

|             |   |
|-------------|---|
| Title       | 3 . ディスバイオーシスのメカニズム及び象牙質石灰化機構の解析  |
| Author(s)   | 石原, 和幸  |
| Journal     | 歯科学報, 122(3): 248-250   |
| URL         | <a href="http://hdl.handle.net/10130/5984">http://hdl.handle.net/10130/5984</a> |
| Right       |   |
| Description |   |

胞の発現遺伝子 CAGE 解析の結果、iPS 細胞は骨芽細胞分化誘導時に使用するプロモーターが通常の間葉系幹細胞が利用するプロモーターとは異なることが明らかとなった。さらに、今まで知られてこなかった未知 non-codingRNA が骨芽細胞分化調節を行っている可能性を示唆するデータも得られている。シングルセル解析 CHIP アッセイにより核膜タンパク質の発現を回復しただけで骨分化が回復することが判明した。Gorlin 症候群原因遺伝子 *PTCH1* および *PTCH2* 遺伝子変異を効率よく解析できる遺伝子解析パネル作製に成功し、これにより、患者血液 5 cc から Gorlin 症候群原因遺伝子解析が可能となった。Apert 症候群 iPS 細胞の解析では、骨芽細胞分化が極端に低下し骨芽細胞増殖が亢進する。その後、細胞が密集すると分化が亢進し、石灰化も亢進した。これらの機序として、メカニカルストレスに注目したところ、Apert 症候群 iPS 細胞はメカニカルストレスに応答して FGF 2 を分泌することにより、FGF 2 情報経路が過剰となり、細胞増殖と分化過剰が生じることが解明された。さらに、HajduCheney 症候群 iPS 細胞を用いて、これまでよく解明されてこなかった Notch シグナルの骨芽細胞、破骨細胞カップリング調節機構を明らかにしていく。

### 3. ディスバイオーシスのメカニズム及び象牙質石灰化機構の解析

感染制御ラボ グループリーダー  
微生物学講座  
石原和幸

慢性歯周炎は、壮年期以降の成人において非常に罹患率が高く、その予防が急務とされている。本プロジェクトでは、細菌学的観点からの歯周炎発症のメカニズムの解明と、骨の再生への応用を視野に入れ、石灰化を含む象牙芽細胞の生理学的機能についての解析を行ってきた。

#### 1. 歯周炎発症のメカニズムの解明

慢性歯周炎の病因には、歯肉縁下細菌叢のディスバイオーシスが重要な役割を果たしている。ディスバイオーシスのメカニズムを解明するために本プロジェクトでは菌叢全体像の解析と同時にそれに関わる細菌叢内での個々の細菌の動態について解析を行い、本年度は以下の様な成果を得た。

##### 1) 歯肉縁下細菌叢のマイクロバイーム解析

歯周炎患者の、健常部と歯周炎部52部位からサンプルを採取し、歯周処置前後の菌叢解析を行った。歯周炎部には、従来からその増加が認められている *Porphyromonas gingivalis* 等とともに *Filifactor alocis* 等の難培養性の菌種の特異的な増加が認められた。健常部のマイクロバイームでは処置前後での菌叢の変化は少なかったのに対し、歯周炎部では、処置後大きく変動が認められ、その変化は、2ヶ月後まで維持されていた。これらの結果から、健常部の菌叢はレジリエンスが強く、歯周炎部位の菌叢は、安定性が低いことが示唆された。

##### 2) プラーク構成細菌の細胞表層タンパクの機能解析

*Capnocytophaga ochracea* は、共凝集した状態で gliding する事によりバイオフィーム形成に重要な役割を果たしている。本菌の type IX 分泌機構によって菌体外に分泌される C-末端配列を持つタンパクのうち、およそ 500 kDa の未知タンパク 2 種の機能を欠損株によって解析した。これらのタンパクは、どちらの欠損によっても gliding 活性が劇的に減少する事から新たな gliding に関わるタンパクで

