

Title	(2)共同研究プロジェクト 研究成果報告
Journal	歯科学報, 116(4): 271-282
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/4060">http://hdl.handle.net/10130/4060</a>
Right	

(2)共同研究プロジェクト —研究成果報告—

I. 口腔疾患病因の分子生物学的解明

基底細胞母斑症候群の統合的研究

研究代表者 東 俊文(東京歯科大学・生化学講座)  
 研究分担者 山口 朗(東京歯科大学・口腔科学研究センター), 鄭 雄一(東京大学・大学院工学系研究科), 大庭伸一(東京大学・大学院工学系研究科)

1. 研究の概要

基底細胞母斑症候群患者細胞由来 iPS 細胞を作製し, 疾患モデル細胞として骨分化異常, 癌化, 嚢胞形成, 顎顔面奇形の病態解明を目指す。

2. 取組状況

疾患患者由来細胞をもとに iPS 細胞を 4 症例で確立した。各々の遺伝子変異を確認し, 各々における遺伝子発現をコントロール iPS 細胞と比較検討している。

3. 本事業の成果

4 症例本疾患 iPS 細胞の作製に成功した。

【関連業績】

雑誌論文

1. Tsukinowa T, Okada S, Yoshizawa Y, Saito A, Muramatsu T, Furusawa M, Azuma T: Synergistic and mutual antagonistic regulations of Wnt inhibitors play an important role in osteoblast differentiation of human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol*, 24 : 311 – 318, 2015.
2. Yoshizawa Y, Ochiai-Shino H, Tsukinowa T, Okada S, Muramatsu T, Furusawa M, Azuma T: The comparison between single vs repeated administration of Wnt3a of HPDL cells. *J Hard Tissue Biol*, 24 : 331 – 339, 2015.
3. Transplantation of human induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. Kamichika Hayashi Hayashi, Hiromi Ochiai-Shino, Takeaki

Shiga, Shoko Onodera, Akiko Saito, Takahiko Shibahara, Toshifumi Azuma. *BDJ Open*, in Press.

総説・解説

A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination. Hiromi Ochiai-Shino, Toshifumi Azuma. *World Biomedical Frontiers*, 2015 July, ISSN : 2328 – 0166.

学会発表

1. 青木栄人, 鈴木瑛一, 久永幸乃, 齋藤暁子, 小野寺晶子, 浅井裕之, 東 俊文, 齋藤 淳 Runx 2 ノックアウトマウス胚線維芽細胞を用いた iPS 細胞の樹立および骨芽細胞への分化誘導  
 第58回春季日本歯周病学会学術大会, 千葉市, 2015年5月
2. 小野寺晶子, 長谷川大悟, 齋藤暁子, 大高真奈美, 渡邊 章, 西村 健, 柴原孝彦, 片倉朗, 中西真人, 東 俊文  
 Gorlin 症候群患者由来細胞を用いたヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立および骨芽細胞分化  
 第33回日本骨代謝学会学術集会, 東京都, 2015年7月
3. 齋藤暁子, 中村 貴, 小野寺晶子, 篠 宏美, 大木章生, 長谷川大悟, 渡邊 章, 小崎健次郎, 柴原孝彦, 末石研二, 東 俊文  
 鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立と機能解析  
 第33回日本骨代謝学会学術集会, 東京都, 2015年7月
4. 齋藤暁子, 大木章生, 中村 貴, 小野寺晶子, 篠 宏美, 長谷川大悟, 小崎健次郎, 柴原孝彦, 末石研二, 東 俊文  
 鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立と機能解析  
 第24回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 大阪市, 2015年8月

5. 小野寺晶子, 齋藤暁子, 篠 宏美, 大高真奈美, 大木章生, 長谷川大悟, 柴原孝彦, 末石研二, 中西真人, 東 俊文  
患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立  
第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市, 2015年9月
6. 長谷川大悟, 小野寺晶子, 齋藤暁子, 渡邊章, 大高真奈美, 西村 健, 中西真人, 片倉朗, 東 俊文, 柴原孝彦  
Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞の樹立と機能解析  
第60回日本口腔外科学会総会・学術大会, 名古屋市, 2015年10月
7. 小野寺晶子, 大庭伸介, 長谷川大悟, 齋藤暁子, 篠 宏美, 渡邊 章, 大高真奈美, 西村健, 中西真人, 片倉朗, 鄭 雄一, 柴原孝彦, 東 俊文  
Characterization of iPS cells derived from basal cell nevus syndrome primary oral tissue fibroblast.  
第88回日本生化学会大会, 神戸市, 2015年12月
8. 齋藤暁子, 大木章生, 中村 貴, 小野寺晶子, 篠 宏美, 長谷川大悟, 小崎健次郎, 柴原孝彦, 末石研二, 東 俊文  
鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立と機能解析  
第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会, 神戸市, 2015年12月
9. 小野寺晶子, 大庭伸介, 長谷川大悟, 齋藤暁子, 篠 宏美, 渡邊 章, 大高真奈美, 西村健, 中西真人, 片倉 朗, 鄭 雄一, 柴原孝彦, 東 俊文  
Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化応答  
第15回日本再生医療学会総会, 大阪市, 2016年3月
10. 齋藤暁子, 大木章生, 中村 貴, 小野寺晶子, 篠 宏美, 長谷川大悟, 小崎健次郎, 柴原孝彦, 末石研二, 東 俊文  
鎖骨頭蓋異形成症患者由来 iPS 細胞の樹立と機能解析

