

プログラム

開会の挨拶 (16:00)

脇坂 聡

【一般演題】 (16:05 ~ 17:00)

座長：西村 理行

(16:05 ~ 16:15)

1) Id2 欠損マウス由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構の解析 ----- 1

阪大院歯 顎口腔機能再建学講座 (歯科補綴学第一教室)

○裏口 真也, 江草 宏, 萱島 浩輝, 福安 翔, 王 放放, 矢谷 博文

(16:15 ~ 16:25)

2) 分子マーカーによる骨細胞分化段階の識別 ----- 2

阪大院歯 顎口腔病病因病態制御学講座 (口腔病理学教室)¹

阪大院歯 口腔総合診療部²

阪大院歯 顎口腔機能再建学講座 (歯科補綴学第二教室)³

阪大院歯 検査部⁴

○大家 香織^{1,2}, 佐藤 淳¹, 石田 健^{1,3}, 宇佐美 悠⁴, 岸野 万伸¹, 小川 祐三¹, 豊澤 悟¹, 竹重 文雄²

休憩 (16:25 ~ 16:30)

座長：寺尾 豊

(16:30 ~ 16:40)

3) 歯質のミクロ構造異方性を考慮した 3次元有限要素解析 ----- 3

大阪大学歯学部 (三年次学生)¹

阪大院歯 顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室)²

○小野 真太郎¹, 堅田 千裕¹, 川西 雄三¹, 羽黒 歩美¹, 山口 哲², 寺岡 文雄², 今里 聡²

(16:40 ~ 16:50)

4) 低フォスファターゼ症罹患児の歯科的特徴 ----- 4

阪大院歯 口腔分子感染制御学講座 (小児歯科学教室)

○大川 玲奈, 仲野 和彦, 大嶋 隆

(16:50 ~ 17:00)

5) *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合タンパクについて ----- 5

阪大院歯 口腔分子感染制御学講座 (小児歯科学教室)

○野村 良太, 仲野 和彦, 仲 周平, 大嶋 隆

休憩 (17:00 ~ 17:10)

(17:10 ~ 18:10)

【特別講演】平成 23 年度大阪大学弓倉学術奨励賞 表彰および受賞講演

司会：脇坂 聡

(17:10 ~ 17:40)

1) 「アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構」----- 6

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）

竹立 匡秀

(17:40 ~ 18:10)

2) 「Floating aerial blood mists in the operating room」----- 7

大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）

石濱 孝二

休 憩 (18:10 ~ 18:15)

【総 会】(18:15 ~ 18:45)

閉会の挨拶 (18:45)

由良 義明

【一般演題】 (16:05 ~ 17:00)

..... 座長：西村 理行

(16:05 ~ 16:15)

1) Id2 欠損マウス由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構の解析

阪大院歯
顎口腔機能再建学講座
(歯科補綴学第一教室)

○裏口 真也
江草 宏
萱島 浩輝
福安 翔
王 放放
矢谷 博文

【目的】

個々の患者から作製した iPS 細胞は、再生医療の細胞源として期待されるが、その骨芽細胞への分化機構は明らかにされていない。basic helix-loop-helix 型転写因子の機能抑制因子である inhibitor of DNA binding/differentiation-2(Id2) は、幹細胞の“stemness”の維持に関与し、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御することが示唆されている。本研究の目的は、Id2 遺伝子の欠損マウス (Id2^{-/-}) から樹立した iPS 細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導モデルを作製し、Id2 の初期化および骨芽細胞分化への関与を明らかにすることである。

【方法】

Id2^{-/-} および野生型マウス (WT) から分離培養した歯肉線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて初期化因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) を導入した。得られた胚性幹 (ES) 細胞様コロニーから iPS 細胞株を樹立し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色および RT-PCR 解析 (Nanog, ERas, Oct3/4) を用いてその初期化を評価した。また、樹立した iPS 細胞株を骨芽細胞分化誘導培地にて 28 日間培養し、RT-PCR 解析を用いて骨芽細胞特異的遺伝子 (osteocalcin, BSP, osterix) の発現を調べるとともに、von Kossa 染色により細胞外基質の石灰化を観察した。一方で、Id2^{-/-} および WT から骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) を分離培養し、同様の方法で骨芽細胞への分化を評価した。