あることが明らかになった。

3) プラーク構成細菌の酸化ストレスに対する応答  
酸素ストレス応答は菌の生存に重要な役割を果たす。*C. ochracea* の酸素ストレス応答に関わる遺伝子として、相同性解析により *oxyR* 類似遺伝子 (Coch\_0002) を検出し、その欠損株を作成することによって Coch\_0002 が酸素ストレス応答に関わることを明らかにした。さらに、dental plaque の主要な構成菌種である *Streptococcus gordonii* によって産生される  $H_2O_2$  による傷害作用の回避に *oxyR* が関わっていることを明らかにし、本菌がバイオフィルム内での niche を得るのに重要な役割を果たすことが明らかにできた。

*T. denticola* では、DNA binding motif を持つ TDE\_127 遺伝子が、酸素ストレスにより発現が増加し、その欠損株は、酸素存在下での生存率が低下することから、本遺伝子が特定の遺伝子発現の調節を介して酸素ストレス応答にかかわることが明らかになった。

4) *Treponema denticola* の表層タンパク分泌機構の解析

*Treponema denticola* の持つ dentipain は、本菌の病原性因子であるが、菌体外に分泌されている。その分泌機構を明らかにするため、dentilisin と major surface protein (Msp) の欠損株を用いて解析すると、野生株では、outer sheath 画分に dentipain がほとんど認められないのに対し dentilisin 欠損株では dentipain が認められ、*msp* 欠損株では、immunoglobulin-like domain を失った短いサイズの dentipain が認められていた。これらの結果から *T. denticola* の dentilisin と Msp が dentipain の分泌に関わっていることが示唆された。

## 2. 象牙芽細胞の生理学的機能の解析

象牙芽細胞は、感覚受容細胞であると同時に、象牙質形成細胞である。感覚受容細胞として細胞膜には種々の機械感受性イオンチャネルが発現し、また細胞内カルシウムイオンシグナルを介して細胞外へ ATP あるいはグルタミン酸を放出、歯髄分布  $A\delta$  ニューロンと細胞間連絡を確立することで象牙質痛が発生する。一方、象牙質形成細胞として生理的な象牙質と生体内外からの刺激に伴う第3象牙質の形成を駆動する。象牙質表面への刺激は、細胞

膜に存在する機械刺激感受性チャネルあるいは高 pH 感受性センサータンパク質を活性化し、同様に細胞内カルシウム濃度を増加させる。増加したカルシウムイオンは、 $Na^+ - Ca^{2+}$  交換体・plasma membrane  $Ca^{2+} - ATPase$  (PMCA) によって細胞外の石灰化前線に排出され、反応象牙質としての第3象牙質が形成される。一方で、象牙質刺激に伴う象牙芽細胞死は、本細胞の局所分化をもたらすことで修復象牙質としての第3象牙質が形成される。

これらの細胞内カルシウムイオンシグナルに加えて、象牙芽細胞は細胞内 cAMP によっても、その機能が調節される可能性が示唆されている。

そこで、2021年度には以下について研究を展開した。

1) 象牙芽細胞および三叉神経節ニューロンの cAMP シグナルの検討

Gs タンパク質共役型受容体の活性化はアデニル酸シクラーゼの活性化をもたらす、細胞内 cAMP レベルを増加させる。そこで両細胞の細胞内 cAMP レベルの測定を行ったところ、象牙芽細胞には、IP 受容体、5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>4</sub> (5-HT<sub>4</sub>) 受容体、dopamine D1 (D<sub>1</sub>) 受容体、adenosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>) 受容体、vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 受容体の機能的発現が見られた。

一方、三叉神経節ニューロンでは、 $\beta_2$  受容体、calcitonin gene-related peptide (CGRP) 受容体、IP 受容体、5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>4</sub> (5-HT<sub>4</sub>) 受容体、dopamine D1 (D<sub>1</sub>) 受容体、adenosine A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>) 受容体の機能的発現が見られた。

2) 象牙芽細胞の PMCA 発現の検討

象牙芽細胞への低浸透圧刺激・高 pH 刺激は、一過性に細胞内カルシウムイオン濃度を増加させる。増加したカルシウムイオンは、主に、PMCA サブタイプである PMCA1, PMCA3, PMCA4 によって細胞外に排出されることが示された。加えて、これらは象牙質石灰化を調節していた。