- 第15回日本再生医療学会総会, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪市, 2016年3月
11. 落合-篠 宏美, 長谷川大悟, 小野寺晶子, 齋藤暁子, 大高真奈美, 渡邊 章, 西村 健, 中西真人, 片倉 朗, 柴原孝彦, 東 俊文  
Gorlin 症候群患者由来細胞を用いた iPS 細胞の樹立と骨芽細胞分化の検討  
第15回日本再生医療学会総会, 大阪市, 2016年3月
12. 落合-篠 宏美, 齋藤暁子, 小野寺晶子, 鈴木瑛一, 木村基善, 東 俊文  
骨細胞特異的 EGFP 発現 iPS 細胞の樹立および骨細胞分化  
第15回日本再生医療学会総会, 大阪市, 2016年3月

## メタゲノム解析による口腔細菌叢病原性解析

- 研究代表者 石原和幸(東京歯科大学・微生物学講座)
- 研究分担者 新谷誠康(東京歯科大学・小児歯科学講座), 齋藤 淳(東京歯科大学・歯周病学講座), 村松 敬(東京歯科大学・歯科保存学講座), 柴原孝彦(東京歯科大学・口腔顎顔面外科学講座), 秋山泰(東京工業大学・大学院情報理工学研究科), 山下喜久(九州大学・大学院歯学研究院・口腔保健推進学講座), 岸川 浩(東京歯科大学・市川総合病院消化器内科), 大木貴博(東京歯科大学・市川総合病院循環器内科/救急部), 瀬田範行(東京歯科大学・市川総合病院内科学)

### 1. 研究の概要

口腔内では700種を超える細菌が複雑な細菌叢を形成している。そのため、歯周炎、根尖性歯周組織炎においては、その病因がまだ明らかにされていない。近年の細菌叢解析技術の進歩は、腸内細菌叢と炎症性腸疾患、肥満、2型糖尿病、大腸がん、自閉症をはじめとする疾患との関連を明らかにしつつ

ある。歯周炎においても動脈硬化症、糖尿病、非アルコール性肝炎、リウマチ性関節炎等の疾患の関わりが報告され、歯周炎病巣細菌叢とこれらの疾患との関わりが注目され、その解明が必要とされている。本研究では、まず第一に慢性歯周炎、侵襲性歯周炎、根尖性歯周組織炎病巣細菌叢および健常部細菌叢を次世代シーケンサーによって網羅的に解析する。それによりこれらの病態と関わる菌種もしくは菌群の解明を行い、その菌群の増加に関わる細菌間相互作用、細菌の遺伝子発現制御の解析を行う。それとともに、歯周炎局所に存在する菌種その他臓器に対する影響の解明を試みる。さらに、このプロセスによって細菌叢中に存在する健康を維持するために有効な“善玉菌”と考えられる菌種の解明を行い、口腔細菌叢のコントロールによる口腔疾患の予防手段の開発を行う。

## 2. 取組状況

### 口腔内細菌叢の網羅的解析

歯肉溝内には非常に多数の微生物が存在し、その高速シーケンサーを用いた解析には、全てのゲノムを解析するメタゲノム解析と、細菌にターゲットを絞った16S rRNA pyrosequence 解析がある。本研究ではこの両方の方法による解析を計画している。

#### a. 歯肉溝内細菌のメタゲノム解析

病巣に存在する全てのDNAを解析し、それにより歯周炎の病因へのアプローチを計画し基礎解析を行っているが、未だこの方法による解析は少なく、方法論の確立が必要である。現在までに、健常者の歯肉溝内サンプルからDNAを採取し、次世代sequencerにより解析を行い、解析に必要な解像度を得るためには、1回の解析に何サンプルまで解析可能かを検討し、本解析での解像度決定のための基礎解析を行っている。

#### b. 16S rRNA pyrosequence 解析

本解析では、小児のプラーク細菌叢解析を行い、う蝕を中心に低リスクプラーク構成細菌の解析を開始している。また、根尖部病巣細菌叢、慢性歯周炎局所細菌叢についても病巣から得たサンプルのpyrosequence 解析を開始し、データを収集中である。

### 歯周病原細菌の遺伝子発現制御解析

細菌のバイオフィーム形成における*luxS*の機能、鉄獲得メカニズムにおけるExtracytoplasmic function (ECF) シグマ因子の果たす役割について解析を行った。

## 3. 本事業の成果

### 口腔内細菌叢の網羅的解析

小児の有色(オレンジ色)のデンタルプラークを保有する患児は5~12歳の範囲で、齲蝕経験歯率は乳歯38%、永久歯13%と高かった。細菌叢解析では、齲蝕経験がある群のプラーク中には、有色、白色にかかわらず、歯周病原性菌も含め、小児期のうちから多くの菌種を保有しているケースが多く、小児期の口腔管理が将来にわたる口腔疾患リスクに影響している可能性が示された。

根尖部病巣から認められた菌種は、検体当たり $12041 \pm 6915$ リードが得られ、一人平均 $55 \pm 16$ OTUが検出された。この数は、デンタルプラークと比較するとおよそ1/4程度であった。根尖から検出される主要なものは、*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Parvimonas* 等であった。これらの菌種について、病巣が限局しているものと、2つ以上の隙に波及したものについて比較を行うとその検出比率に差が認められ、病態によって構成菌種に差があることが示唆された。