【結果】

Id2^{-/-} および WT 由来歯肉線維芽細胞を初期化誘導した結果、ALP および Nanog, ERas, Oct3/4 遺伝子を強く発現する iPS 細胞株の樹立が可能であった。これらの細胞株を骨芽細胞分化誘導培地で培養すると、28 日後には osteocalcin, BSP, osterix の遺伝子発現を亢進し、石灰化が観察された。Id2^{-/-} 由来 iPS 細胞における骨芽細胞分化は、WT 由来 iPS 細胞と比較して著明であった。また、Id2^{-/-} 由来 BMSC は、WT 由来 BMSC と比較して osteocalcin 遺伝子を高発現しており、細胞外基質の石灰化も著明であった。

【考察および結論】

以上の結果より、Id2 遺伝子を細胞からでも iPS 細胞の樹立は可能であり、樹立した iPS 細胞は WT 細胞から作製した iPS 細胞と比較して著明な骨芽細胞分化能を示すことが示唆された。また、Id2 遺伝子の欠失は BMSC においても骨芽細胞分化を増強することが明らかとなった。今後、この Id2^{-/-} 由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞の分化調節機構の解析が、iPS 細胞を用いた効率的な再生医療技術の創生に繋がるものと期待される。

(16:15 ~ 16:25)

2) 分子マーカーによる骨細胞分化段階の識別

阪大院歯
顎口腔病因病態制御学講座
(口腔病理学教室)¹
阪大院歯
口腔総合診療部²
阪大院歯
顎口腔機能再建学講座
(歯科補綴学第二教室)³
阪大院歯
検査部⁴

○大家 香織^{1,2}
佐藤 淳¹
石田 健^{1,3}
宇佐美 悠⁴
岸野 万伸¹
小川 祐三¹
豊澤 悟¹
竹重 文雄²

【目的】

骨を構成する主な細胞には骨芽細胞, 骨細胞, 破骨細胞があるが, 骨細胞はその約 90% を占め, 骨の維持にも必要であると考えられている。骨中には様々な分化段階の骨細胞が存在し, 形態学的に, 骨表面の類骨に潜りかけた osteoblastic osteocyte, 類骨の中の osteoid osteocyte, 類骨に隣接するが石灰化骨に周囲を囲まれた young osteocyte, 成熟した mature osteocyte に分類される。この骨芽細胞から骨細胞への分化過程では, 分化段階の異なる骨細胞が全て同じ機能を持つかどうかは明らかではなく, 骨細胞研究の際に考慮すべき点であると考えられる。本研究では, 骨芽細胞から骨細胞への分化過程で発現する分子を指標として, 骨細胞の分化マーカーを形態学的分類と併せて検討するとともに, 加齢による骨細胞の変化を検討した。

【方法】

生後 2 週, 4 週, 20 週齢ラット (Wistar, ♂) の脛骨皮質骨を用い, 免疫組織化学的染色にて検討を行った。一次抗体として, Runx2, Osterix, DMP1, GM130, Connexin43 を使用した。核内転写因子である Runx2 と Osterix は骨形成細胞への分化マーカー, 細胞外基質タンパク DMP1 は骨細胞の, GM130 はゴルジ体, Connexin43 は細胞間のギャップ結合のマーカーである。

