in vitro* における神経堤様細胞へ分化誘導する技術の開発を行った。その結果、形成中の奇形腫内には上皮幹細胞マーカーである p63、歯胚上皮マーカー CK14、象牙芽細胞マーカー nestin 陽性の細胞の存在が認められた。また、iPS 細胞凝集塊 (スフェロイド) を神経堤細胞分化培地で培養したところ、ほとんどの細胞が神経堤様細胞に分化し、その細胞は歯原性上皮細胞との相互作用により歯原性間葉細胞、更には象牙芽細胞に分化ことが示された。以上の結果から、iPS 細胞が歯の再生に有用な細胞ソースになり得ることが示唆された。

### 【成果の概要】

1. iPS 細胞が歯の細胞へ分化する能力を有していることがわかった。
2. iPS 細胞由来奇形腫の中に歯原性細胞となりうる細胞が含まれていることが分かった。
3. 歯原性間葉細胞の起源となる神経堤細胞を iPS 細胞から分化誘導する方法を確立した。



# 再生医療を目指した HERS 上皮鞘細胞株の樹立と歯根形成誘導因子の検索

藤原尚樹<sup>1</sup>, 大津圭史<sup>2</sup>, 原田英光<sup>1</sup>

岩手医大<sup>1</sup>解剖学講座 発生生物・再生医学,<sup>2</sup>歯科先進医療研究センター

## 【目的】

歯の発達は歯原性上皮と間葉のクロストークによって行われることが知られる。歯冠形成期にみられるこれらの上皮間葉相互作用においては機能する遺伝子やタンパクについて既に多くの報告がある。しかし、インプラントに代わる未来の歯の再生医療を考えた場合、歯根形成を誘導する因子の探索と歯根形成過程を効果的に研究できる実験系を確立することは極めて重要である。本プロジェクトでは器官培養系に加え、外因性因子に対する直接的な反応を観察できる細胞株の樹立を行い、これを生体内で起こる再生過程を再現できる移植実験系を組み合わせた、システマティックな実験系を構築するとともに、歯冠形成期から歯根形成期への移行過程の調節に関わる因子を明らかにすることを旨とする。

## 【成果と考察】

我々はヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) 細胞を ddY mouse 下顎第一臼歯歯胚より単離し、その不死化細胞株の樹立に成功した。我々はこの培養系、免疫不全マウスへの臼歯の他家生体移植実験系と歯冠形成期から歯根形成期の移行期の歯胚発達を観察することができる器官培養系を組み合わせることにより、HERS 細胞株、HERS 組織、そして歯根形成全体への影響について検討する実験系を確立した。これらを用いて外因性タンパクの影響について検討した結果、上皮成長因子(Egf)、肝細胞成長因子(Hgf)、あるいは天然低分子化合物である harmine が歯根形成を調節することを明らかにした。歯冠形成期から歯根形成期の移行期に器官培養系に投与された Egf は星状網細胞の細胞増殖を促進して HERS の形成を阻害し、歯冠形成を継続した。一方で Hgf と harmine は歯根形成初期の HERS 細胞の増殖を促進することでその形成や歯根伸長を促進するとともに、歯周組織の発達にも促進的な作用を示した。我々の結果は歯根形成や再生の促進因子として、また歯根未完成歯における根尖閉鎖や、短根歯の歯根形成を促進する治療薬として Hgf や Harmin の可能性を示唆する結果であると考えている。

## 【成果の概要】

- 1, ヘルトヴィッヒ上皮鞘由来の細胞株を樹立し、新たな実験系を確立した。
- 2, EGF は歯冠形成から歯根形成期の移行期に作用することで歯冠形成を持続する作用があることが明らかとなった。
- 3, Hgf と harmine は歯根伸長ならびに、歯周組織の発達において、促進的な作用を示した。

# 歯科再生医療のための生体材料の開発と応用に関する研究

平 雅之

岩手医大 医療工学講座

## 【目的】

(1) 顎骨再建では自家骨の利用が第一選択であるが、患者にとって侵襲が大きいいため、骨伝導能を有する骨補填材（人工骨）の新規開発が望まれている。本研究では、Type I コラーゲン（溶液）を化学架橋によって不溶・スポンジ化し、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液に交互浸漬して表面にアパタイト結晶を析出させた後、プレス加工して高密度の骨補填材を調製し、骨伝導能を調べた。