### 歯周病原細菌の遺伝子発現制御解析

細菌のECFシグマ因子は菌体外の生活環境変化に応答し遺伝子転写量を制御することで細菌のストレス応答に関与している。歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis*は6種のECFシグマ因子を保有している。本菌が必須の栄養素である鉄をヘミン等の鉄含有タンパクから獲得するプロセスでECFシグマ因子が果たす役割は明らかでない。そこで本研究ではECFシグマ因子の1つPGN\_0319に着目し、鉄獲得機構との関連性を検討した。その結果、ヘミン制限下においてPGN\_0319変異株は野生株と比較し対数増殖期での増殖速度の減少を認めた。またPGN\_0319変異株においてヘミン獲得に関与する遺伝子、*hmuY*, *hmuR* および *cdhR* 発現量の減少を認め、PGN\_0319相補株において同遺伝子発現量の回復を認めた。更に、PGN\_0319組み換えタンパク質は*hmuY*, *cdhR*のプロモーター領域と特異的な結合を示した。これらの結果よりECFシグマ因子

PGN\_0319は *hmuY* およびその転写因子である *cdhR* の発現を直接的に制御し、*P. gingivalis* のヘミン取り込み機構に関与することが示された。

オートインデューサーによるクオラムセンシングは、細菌密度の上昇と共にその遺伝子発現に影響を与え、デンタルプラーク形成に関わると考えられている。これを明らかにするため、プラーク細菌である *Capnocytophaga ochracea* のオートインデューサー2 (AI-2) 産生遺伝子 (*luxS*) 欠損株を作成し、解析を行った。その結果、*C. ochracea* は、*luxS* の欠損によりバイオフィーム形成は低下したが、AI-2を含む野生株の培養上清によってバイオフィーム形成は補完されなかった。*luxS* の complementation によってバイオフィーム形成が補完されることから、*C. ochracea* のバイオフィーム形成低下にはAI-2の欠損によってではなく、*luxS* の関わる activated methionine cycle の機能不全が関わっていることを明らかにした。さらに本菌の持つIX型分泌機構欠損株を用いた解析から、本菌のバイオフィーム形成には、本菌の滑走を司る表層タンパクSprBとIX型分泌機構が関わっていることを明らかにした。

タバコ煙抽出物は、細胞骨格、インテグリンの発現を変化することで、細胞遊走能を変化させるとともに、*P. gingivalis* のヒト歯肉上皮細胞への侵入を増加させた。この作用には、MAPK とくに ERK, p38の活性化が関わっていた。

#### 【関連業績】

##### 雑誌論文

1. Imamura K, Kokubu E, Kita D, Ota K, Yoshikawa K, Ishihara K, Saito A : Role of mitogen-activated protein kinase pathways in migration of gingival epithelial cells in response to stimulation by cigarette smoke condensate and infection by *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res, 2015. doi : 10.1111/jre.12341. [Epub ahead of print]
2. Hosohama-Saito K, Kokubu E, Okamoto-Shibayama K, Kita D, Kamakura A, Ishihara K : Involvement of *luxS* in biofilm formation by *Capnocytophaga ochracea*. ProS One, 11 : e0147114, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0147114

3. Kita D, Shibata S, Kikuchi Y, Kokubu E, Nakayama K, Saito A, Ishihara K : Involvement of the type IX secretion system in the gliding motility and biofilm formation of *Capnocytophaga ochracea*. Appl Environ Microbiol, 82 : 1756 – 1766, 2016. doi : 10.1128/AEM.03452-15.
4. Inagaki S, Kimizuka R, Kokubu E, Saito A, Ishihara K : *Treponema denticola* invasion into human gingival epithelial cell. Microb Pathog [in press], doi : 10.1016/j.micpath.2016.01.010
5. Tomita S, Kasai S, Imamura K, Ihara Y, Kita D, Ota K, Sekino J, Nakagawa T, Saito A : Changes in antimicrobial susceptibility profile and prevalence of quinolone low-sensitive strains in subgingival plaque from acute periodontal lesions after systemic administration of sitafloxacin. Microb Pathog, 79 : 41 – 46, 2015.
6. Ishii Y, Imamura K, Kikuchi Y, Miyagawa S, Hamada R, Sekino J, Sugito H, Ishihara K, Saito A : Point-of-care detection of *Tannerella forsythia* using an antigen-antibody assisted dielectrophoretic impedance measurement. Method Microb Pathog, 82 : 37 – 42, 2015.
7. Imamura K, Takayama S, Saito A, Inoue E, Nakayama Y, Ogata Y, et al. : Evaluation of a novel immunochromatographic device for rapid and accurate clinical detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque. J Microbiol Methods, 117 : 4 – 10, 2015.
8. Takayama S, Hashimoto K, Kokubu E, Taniguchi M, Tajima K, Ochiai A, Saitoh E, Saito A, Ishihara K, Kato T : Inhibitory effects of a novel cationic dodecapeptide [CL(14 – 25)] derived from cyanate lyase of rice on endotoxic activities of LPSs from *Escherichia coli* and periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Microb Pathog [in press], doi : 10.1016/j.micpath.2015.08.011
9. Takayama S, Kato T, Imamura K, Kita D, Ota K, Suzuki E, Sugito H, Saitoh E,