【結果と考察】

骨芽細胞と osteoblastic osteocyte は Runx2 を, 骨芽細胞と osteoblastic ~ osteoid osteocyte は Osterix を強く発現しており, 骨芽細胞と osteoblastic osteocyte の多くは Runx2 と Osterix を両方発現していた。DMP1 と GM130 の蛍光二重染色により, osteoid osteocyte と young osteocyte ではゴルジ域に DMP1 が局在していることが確認されたが, osteoid osteocyte 周囲の類骨層細胞外基質に DMP1 はほとんど分布していなかった。一方, 石灰化骨中の young osteocyte や mature osteocyte 周囲の細胞外基質には DMP1 が強く発現しており, mature osteocyte 細胞内には, ゴルジ装置と DMP1 はともに認められなかった。Connexin43 陽性反応は, 骨細胞の突起先端部や細胞体付近に認められ, Connexin43 陽性反応は分化が進んだ mature osteocyte で減少傾向がみられた。加齢による骨細胞の変化を検討するため, 2 週, 4 週齢と比較して 20 週齢のラット脛骨を観察したところ, 大半の骨細胞が mature osteocyte と考えられ, Connexin43 の陽性反応はさらに減少していた。これらの結果より, 骨細胞の分化過程に対応して分布や発現レベルが変化する DMP1 や Connexin43 は, 骨細胞の各分化段階を示す有効な分化マーカーとなることが分かった。

休憩 (16:25 ~ 16:30)

(16:30 ~ 16:40)

3) 歯質のミクロ構造異方性を考慮した 3 次元有限要素解析

大阪大学歯学部
(三年次学生)¹
阪大院歯
顎口腔機能再建学講座
(歯科理工学教室)²

○小野 真太郎¹
堅田 千裕¹
川西 雄三¹
羽黒 歩美¹
山口 哲²
寺岡 文雄²
今里 聡²

【目的】

歯質の破折、歯質と修復材料の接着界面における剥離などに挙げられる破壊現象のメカニズムを理解することは、これらの問題に対する新しい予防法や対策を確立するうえで重要である。近年のコンピュータテクノロジーの発展に伴い、これまで3次元有限要素解析により破壊リスクを評価した数多くの研究が行われてきたが、解析に使用されているモデルは、天然歯や修復材料の複層構造が再現されているものの、等方性材料として扱われており、エナメル小柱や象牙細管などの歯質特有の解剖学的特徴に起因する異方性が考慮されていない。そこで本研究では、エナメル質と象牙質のミクロ構造を *in silico* で再現し、均質化解析により異方性を求め、これらを考慮した応力解析を行った。

【方法】

エナメル質(エナメル小柱、小柱間質)と象牙質(管周象牙質、管間象牙質)のミクロ構造モデルをCADソフトウェア(FreeFormModeling, SensAble Technologies, Inc.)を用いて作製し、均質化解析によりマクロ構造の異方性を表すx軸、y軸、z軸方向の縦弾性係数を求めて、これらを用いたマクロ構造解析を行った(VOXELCON2012, Quint, Corp.)。マクロ構造解析用には、下顎右側第一大臼歯(エナメル質、象牙質、歯髄)、歯根膜、皮質骨、海綿骨からなる6層構造のモデルを作製した。皮質骨底面を完全固定とし、歯冠部に歯軸に沿って根尖側方向へ150Nの荷重を負荷して、全てのモデルを等方性材料とした場合と、エナメル質と象牙質を異方性材料とした場合の最大主応力分布の差異について検討した。

【結果】

均質化解析により得られたx軸、y軸、z軸方向の縦弾性係数は、エナメル質が5.8GPa、39.8GPa、3.5GPa、象牙質が16.8GPa、18.1GPa、16.8GPaであった。等方性材料と異方性材料で最大主応力分布を比較した結果、エナメル質については、中心溝、咬合面直下で明らかな差異が認められ、象牙質については、異方性材料とした場合に、より広く分布する傾向を示した。

【考察】

得られた縦弾性係数から、エナメル質の方が象牙質よりも強い異方性を示すことが分かった。エナメル質の場合、y軸(近遠心軸:近心側+)方向の縦弾性係数がx軸(頬舌軸:舌側+)、z軸(歯軸:歯根側+)方向と比べて大きな値を示していることから、中心溝に沿って近遠心方向に最大主応力が分布したと考えられる。また、z軸方向の縦弾性係数が小さいことから、等方性材料に比べて、荷重負荷方向に変形しやすく、咬合面直下で引張りと圧縮が混在したと考えられる。以上より、3次元有限要素解析における破壊リスク評価には、歯質のミクロ構造に起因する異方性が重要であることが示唆された。