(2) 成長因子を DDS 基材に担持させて欠損部に埋入すると、成長因子が DDS 基材の生分解に伴い徐放されて組織再生を誘導させる。成長因子の他、薬剤の徐放も可能である。b-FGF を徐放させると血管新生を促進し、トリアムシノロンアセトニドは血管新生を阻害する。本研究では、これら両因子を用いて角膜内への血管新生に及ぼす影響を評価した。

(3) 骨髄から幹細胞を分離回収するためには磁性材料の利用が有効である。本研究では、サブミクロンサイズの COOH 基付き磁性ビーズを活性化エステル化し、ストレプトアビジンを結合させることによって細胞捕集用磁性ビーズとした。ビオチン標識 1 次抗体でラベルしたターゲット細胞を試作磁性ビーズで捕集し細胞回収効率に検討を加えた。

## 【成果と考察】

(1) プレス体は SEM/EPMA、TF-XRD と FTIR 分析からアパタイト・コラーゲン複合体であることが確認された。兎の頸骨骨膜下への埋入実験からプレス体は優れた骨伝導能を有する骨補填材に利用可能なことが確認された。アパタイトの存在が破骨細胞の遊走、増殖と分化に有効であり、骨リモデリングを効果的に誘導することが明らかとなった。調製した複合体は口唇口蓋裂の治療等に有効と考えられた。今後、コラーゲンの化学架橋に用いたグルタルアルデヒドをより安全性の高いカルボジイミドに替えること等が期待された。

(2) 架橋酸性ゼラチンは b-FGF の徐放に効果的であり兎眼の角膜への血管新生を誘導した。ポリ乳酸はトリアムシノロンアセトニドの徐放に効果的であり兎眼の角膜への血管新生を強力に阻害した。血管新生の制御 (On/Off) は組織再生の誘導に重要であり、今後、この基材と成長因子・薬剤の組合せを口腔組織の再生誘導に応用することが期待された。

(3) 試作磁性ビーズを用いて単球の株化細胞株 THP-1 の高効率細胞回収に成功した。マウス骨髄からも間葉系幹細胞の回収を試みた。後者の幹細胞では回収後の細胞生存率が低かったため、今後、操作時間の短縮や培養条件の Hypoxia 化等の改善が期待された。

## 【成果の概要】

1. アパタイト・コラーゲン高密度体を調製し、骨補填材としての有用性を確認した。
2. 架橋ゼラチンとポリ乳酸を DDS 基材として、血管新生の促進と阻害を実現した。
3. 磁性ビーズにストレプトアビジン被覆を施し、標的（幹）細胞の回収を実現した。

# bFGF 徐放性材料を用いた骨再生モデルにおける 骨再生と血管新生の検討

大橋祐生, 杉山芳樹

岩手医大 歯 口腔外科学講座 歯科口腔外科学分野

## 【目的】

口腔外科領域では, 骨欠損部の補填材料に人工骨や腸骨などの自家骨が用いられる. しかし, 人工骨には異物反応性や術後感染などの問題点があり, 自家骨の移植は患者への負担がある.

そこで近年, 骨欠損に対して再生医学的アプローチが求められている. 骨再生の臨床応用に際して, 新生血管による血液循環は, 骨形成や感染防御の面において非常に重要であると考えられる. 本研究は, bFGF徐放システムによる骨再生モデルを用いて, マイクロフォーカスCTにより同一個体の経時的な骨再生の経過を観察し, 再生骨部の連続組織標本により, 骨再生と血管新生の関係を明らかにすることを目的とした.

## 【成果】

マイクロフォーカスCT所見は, 実験群において埋入後1週, 2週になると軽度の骨再生が認められ4週まで継続していた. CTデータによる骨体積計測の結果, 埋入後2日, 1週, 2週では実験群と対照群との間に有意差は認められなかったが, 4週には対照群に対し実験群では有意に骨体積が増加していた ( $P < 0.05$ ).

組織学的評価では, 新生血管は埋入後1週で, 対照群に対し実験群は有意に多く観察され ( $P < 0.05$ ), 埋入後4週でも実験群は有意に多くの新生血管が観察された ( $P < 0.05$ ).

## 【考察】

bFGFによる骨再生誘導は, 埋入後1週から2週の時期に行われ, 4週には骨再生が行われていることが示された. またbFGFの徐放によって, 埋入後1週から多数の新生血管が形成され, 埋入後4週における継続的な栄養供給が行われていることが考えられた.

bFGFの徐放により新生血管の形成が誘導され, その結果, 骨再生が誘導されていることが示唆された. 本研究で示された骨再生における早期の血管誘導は, 感染に対する抵抗性を高め, より確実な骨再生をもたらすものと考えられる.