- Taniguchi M, Saito A : Effect of a mouthrinse containing rice peptide CL(14-25) on early dental plaque regrowth: a randomized cross-over pilot study. BMC Research Notes, 8 : 531, 2015. DOI 10.1186/s13104-015-1527-8
- 学会発表
1. 太田功貴, 菊池有一郎, 今村健太郎, 吉川幸輝, 喜田大智, 藤瀬和隆, 国分栄仁, 齋藤淳, 石原和幸  
*Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子 PGN\_0319の機能解析  
第299回東京歯科大学学会総会, 東京都 歯科学報 115 : 276, 2015.
  2. 国分栄仁, 藤瀬和隆, 菊池有一郎, 柴山和子, 石原和幸(2015).  
The immunoresponse of oral epithelial cells infected *Treponema denticola*.  
日本細菌学雑誌 70 : 170.
  3. Koki Ota, Yuichiro Kikuchi, Kentaro Imamura, Kouki Yoshikawa, Daichi Kita, Atushi Saito, Kazuyuki Ishihara.  
Role of extracytoplasmic function sigma factor in *Porphyromonas gingivalis* hemin binding receptor HmuR.  
The 55<sup>th</sup> General Session of Korean Academy of Periodontology Seoul Korea The 55<sup>th</sup> General Session of Korean Academy of Periodontology Abstracts. p. 163, 2015.
  4. Saito A, Tomita S, Kasai S, Ihara Y, Imamura K, Ota K, Kita D, Nakagawa T.  
Changes in antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria in acute periodontal lesions following systemic administration of sitafloxacin.  
8th Conference of the European Federation of Periodontology, London, UK, Final Programme, 8th Conference of the European Federation of Periodontology, 42, 2015.  
Journal of Clinical Periodontology 42(S17) : 10, 2015.
  5. Ishii Y, Imamura K, Kikuchi Y, Miyagawa S, Hamada R, Sekino J, Inagaki S, Sugito H, Ishihara K, Saito A.  
Clinical detection of *Tannerella forsythia* using an antigen-antibody assisted dielectrophoretic impedance measurement method.  
8th Conference of the European Federation of Periodontology, London, UK, Final Programme, 8th Conference of the European Federation of Periodontology, 73, 2015.  
Journal of Clinical Periodontology 42(S17) : 129, 2015.
  6. 喜田大智, 今村健太郎, 勢島 典, 齋藤淳  
IX型分泌機構は *Capnocytophaga ochracea* の滑走運動とバイオフィルム形成能に影響を与える(優秀発表賞選考対象演題)  
日本歯科保存学会2015年度春季学術大会(第142回), 北九州市  
日本歯科保存学会2015年度春季学術大会(第142回)プログラムおよび講演抄録集, p. xxxvii, 82
  7. 今村健太郎, 高山沙織, 齋藤淳, 井上英子, 中山洋平, 小方頼昌, 白川 哲, 長野孝俊, 五味一博, 両角俊哉, 秋石和宏, 渡辺香里, 吉江弘正  
*Porphyromonas gingivalis* 新規検出キット(DK13-PG-001)の有用性に関する多施設共同研究  
第58回秋季日本歯周病学会学術大会, 浜松市, 日歯周誌 57(秋季特別号) : 27, 117, 2015
  8. 関野 仁, 重枝昭広, 石井里加子, 木暮弘子, 吉岡真由美, 笹川百史子, 荒井綾子, 後藤悦子, 岩佐美里, 森谷佳織, 八島章博, 長野孝俊, 中川種昭, 石原和幸, 齋藤淳, 五味一博  
知的障害者に対する経口アジスロマイシン投与を併用したOne-stage full-mouth disinfectionの効果  
第58回秋季日本歯周病学会学術大会, 浜松市, 日歯周誌 57(秋季特別号) : 46, 138, 2015
  9. Kita D, Shibata S, Kikuchi Y, Kokubu E, Imamura K, Nakayama K, Ishihara K, Saito A.  
A type IX secretion system affects the biofilm formation of *Capnocytophaga ochracea*.  
11<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Bali, Indonesia, 2015.
  10. Ota K, Kikuchi Y, Imamura K, Yoshikawa

K, Kita K, Saito A, Ishihara K.

Role of extracytoplasmic function sigma factor in *Porphyromonas gingivalis* hemin binding receptor HmuR.

The 55<sup>th</sup> General Session of Korean Academy of Periodontology, Seoul, October 24–25, 2015.

The 55<sup>th</sup> General Session of Korean Academy of Periodontology Abstracts, p. 168.

11. 高山沙織, 今村健太郎, 齋藤 淳, 井上英子, 中山洋平, 小方頼昌, 白川 哲, 長野孝俊, 五味一博, 両角俊哉, 秋石和宏, 渡辺香里, 吉江弘正  
歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の新規検出キットの臨床における有用性  
日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会(第143回), 東京都文京区  
日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会(第143回)プログラムおよび講演抄録集, p. xxxvii, 209
12. 永井宜子, 桜井敦朗, 本間宏実, 田中公子, 新谷誠康(招待講演)  
「若き研究者の集い」小児の有する成熟歯面バイオフィーム構成細菌種の解析  
第30回日本小児歯科学会関東地方会, 千葉, 2015

### 唾液エクソソームによる口腔がん等に対する非侵襲的スクリーニング法の開発

研究代表者 矢島安朝(東京歯科大学・口腔インプラント学講座)

研究分担者 芝 清隆 ((公益)がん研究会・がん研究所), 片倉 朗(東京歯科大学・口腔病態外科学講座), 吉成正雄(東京歯科大学・口腔科学研究センター), 野村 武史(東京歯科大学・オーラルメディスン・口腔外科学講座), 橋本貞充(東京歯科大学・生物学), 村松 敬(東京歯科大学・歯科保存学講座), 佐々木 穂高(東京歯科大学・口腔インプラント学講座)

ト学講座)

#### 1. 研究の概要

エクソソームとは細胞から放出される30–150nmの細胞外分泌小胞で、血液、唾液、尿などのあらゆる体液中に存在している。エクソソームの内部にはそれを放出する親細胞由来のRNAや蛋白が含まれており、エクソソームを介した細胞間のコミュニケーションが、近年、がんの転移などに関連していることが示されつつある。そこで我々は特に低侵襲に採取できる唾液に含まれるエクソソームに注目している。口腔内環境は他の体液と比べて、pHや浸透圧が大きく異なるため、唾液由来エクソソームが他の体液由来のエクソソームと異なる性質をもつのかどうか興味深い点である。本研究では健常者の唾液エクソソームと口腔内疾患を持つ患者の唾液エクソソーム特有の性質を解析、比較することで疾患特異的な特徴を明らかとし、唾液エクソソームを用いた非侵襲スクリーニング法を確立することを目的としている。