4) 低フォスファターゼ症罹患患児の歯科的特徴

阪大院歯
口腔分子感染制御学講座
(小児歯科学教室)

○大川 玲奈
仲野 和彦
大嶋 隆

【目的】

低フォスファターゼ症は組織非特異的アルカリフォスファターゼ (ALP) の欠損により引き起こされる疾患で、骨形成不全、血液および各種臓器組織中の ALP の活性値の低下、尿中へのフォスフォエタノールアミン (PEA) の排泄を特徴とする。通常は常染色体劣性遺伝であるが、稀に常染色体優性遺伝の報告がある。本疾患の発生率は 10 万人に 1 人と推定されている。発症時期と症状によって、周産期型、乳児型、小児型、成人型、歯限局型に分類され、発症時期が早いものほど臨床症状は重篤であるといわれている。歯科的所見としては乳歯の早期脱落を高頻度で認めるものの、永久歯の早期脱落に関する報告は極めて少ない。また、早期脱落の原因としてセメント質の部分的欠如、脆弱な歯根膜線維、歯槽骨の吸収などが考えられている。今回、全国の大学病院小児歯科に協力を依頼し、多数の本疾患罹患患児の歯科的所見を分析したので報告する。

【対象と方法】

全国 28 の歯科大学および歯学部の小児歯科に対して、本疾患罹患患児の有無を問い合わせ、該当者が存在する場合は、早期脱落乳歯および永久歯の有無とその時期について情報を提供していただいた。このデータに、本院小児歯科における該当症例を加えた。各症例において、歯種別に脱落時期をまとめ、それぞれの歯種ごとの脱落好発時期を推定した。また、乳歯の脱落時期の評価としては、日本人小児におけるそれぞれの乳歯の平均萌出年齢から 3 年以内に脱落した場合を早期脱落と判断した。

【結果】

20 大学から回答があり、本学を含めて 7 大学において 19 名の患児の情報を得ることができた。19 症例中 15 症例において乳歯の早期脱落を認めた。下顎では乳中切歯では 4 歳までに全症例の 74%、全脱落歯の 66%、乳側切歯では 4 歳までに全症例の 47%、全脱落歯の 40%、乳犬歯では 4 歳 6 か月までに全症例の 37%、全脱落歯の 26% において早期脱落を認めた。また、上顎では乳前歯の脱落が全症例の 47%、全脱落歯の 18% において早期脱落を認められた。一方で、萌出を認めた永久歯においては、最新の診察時点で早期脱落を認める症例はなかった。

【考察】

今回の調査から、本疾患の乳歯の早期脱落は下顎前歯部に 1 歳から 4 歳にかけて好発することが示された。本研究で示された乳歯脱落好発時期を周知することにより、歯科領域における脱落歯を認める所見から医科領域へ紹介することで、低フォスファターゼ症の早期診断につながる可能性が上昇すると思われる。現在通院中の患児においては、定期的な口腔衛生指導と歯周診査を行いながら、永久歯への交換を観察していく予定である。乳歯の早期脱落に関しては、必要に応じて、義歯の装着を行っている。今後、さらに症例を蓄積し、低フォスファターゼ患児の実態を明らかにし、患児へのよりよい臨床的アプローチについて考えていきたい。

(16:50 ~ 17:00)

5) *Streptococcus mutans* のコラーゲン結合タンパクについて

阪大院歯
口腔分子感染制御学講座
(小児歯科学教室)

○野村 良太
仲野 和彦
仲 周平
大嶋 隆

【目的】

近年、口腔細菌と全身疾患との関係が明らかにされてきている。一般に細菌が病原性を発揮するためには、菌体表層の細胞外マトリックス結合タンパクが重要であると考えられている。う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は、感染性心内膜炎の原因菌としても知られている。2004年に、*S. mutans* の細胞外マトリックス結合タンパクとして、分子量約 120kDa のコラーゲン結合アドヘシンである Cnm タンパクと、それをコードする *cnm* 遺伝子が同定された。本研究では、*S. mutans* のコラーゲン結合タンパクについて分子生物学的分析を行ったので報告する。