## 【成果の概要】

1. マイクロフォーカスCTにより, 同一個体の骨再生の評価を経時的に行うことができ, 対照群と比べ有意に骨再生を認めることができた.
2. 組織学的評価では, bFGF含有AGD埋入後4週で活発な再生骨の形成を認めた. また, 新生血管はbFGF含有AGD埋入後1週で微小な血管が多数形成され, 4週には血管径が増大していた.
3. 新生血管の血液循環により骨再生が促進されていると示唆された.

# 骨代謝評価方法としての $^{18}\text{F}$ -FDG を用いた PET の役割

小豆島正典

岩手医大 歯 総合歯科学講座 歯科放射線学分野

## 【目的】

再生医療の評価方法の1つとして、CTあるいはPETを用いた非観血的な画像診断があげられる。なかでも PET は、特定の部位に結合する注射用リガンドが開発できれば極めて有用なモダリティとなる。本プロジェクトでは、再生医療の評価としてPETによる骨代謝評価に的を絞って、そのモデルとして骨破壊を伴う歯肉癌を対象に PET を行った。プロジェクトの初期段階においては、 $^{18}\text{F}$ -FDG に代わる次世代の PET 用腫瘍トレーサー  $^{18}\text{F}$ -Choline の自動合成装置を実用化し、最終段階では  $^{18}\text{F}$ -FDG と  $^{18}\text{F}$ -Choline の集積を比較・分析することにより、osteoblast や osteoclast が PET でイメージングされているか否かを検討することを目的とした。

## 【成果】

1.  $^{18}\text{F}$ -Choline を得るために、Sep-Pak メチレーション法に基づいた  $^{18}\text{F}$ -Choline 自動合成法を確立した。
2.  $^{18}\text{F}$ -FDG、および  $^{18}\text{F}$ -Choline 集積の細胞周期依存性を調べた結果、細胞分裂の頻度が高い細胞集団ほど、PET 上で高集積としてイメージングされていることが予測された。
3. 骨代謝評価モデルとして、骨浸潤を伴わない舌癌 23 例と顎骨浸潤を伴う歯肉癌 16 例を対象に  $^{18}\text{F}$ -FDG PET を分析したところ、トレーサー集積量を示す SUV は舌癌より歯肉癌に対し高値を示した。
4.  $^{11}\text{C}$ -Choline あるいは  $^{18}\text{F}$ -Choline による PET では、舌癌と歯肉癌に対して有意な SUV の違いは認められなかった。すなわち Choline の場合、 $^{18}\text{F}$  で標識しようが  $^{11}\text{C}$  で標識しようが、顎骨浸潤の有無による集積に違いはなかった。

## 【考察】

$^{18}\text{F}$ -FDG を用いた PET では、顎骨浸潤を伴う歯肉癌は舌癌より大きな SUV を示した。この理由には2つの可能性がある。1つは、 $^{18}\text{F}$  自身が骨の破壊によって露出されたハイドロオキシアパタイトへ吸着すること、他方は破壊された骨や腫瘍細胞に集まっている間質細胞への集積である。しかしながら、 $^{18}\text{F}$  で標識した Choline は、舌癌に対し  $^{18}\text{F}$ -FDG と同等の集積を示すにもかかわらず、歯肉癌に対しては大きな違いを示さない。すなわち  $^{18}\text{F}$  自身のハイドロオキシアパタイトへの吸着の関与は少ないと思われる。これらの成績から、 $^{18}\text{F}$ -FDG は腫瘍細胞のみならず、骨代謝に関連する osteoblast や osteoclast などの間質細胞へ集積し、PET では高い SUV としてイメージングされていることが明らかになった。

## 【成果の概要】

4.  $^{18}\text{F}$ -Choline を得るための自動合成法を確立した。
5.  $^{18}\text{F}$ -FDG、および  $^{18}\text{F}$ -Choline を用いた PET では、細胞分裂頻度が高い細胞集団ほど高い SUV としてイメージングされていることが予測された。
6.  $^{18}\text{F}$ -FDG は骨代謝に関連する osteoblast や osteoclast などの間質細胞へ集積することから、骨代謝の評価として  $^{18}\text{F}$ -FDG を用いた PET が有用であることが示された。