#### 2. 取組状況

エクソソームを精製するにあたり、現在最も高純度に精製できる密度勾配遠心法を使用したプロトコルを確立している。これを用いて、唾液エクソソームの密度、粒子サイズ、蛋白の解析を行い、細胞株由来エクソソームと比較、また異なる唾液検体の解析結果と比較して、唾液エクソソームに特徴的な性質を解析している。さらにスループットに焦点を当てたプロトコルも開発して、臨床研究の拡大をねらっている。唾液検体の使用による研究のための倫理委員会の審査の準備をすすめている。

#### 3. 本事業の成果

唾液エクソソームを17時間密度勾配遠心法で精製し、ウェスタンブロット、ナノ粒子トラッキング分析、原子間力顕微鏡で観察し、その結果と、細胞株由来エクソソームを同一条件で精製したものの結果を比較した。その結果、細胞株由来エクソソームと比較して唾液エクソソームは密度が高く、粒子サイズが小さい事がわかった。また、エクソソームマーカーである抗CD63抗体を修飾した金標識抗体による免疫染色で、エクソソームマーカー発現分画にみられる小胞様構造体がエクソソームであることを

AFMで観察することに成功した。さらに、96時間密度勾配遠心で分けた分画に対してマスマスペクトロメトリーによるプロテオーム解析を行い、エクソソームに含まれる蛋白の解析や、エクソソームサブクラスの存在を現在調べている。

加えて、フィルターを用いた唾液エクソソームの精製プロトコルを開発しており、金属製のフィルターを唾液の前処理に用いる事で現在の煩雑な前処理操作(ソニケーション, 低速遠心)を簡便にすることができた。フィルターの孔径のさらなる検討を行っており、より簡便な精製プロトコルを開発中である。

**\* 各参画機関における倫理委員会承認の獲得**

対象疾患を口腔がん(舌・歯肉がん)とし、目標検体数を各5に設定。

検査対象分子やサンプリング方法などをワーキンググループ内で決定し、各機関での倫理審査を計画進行中である。

**\* 機関間での唾液検体採取・解析体制の整備**

患者検体を採取する人や場所(水道橋病院, 千葉病院, 市川総合病院)に関する体制を整え、迅速に解析場所であるがん研究会に移動できるようなプロトコルの検討が進行中である。

**【関連業績】**

**総説・解説**

[総説] 芝 清隆:「エクソソームの分離・定量化」, 膜, 40:242-247, 2015.

**学会発表**

1. 岩井千弥, 吉田光孝, 南澤宝美后, 芝 清隆, 吉成正雄, 矢島安朝  
Density gradient fractionation of saliva exosomes.  
93rd General Session & Exhibition of the IADR, March 11-14, 2015, Boston
2. Shiba K, Minamisawa T, Suga K, Hibino K, Yamamoto S, Yoshida M, Matsumura S.  
Capturing extracellular vesicles on solid surfaces.  
ISEV2015, April 23, 2015, Washington DC
3. 山本恵史, 南澤宝美后, 松村幸子, 芝 清隆  
密度勾配遠心法と AFM を用いたヒト唾液エクソソームの性質解析

第7回日本RNAi研究会 第2回日本細胞外小胞学会, 平成27年8月26日, 広島

4. 山本恵史, 岩井千弥, 吉田光孝, 南澤宝美后, 松村幸子, 芝 清隆, 矢島安朝  
ヒト唾液由来エクソソームと細胞株由来エクソソームの比較

第19回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 平成27年11月28日, 神奈川

5. Hibino K, Yamamoto S, Minamisawa T, Suga K, Yoshida M, Matsumura S, Shiba K.  
Sub-classification of exosomes based on their surface markers by the programmed bio-surface.

第25回日本MRS年次大会, 平成27(2015)年12月9日, 横浜

6. 岩井千弥, 吉田光孝, 芝 清隆, 吉成正雄, 矢島安朝

密度勾配超遠心法により単離したヒト唾液由来エクソソームの特徴的な性質

日本口腔インプラント学会第35回関東甲信越支部学術大会, 平成28年2月13日, 東京

**II. 顎顔面領域での新たな治療戦略の開発**

**顎顔面領域の硬組織疾患に対する新しいアプローチシステム構築を目指した基礎的研究**

研究代表者 松永 智(東京歯科大学・解剖学講座)

研究分担者 矢島安朝(東京歯科大学・口腔インプラント学講座), 高野直樹(慶應義塾大学・理工学部), 阿部伸一(東京歯科大学・解剖学講座), 山本将仁(東京歯科大学・解剖学講座), 比嘉一成(東京歯科大学・市川総合病院眼科), 島崎 潤(東京歯科大学・市川総合病院眼科), Wei Jen Chang(台北医学大学・口腔医学院)

**1. 研究の概要**

不可視の解剖学的構造やメカニカルストレス, あるいは手術時の感覚や失敗経験など, これまで数値



化することが困難な事象をシミュレートする。同時に、上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートなど、開発したバイオインスパイアード材料の臨床応用を目指す。

1) シミュレータ開発に必要な軟組織の力学強度試験班(松永, 矢島, 高野)

口腔インプラント治療のスペシャリストが知覚している手術時の感覚を, マイクロモータを用いた出力によって経験することができるシミュレータ開発を目的とする。上顎におけるインプラント手術の一つである上顎洞底挙上術に着目し, 挙上時の微細な感覚を再現しシミュレートするため, 上顎洞粘膜の力学強度試験を行った後, シミュレータにパラメータを導入する。