【方法】

日本人、フィンランド人およびタイ人の口腔から *S. mutans* を 580 株分離した。これらの菌株のコラーゲン結合能を求め、コラーゲン結合能を有する *S. mutans* の割合を求めた。これらのコラーゲン結合能を有する菌株が *cnm* 遺伝子を保有する割合を PCR 法により求めた。コラーゲン結合能を有するにもかかわらず Cnm タンパクを持たない菌株については、新規コラーゲン結合タンパクを同定し、Cbm タンパクと命名し、それをコードする *cbm* 遺伝子の配列を決定した。Cbm タンパクがコラーゲン結合タンパクとしての役割を担っていることを確認するために、*cbm* 遺伝子の欠失変異株を作製するとともに、この *cbm* 遺伝子欠失変異株に *cbm* 遺伝子を戻した相補株を作製して、コラーゲン結合能を測定した。

【結果】

S. mutans 580 株のうちコラーゲン結合能を有する菌株は 75 株 (12.9%) 存在し、日本・フィンランド・タイの間でその分布に大きな差は認められなかった。これらのうち、11% は *cnm* 遺伝子を、2% は *cbm* 遺伝子を保有していた。Cnm タンパクと Cbm タンパクを保有する菌株は、口腔内に広く存在する血清型 *c* (約 70 ~ 80%) や *e* (約 20%) に分類されるものは少なく、口腔での頻度が 5% 以下と極めて低い血清型 *f* と血清型 *k* にそれぞれ高い頻度で分布することが明らかとなった。また、Cnm タンパクと Cbm タンパクのコラーゲン結合ドメインのアミノ酸配列は 78% の相同性を示し、*cbm* 遺伝子の欠失変異株ではコラーゲン結合能が失われ、相補株ではコラーゲン結合能の回復が認められた。

【考察】

コラーゲン結合能を有する *S. mutans* は約 13% の割合で存在し、Cnm タンパク以外にも Cbm タンパクが存在していることがわかった。また、Cnm タンパクは血清型 *f* に、Cbm タンパクは血清型 *k* の株に多く存在することから、これらの血清型株は血液中での病原性が高い可能性が示唆された。

休憩 (17:00 ~ 17:10)

(17:10～17:40)

1) 「アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構」

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

竹立 匡秀

プリン代謝産物の一つであるアデノシンは、アデノシン受容体を介して神経系や脈管系、免疫反応などの制御に積極的に関与していることが知られている。近年、アデノシン受容体サブタイプのひとつであるA1アデノシンレセプターが、破骨細胞の成熟に重要な役割を担うことが報告された。しかしながら骨芽細胞におけるアデノシンの作用については全く情報がなかった。そこで我々は、細胞外アデノシンの産生酵素であるCD73 (ecto-5'-nucleotidase) に着目し、同分子ノックアウトマウス (CD73KO) を用いた解析から、同分子により産生されたアデノシンが骨芽細胞の分化を促進的に制御することで骨の恒常性維持に積極的に関与していることを明らかにした。

まず我々は、CD73KOの骨における表現型についてpQCTによる骨密度解析、mCTによる骨構造解析ならびに組織学的解析を行った。その結果、成体においてCD73KOの海綿骨骨量が野生型マウス (WT) に比べ有意に減少していることが明らかとなった。さらに、CD73KOにおいて血清中オステオカルシン濃度の低下、骨組織における骨芽細胞マーカー遺伝子の発現低下を認めたことから、CD73KOにおける骨量減少が骨芽細胞の機能低下に起因することが示唆された。そこでCD73KOおよびWTの頭蓋骨から骨芽細胞を採取、石灰化誘導培地を用いて培養を行い、それぞれの分化能について比較検討した。その結果、CD73KO由来骨芽細胞はWT由来細胞に比べ、アルカリフォスファターゼ (ALPase) 活性の有意な低下を認め、石灰化ノジュール形成の抑制を認めた。次に、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1にCD73遺伝子を導入し、CD73強発現MC3T3-E1 (MC/CD73) を作製したところ、同細胞はコントロールに比べ増殖能に変化を認めなかったが、分化誘導に伴う早期のALPase活性の上昇、骨シアロタンパク質 (BSP) およびオステオカルシン (OC) 両遺伝子の上昇、石灰化ノジュールの形成亢進を認めた。一方、MC3T3-E1細胞の分化誘導に伴いA2Aアデノシンレセプター (A2AAR) およびA2Bアデノシンレセプター (A2BAR) 遺伝子の発現上昇が認められた。そこで、CD73分子を介して産生されたアデノシンがいずれのレセプターを介して作用を発現しているのかについて受容体アンタゴニストを用いて検討した。その結果、A2AARアンタゴニストはMC/CD73で認められたBSP、OC両遺伝子発現の上昇に影響を与えなかったが、A2BARアンタゴニスト処理により、これら遺伝子の発現上昇は有意に抑制された。