3) 象牙芽細胞発生における Niche 構成細胞の可塑性変化とその制御機構

象牙質刺激に伴う象牙芽細胞死と、その局所分化は未だ謎に包まれている。そこで免疫染色による検討を行ったところ、象牙芽細胞特異的マーカータンパクである DSPP に対して免疫陽性を示すもの

の他のマーカーに陽性を示す象牙芽細胞の亜集団の存在を示唆した。これらの細胞の同定を行っている。

#### 4) 歯髄神経原性炎症の検討

歯髄炎症反応は、神経終末から内皮細胞あるいは象牙芽細胞などの歯髄細胞へと神経ペプチドが放出（軸索反射）され、神経原性炎症が生じることによって引き起こされる。そこで歯髄内圧上昇による神経圧迫を模した三叉神経節細胞への機械刺激に伴う三叉神経節-象牙芽細胞間連絡で生じる象牙芽細胞内 cAMP シグナルを検討したところ、象牙芽細胞に G<sub>s</sub> タンパク質共役型受容体が発現しており、アデニル酸シクラーゼの活性化が細胞内 cAMP レベルを増加することが示された。また CGRP が歯髄の CGRP を介した軸索反射に関連していることが示唆された。

## 4. FabLab TDC プラットフォームの構築と今後の展望

ファブラボ グループリーダー  
口腔病態外科学講座  
片倉 朗

### 〈ファブラボ〉

2013年に設立した FabLab TDC では、CAD/CAM, Extended Reality (XR) に代表されるデジタルデンティストリーへのパラダイムシフトを牽引するため、臨床に直結したトランスレーショナルリサーチを実施している。口腔外科・補綴分野ではすでに臨床において様々な治療で応用され、精度および安全性を大幅に向上できることを複数の国際学術雑誌に発表した。併せて教育の分野にもデジタルテクノロジーの応用を行い、高い教育成果を得ている。

#### ① 口腔顎顔面外科手術支援

顎矯正手術や腫瘍切除術などを普遍的で高精度かつ安全に行う方法の開発をプロジェクト開始時から行ってきた。ヴァーチャルオペレーションを術中に高精度に再現するために CAD/CAM 技術により作製した 3D デバイスを臨床応用している。さらに Microsoft 社 HoloLens 2 を導入し CT データから作

製したホログラムを術中患者に対して投影する Mixed Reality 技術によるナビゲーション手術を行っている。これらの技術を Le Fort I 型骨切り術に併用する方法を新規開発し、従来法よりも高精度手術を実現した。この東京歯科大学 FabLab TDC 発信のオリジナルの新テクニックは International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery に掲載された。また、この論文は Materialise 社主催の Mimics Innovation Awards 2021 において最優秀賞を受賞した。現在はオトガイ形成術で精度検証を継続しており、その他の疾患にも応用している。

#### ② デジタルデンティストリーの局部床義歯への応用

欠損部顎堤の口腔内スキャンの精度を向上させるために、口腔内での使用が可能なマーカーを用いた新たなスキャン法の有用性を検討した。新手法は顎堤のスキャン精度の向上に有効であり、再スキャン部は周囲データとの形状移行性があることが明らかとなった。さらに、金属プリンタで積層造形した局部床義歯フレームワークの変形を防止するために、補強バーをフレームワークに設置し造形精度に及ぼす影響を検討した。補強バーはリングバー中央部の精度の改善する効果はほとんどなかった。このような局所的な残留応力は適合のみならず強度にも影響を及ぼすため、造形角度、サポート材の設定位置等の造形条件について今後さらなる検討が必要である。

#### ③ 教育への応用

ヘッドマウントディスプレイである Meta 社 Oculus Quest 2 を用いて造影 CT から VR を作製し学生に対し解剖学実習を行った。従来の PC モニターで学修した群 (2D 群) と VR で学修した群 (3D 群) では 3D 群において有意な成績向上が見られた。今後は本教育システムに 5G ネットワークを応用していく。この内容は日本歯科医学会主催 第 36 回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」において優秀発表賞を受賞した。

### 〈口腔と脳機能〉

脳機能に関しては機能的 MRI を用いた研究を継続しており、酸味と香りの感覚が脳内で統合されるネットワークの一端を解明した。