2) 顎顔面再建治療へ向けた上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートの創製班(阿部, 山本, 比嘉, 島崎, Wei Jen Chang)

口腔, 咽頭粘膜実質再生を実現するために, 口腔粘膜上皮, 口腔粘膜上皮下組織, 筋組織から抽出された細胞を用いてそれぞれの細胞シートを創製することを目的とする。さらに積層シートの構造維持に必須な細胞骨格である中間径フィラメント, 接着タンパクの局在について, 周囲生体が持つ構造との比較を主眼とした観察を行う。これにより, 本研究は口腔, 咽頭粘膜実質疾患の術後粘膜再生および機能回復に対する新しいアプローチとしての応用を目指す。

## 2. 取組状況

1) シミュレータ開発に必要な軟組織の力学強度試験班(松永, 矢島, 高野)

ヒト遺体より採取した上顎洞粘膜の力学強度試験を行うための装置を開発し, 上顎洞底挙上時の感覚をシミュレートするために必要な基礎的データを取得する。

2) 顎顔面再建治療へ向けた上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートの創製班(阿部, 山本, 比嘉, 島崎, Wei Jen Chang)

口腔粘膜上皮, 口腔粘膜上皮下組織, 筋芽細胞を用い, 我々が創製した上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートについて, 口腔粘膜広範実質欠損部への応用を目指すため, 3種の細胞シートを積層後に発現する構造タンパク, 接着タンパクのさら

なる詳細な局在を明らかにする。また動物実験において生体との適合, 治癒過程を同タンパクの発現を解析する事によってその有効性を評価する。これらの研究は当大学の眼科・角膜研究グループと連携し, 細胞の採取から培養, シート作製から積層, そして動物実験とそれぞれの知識・経験を活用しながら効率よく行い, 目的達成を目指す。

## 3. 本事業の成果

1) 慶應義塾大学理工学部高野教授らと進めてきたハードウェアの開発は, 下顎骨におけるモデルに関してこれを完了し, 筐体の設計も終了した。次のステップとして上顎におけるシミュレーションとして, インプラント埋入手術に先駆けて行われる上顎洞底挙上術に着目し, 本年は上顎洞底粘膜の力学強度試験を行う装置を開発し, すでに東京歯科大学解剖学講座に設置を終えた。今後, 順次試料を計測する予定である。

2) 顎顔面再建治療へ向けた上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートの創製班(阿部, 山本, 比嘉, 島崎, Wei Jen Chang)

我々は, マウス頬粘膜上皮から細胞を採取し作製した口腔粘膜上皮シート, 頬粘膜下組織から細胞を採取し作製した結合組織細胞シート, 胎生期マウスより採取した筋芽細胞を利用し作製した骨格筋細胞シートを積層後, 24時間までの経過を観察し良好な結果を得ている。これはそれぞれの細胞シートを作製する時間を試行錯誤し, 口腔粘膜上皮シートを3週間, 結合組織細胞シートを48時間, 骨格筋細胞シートを36時間とし, その後積層したものが最も良好な結果を得る可能性があることを見出したものである。特に積層後, それぞれの細胞シートが良好に接着すると上皮シート直下に細胞基質間の接着タンパクである Integrin が一層発現することをこれまで明らかにした。

### 【関連業績】

#### 雑誌論文

1. Fukuda M, Matsunaga S, Odaka K, Oomine Y, Kasahara M, Yamamoto M, Abe S : Three-dimensional analysis of incisive canals in human dentulous and edentulous maxillary bones. *Int J Implant Dent*, 1 : 12, 2015. doi : 10.1186/s40729-015-0012-4

2. Ide Y, Matsunaga S, Harris J, Connell D, Seikaly H, Wolfaardt J: Anatomical examination of the fibula: digital imaging study for osseointegrated implant installation. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 44: 1, 2015.
3. Iwata M, Matsunaga S, Morioka T, Nakano T, Abe S, Yoshinari M, Yajima Y: Alignment of Biological Apatite Crystallites in Posterior Cortical Bone of Human Edentulous Mandible. *J Hard Tissue Biol*, 24: 235-240, 2015.
4. Kinoshita H, Nagahara M, Takano N, Takemoto S, Matsunaga S, Abe S, Yoshinari M, Kawada E: Development of a drilling simulator for dental implant surgery. *J Dent Educ*, 2015 (in press).
5. Yamamoto M, Honkura Y, Rodríguez-Vázquez JF, Murakami G, Katori Y, Cho BH, Abe S: Switching of the laryngeal cavity from the respiratory diverticulum to the vestibular recess: a study using serial sagittal sections of human embryos and fetuses. *J Voice*, 2015 (in press).