以上の結果から、CD73分子により産生されたアデノシンはA2BARを活性化することにより、骨芽細胞の分化を促進的に制御していることが明らかとなった。

本研究結果より、これまでに全く報告のなかったCD73および同分子により産生されるアデノシンによる骨芽細胞分化調節機構を見出した。今後のさらなる詳細な機序の解明により、歯周病を含めた炎症性骨疾患の診断や、治療薬の開発につながる情報が得られるものと考えている。

(17:40 ~ 18:10)

2) 「Floating aerial blood mists in the operating room」

大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第一教室)

石濱 孝二

手術中に使用する電気メスや高速回転切削器具によりサージカルスモークやエアロゾルが発生することはよく知られている。しかしながら、手術内容、発生量、浮遊距離などについては詳細な検討がなされていない。本研究では、本学中央手術室において、換気用吸気口にとりつけたフィルターに付着する血液を指標とし、1～4週の間で同じフィルターを設置したままの累積調査と1例ずつフィルターを取り替えた術式別調査を行った。血液検出試験には4000倍希釈まで検出可能なロイコマラカイトグリーン法を用いた。術野からフィルターまでの距離は3.8～4.6mであった。

1週間、2週間、4週間フィルターを設置した累積調査では、血液検出試験の結果は26, 60, 143 dotsと陽性反応数が増加していた。また、術式別調査では33例中21例でフィルター上に血液を検出した。頸部郭清術、顎骨移動術、顎裂部骨移植術、口腔悪性腫瘍手術、口蓋形成術、口唇形成術など、すべての術式で陽性反応が認められた。出血量、手術時間と血液検出試験の陽性反応数は比例しなかった (Pearson's correlation test)。手術中に電気メスを使用した17例中16例で血液を検出し、また、高速回転切削器具を使用した10例中9例で血液を検出した。電気メスか高速回転切削器具のいずれかまたは両方を使用した場合、21例中20例が陽性反応を示し、逆に、いずれの器具も使用しなかった場合では、12例中11例が陽性反応を示さなかった。

手術中に使用した電気メス、高速回転切削器具と関連性が認められたこと、および、術野から4.6m離れているフィルターから血液を検出したことは、直接的な飛沫曝露は考えにくく、手術中に使用した電気メスや高速回転切削器具によってエアロゾル化した患者血液が浮遊したことを示唆する結果である。口腔外科領域では手術で高速回転切削器具や電気メス、レーザー、超音波器具を使用する術式が多く、術野から離れて従事している麻酔科医や看護師などの医療スタッフに対してもエアロゾル化した患者血液の吸入の可能性が考えられる。現段階で健康被害等の問題に直面している状況ではないが、本研究の結果は新たな感染症や病原微生物の出現が考えられた場合、院内感染対策、特に職業感染対策を講じる上で必要な情報であると思われる。

稿を終えるにあたり、本研究を忠実に遂行していただいた住岡聡先生、ならびに協力していただいた第一口腔外科医局員の先生方、中央手術室の看護師の皆様、そして数々のご助言を賜り、また血液検出試験も実施していただきました科学警察研究所第三生物研究室の櫻田宏一先生に厚くお礼申し上げます。

休憩 (18:10 ~ 18:15)

総会 (18:15 ~ 18:45)

閉会の挨拶 (18:45)

由良 義明

MEMO.....

MEMO.....