学会発表

1. 田坂彰規, 松永 智, 古池崇志, 和田 健, 井戸川香代, 石崎 憲, 上田貴之, 阿部伸一, 櫻井 薫  
加熱重合および3Dプリンタで製作した義歯床の精度と維持力  
第124回日本補綴歯科学会プログラム・抄録集: 136, 2015.  
(第124回日本補綴歯科学会学術大会・総会, さいたま市)
2. 小高研人, 松永 智, 笠原正彰, 大峰悠矢, 廣内英智, 三井智治, 古川文博, 武本真治, 阿部伸一, 吉成正雄  
デンタルインプラント周囲顎骨における生体アパタイト結晶配向性  
東京歯科大学学会プログラム: 14, 2015.  
(第299回東京歯科大学学会総会, 千代田区)
3. 小高研人, 松永 智, 廣内英智, 笠原正彰, 阿部伸一  
ビーグル犬インプラント周囲顎骨における生体

- アパタイト結晶配向性  
歯科基礎医学会学術大会・総会プログラム: 222, 2015.  
(第57回歯科基礎医学会学術大会・総会, 新潟市)
4. 松永 智, 吉成正雄, 矢島安朝, 阿部伸一  
ビーグル犬のデンタルインプラント周囲顎骨における生体アパタイト結晶配向性  
日本口腔インプラント学会誌 (Suppl 28), 302, 2015.  
(第45回日本口腔インプラント学会・学術大会, 岡山市)
  5. 梅澤貴志, 芹川雅光, 山根茂樹, 比嘉一成, 阿部伸一  
骨格筋芽細胞シートへの間葉系細胞の影響  
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会抄録集, 156, 2015.  
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 神戸市
  6. 芹川雅光, 梅澤貴志, 北村 啓, 森田純晴, 山本将仁, 阿部伸一  
コラーゲンをういた筋芽細胞シートに対する間葉系細胞の影響  
日本解剖学会関東支部第103回学術集会プログラム・抄録集, 27, 2015.  
日本解剖学会関東支部第103回学術集会 横浜市
  7. Satoru Matsunaga, Shinichi Abe.  
Possibility of 3D Digital Technology in Dentistry  
The 1st Taiwan International Dentistry Forum 2015 abstract, (Suppl), 9, 2015.  
(The 1st Taiwan International Dentistry Forum, Taipei, Taiwan)
  8. 松永 智, 小高研人, 森田純晴, 菅原圭亮, 高野正行, 勝見吉晴, 片倉 朗, 柴原孝彦, 吉成正雄, 阿部伸一  
次世代の医療情報管理・共有システムの開発  
第2回日本顎顔面再建先進デジタルテクノロジー学会 シンポジウム1「新技術の開発」, 平成27年, 世田谷区  
日本顎顔面再建先進デジタルテクノロジー学会

プログラム・抄録集：22，2015.

## 積層造形技術を応用したスキャフォールドの創製

研究代表者 武本真治(東京歯科大学・歯科理工学講座)

研究分担者 河田英司(東京歯科大学・歯科理工学講座)，石崎 憲(東京歯科大学・老年歯科補綴学講座)，櫻井 薫(東京歯科大学・老年歯科補綴学講座)，天谷浩一(松浦機械製作所)，都留寛治(九州大学・大学院歯学研究院口腔機能修復学講座)

### 1. 研究の概要

組織再生を目的としたスキャフォールド(足場材料)は、早期の組織回復のみならず、その組織機能を維持しながら置換されることが望まれている。これまでのスキャフォールドは生体組織に置換する有機高分子材料やリン酸カルシウムを中心としたセラミック材料の検討が主に行われてきた。近年、デジタル技術の発展と3Dプリンタに代表される積層造形技術(付加製造技術)の発展により、3次元造形物の創製が容易になりつつある。積層造形技術およびデジタル技術の発展は、有機高分子やセラミック材料のみならず、金属材料まで複雑な形状を造りだすことが可能になっている。

金属材料の使用は多孔体を作製しても他の材料よりも強度に優れることから、荷重負荷が比較的大きい部位にも使用できる利点を有する。一方で、機械的性質に優れる金属材料ではあるが、生体にとって異物であることから生体親和性は有機高分子やセラミック材料に劣る。そこで、これまでのチタンやジルコニアで培ってきた表面処理や薄膜セラミックスや有機高分子のコーティングによる表面改質の手法、バイオリクターによる3次元培養の技術を応用して、スキャフォールド内部にまで組織を早期に誘導する方法としての表面処理や生理活性物質の導入について検討を行う。

他方、腫瘍切除後の口腔顎顔面欠損症例において、著しい開口障害が認められる症例や咽頭部の補

綴が必要な症例などには、補綴装置作製のための印象採得が困難または断念せざるを得ない場合がある。積層造形術においては、X線CTデータから軟組織3次元形態を抽出し、3Dプリンタにより作業用模型を作製することが可能である。この技術を応用すれば、従来の間接法での義歯製作において必須行程であった印象採得および模型作製の代替行程となり、顎顔面補綴領域でのスキャフォールドの応用への展開を考える上で重要である。

したがって、本研究では顎顔面領域での歯科治療の選択を広げることの可能性を模索し、積層造形技術を応用した組織再生のスキャフォールドの創製を目指す。本年は、積層造形技術により組織再生(特に顎顔面補綴)に応用できるスキャフォールドの素材の物性強化と薬剤徐放型スキャフォールドの基礎的知見を模索した。

### 2. 取組状況

#### 1) 3Dプリント石膏模型の表面処理効果

腫瘍切除後の口腔顎顔面欠損症例において、印象採得困難症例に対し、3次元造形技術を補綴装置作製プロトコルへ組み込むことで顎補綴装置の作製を試みた。まず、X線CTデータから軟組織3次元形態を抽出し、3Dプリンタにより作業用模型を作製した。その中で、3次元造形技術により作製した模型は、従来の印象採得から作製した模型よりも幾分強さが劣り、模型表面も粗糙であった。そこで、幾つかの表面処理を3Dプリンタにより作製した作業模型に施すことにより、その強度と表面粗さの改善を試みた。

#### 2) チタン表面への薬剤固定と徐放の制御

積層造形したチタンを想定した場合、その内部にまで組織を導入することが重要である。種々のチタンへの表面処理の大部分は骨を早期に誘導するためのものである。本研究では、インプラント用材料としてのチタン表面にサブミクロン及びナノ構造を付与するとともに、骨を誘導するためのスタチン系薬剤の固定を試みた。また、その薬剤の徐放量の検討を行った。

### 3. 本事業の成果

#### 1) 3Dプリント石膏模型の表面処理効果

強化方法としては、ワックスのコーティングや石膏の強化剤であるシアノアクリレート塗布、合

成高分子の含浸を試みた結果、3Dプリンタにより作製した石膏模型はシアノアクリレートや合成樹脂のコーティングにより部分的に強化されることが明らかになった。また、表面も滑沢になったことからコーティングによって作業用模型として有効であると考えられる。

## 2) チタン表面への薬剤固定と徐放の制御

チタン表面を粗糙にすることによってスタチン単独での固定量は増加した。しかし、その総スタチン固定量は僅かであった。一方で、粗糙にしたチタンさらに化学的な表面処理を行ったチタンに、ゼラチンでスタチンを被包した複合体を固定化するとスタチンの固定量は増大した。また、7日までの徐放量は、固定化しているスタチン量から一度に溶出することなく、徐放していることが明らかになった。表面分析の結果、溶液に浸漬して7日間経過後のチタン表面にもゼラチンが残存していることが明らかになった。

次年度は上記の方法を、チタンを積層したスキャフォールドに応用することを試みる予定である。

### 【関連業績】

#### 学会発表

石崎 憲, 萩尾美樹, 野村武史, 小林健一郎, 高野伸夫, 柴原孝彦, 櫻井 薫

3Dプリント石膏模型の硬化処理が表面性状と寸法精度に及ぼす影響

第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会(横浜市)

2016年1月21日, 22日

### ジルコニアの臨床応用

研究代表者 佐藤 亨(東京歯科大学・クラウンブリッジ補綴学講座学講座)

研究分担者 矢谷博文(大阪大学・歯学部歯科補綴学第一教室), 早川 徹(鶴見大学・歯学部歯科理工学講座), 吉成正雄(東京歯科大学・口腔科学研究センター)

## 1. 研究の概要

ジルコニアセラミックスはメタルアレルギーの懸

念がなく、高強度で審美性を有する生体親和性の高い材料であることから、本材を利用したオールセラミック修復が臨床応用されている。しかし、臨床応用における、長期耐久性、天然歯等の咬耗・摩耗様相、組織親和性については明らかになっておらず、本材料を臨床応用についてのエビデンスは得られていない。

本研究は、ジルコニア(正方晶ジルコニア多結晶体, TZP)の口腔環境下における疲労特性の評価、口腔環境を想定した摩耗状況と経年的変化、インプラントが接する生体組織に適合した表面改質法の検討を行い、ジルコニアによるオールセラミック修復、ジルコニアインプラントを開発することを目的とした。この概念は、完全メタルフリー修復というパラダイムシフトにつながり、日本から発信できるジルコニアの臨床応用システムになり得ると考えられる。

## 2. 取組状況

1) 超高透光性TZPの評価: 現在、透光性ジルコニアの透光性をさらに改善した超高透光性TZPが改善され、従来のリチウムシリケート系のオールセラミックスを凌駕する透光性と審美性を有するシステムが開発され、臨床応用が期待されている。しかし、これらのTZP単層材の透光性および疲労特性を検討した研究は報告されておらず、超高透光性ジルコニアの臨床的評価は定まっていない。そこで色調の異なる超透光性ジルコニア単層材の有効性を明らかにすることを目的として各種物性を検討する。

2) 臨床形態における強度評価: クラウン作製時に最も厚さが薄くなる部位に裂開が起こりやすいと思われる中央溝部に着目し、支台形態とフルジルコニアクラウンの破壊強度の関係を明らかにすること目的として以下の条件を設定して検討する。具体的には、咬合面厚さ0.5mmを基準とし、中央溝部においてそれよりも薄い0.3mm, 及び厚い0.7mmへの厚さの変化がクラウンの強度にもたらす影響についても調査する。

## 3. 本事業の成果

1) 色調の異なる透光性ジルコニアは、陶材を積層しなくても従来の不透光性ジルコニアの透光性を改善するとともに、陶材に近い色調を再現できる

ことが明らかとなった。また、透光性ジルコニアの強度は不透光性ジルコニアと同等であり、積層陶材の厚さが増加すると強度の減少が認められた。以上より、色調を調整した透光性ジルコニアの単独使用は臨床的有用性が高いことが示唆された。また、超高透光性 TZP は静的強さが600MPa程度と比較的小さく、臨床応用にあたっては注意が必要であると考えられた。

- 2) 実験開始前に有限要素解析を行った結果、溝の付与により応力集中部位での強度低下が明らかとなり、現在、実験条件の最適化を検討する実験を行っている。

#### 【関連業績】

##### 雑誌論文

Fumiyori Matsuzaki, Hideshi Sekine, Shinya Honma, Takuya Takanashi, Katsunori Furuya,

Yasutomo Yajima, Masao Yoshinari: Translucency and flexural strength of monolithic translucent zirconia and porcelain-layered zirconia. Dent Mater J, 34(6): 910-917, 2015.

##### 総説・解説

1. 吉成正雄. インプラント材料：臨床の疑問に答える10, ジルコニア1 - TZPとは? TZPの耐久性-. 歯界展望, 126: 706-717, 2015.
2. 吉成正雄. インプラント材料：臨床の疑問に答える11, ジルコニア2 - フルジルコニア修復の可能性と対合歯摩耗-. 歯界展望, 126: 934-947, 2015.
3. 吉成正雄. インプラント材料：臨床の疑問に答える12, ジルコニア3 - ジルコニアインプラントの組織適合性1 -. 歯界展望, 126: 1184-1192, 2015.