Sunstar Young Investigator Award [] [3]

金クラスターの光励起による細菌増殖抑制

北海道大学大学院・歯学研究科

宮田 さほり 先生

歯周基本治療による歯肉溝滲出液中のLDL,酸化LDL の変動

昭和大学歯科病院歯周病学講座

石塚 元規 先生

細菌が誘導する細胞骨格変化は細胞外基質中の潜在型 TGF-βを活性化する

広島大学 歯周病態学講座

吉本 哲也 先生

Platelet-rich fibrin (PRF) とヒト培養骨膜シートの複合化による相乗的骨再生促進効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野

堀水 慎 先生

骨芽細胞および歯根膜幹細胞を用いた二層細胞転写羊膜 の作製

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

赤澤 惠子 先生

座長 新潟大学 大学院医歯学総合研究科 口腔生命福祉学専攻口腔生命福祉学

山崎 和久 先生

平成27年9月12日(土)

C会場(31会議室)

13:10~14:10

SYIA-01

金クラスターの光励起による細菌増殖抑制

宮田 さほり

2504

キーワード:金クラスター、光殺菌治療 (aPDT)、活性酸素

【目的】金クラスター (Au₂₅(SR)₁₈, 径0.9nm) は金原子25個からなるナノ物質で、光励起することで活性酸素の一種である一重項酸素を生成する。本研究では金クラスターの光殺菌治療への応用を目指し、金クラスターを歯科用光照射器により光励起した際の細菌及び生体細胞に対する増殖抑制効果を評価した。

【材料および方法】金クラスターは、塩化金酸とグルタチオンの混合溶液に、水素化ホウ素ナトリウム還元剤を添加して作製した。光照射器にはペンキュアー (モリタ,1000mW/cm², 420-480nm) を使用した。まず金クラスターの培地への添加 (0, 5, 50, 500 μ g/ml) と光励起 (1分間) が S. mutans に与える影響を SEM 観察,LIVE/DEAD 染色,濁度測定,CCK-8 Assay,Lactate Assay にて評価した。同様に金クラスターの光励起がMC3T3-E1細胞の初期付着と増殖に与える影響を SEM 観察及び CCK-8 Assay にて評価した。

【結果および考察】金クラスターの光励起はS.mutansに対してコロニー形成を抑制, 死菌を増加させた。濁度測定, CCK-8 Assay, Lactate Assayでは金クラスター濃度依存的に抑制が見られ, 細菌増殖は50%程度まで有意に減少した。また, E1細胞の付着には影響しなかったが, 増殖はコントロールの50%程度まで有意に抑制された。金クラスターは歯科用光照射器による短時間の光励起でも抗菌効果を示すほどの活性酸素を生成したと考えられた。

【結論】金クラスターを歯科用光照射器により光励起すると、細菌及び生体細胞の増殖抑制効果を示した。

SYIA-03 2504 細菌が誘導する細胞骨格変化は細胞外基質中の潜在型 TGF-βを活性化する

吉本 哲也

キーワード:潜在型 TGF-β, 歯肉上皮細胞

【目的】歯肉溝滲出液中のTGF-βは炎症時において増加することか ら、歯周病の病態に関わることが報告されている。したがって、どの ような機序で増加するかを明らかにすることは病態の解明につなが る。Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) は歯肉上皮細胞の TGF-β受容体を活性化する (Yoshimoto et al, 2014)。TGF-βは潜在 型 TGF- β として産生され細胞外基質にプールされる。TGF- β が働く ためには潜在型から活性型 $TGF-\beta$ が解放される反応が必要であり、 この反応の一つに細胞骨格の変化がある。本研究は、Aaが歯肉上皮 細胞に侵入する際の細胞骨格の変化がこの活性化反応を生じると仮説 を立てた。そこで、Aaの細胞内侵入に重要な因子である分子量29kD の outer membrane protein (Omp29) を刺激的に用いて検証した。 【方法】不死化ヒト歯肉上皮細胞 OBA9 (大阪大学, 村上伸也教授から 供与) をrecombinant Omp29で刺激した。経時的に刺激後,上清中 の潜在型,活性型 TGF-βをELISA 法で測定した。blebbistatin(ミ オシンⅡ阻害剤)あるいはcytochalasin D(アクチン重合阻害剤)存在 下で刺激後, Deoxycholateで培地から細胞を除去し細胞外基質中の活 性型 TGF-βを Westem Blotting 法で解析した。

【結果】Omp29刺激30分後、上清中の潜在型 TGF- β は変化がなかったが、活性型 TGF- β は増加した。blebbistatin、cytochalasin Dは Omp29刺激によって減少した細胞外基質中の活性型 TGF- β を回復した。

【結論】Omp29によって誘導されるOBA9の骨格変化に伴い、細胞外基質中の潜在型 TGF- β に活性化反応が生じ上清中の活性型 TGF- β が増加した。本研究の結果は細菌感染と TGF- β の新しい知見であり歯周病病態解明につながることが示唆された。

SYIA-02

歯周基本治療による歯肉溝滲出液中のLDL、酸化LDL の変動

2504

石塚 元規, 守屋 佑美, 野口 江美子, 小出 容子, 山本 松男

キーワード:歯肉溝滲出液, LDL, 酸化LDL

【目的】LDLや酸化LDLは動脈硬化症の危険因子であり、歯周病との関連が注目されている。当研究室ではこれまでに、健全歯周組織の歯肉溝滲出液(GCF)中にLDL、酸化LDLが存在することを初めて見出し、糖尿病患者GCF中のLDL、酸化LDL濃度が健常者に比べ、有意に高いことも報告している。LDLと酸化LDLは歯周病の病態と相関することが推測され、歯周病診断の新たなマーカーとなりうる可能性がある。そこで本研究では、歯周基本治療[スケーリング・ルートプレーニング(SRP)]によるGCF中のLDL、酸化LDL変動を解析した。

【材料および方法】昭和大学歯科病院歯周病科に通院する慢性歯周炎患者を対象に、GCF採取を行った。糖尿病、脳・心臓疾患、悪性腫瘍、骨粗鬆症の患者は対象者から除外した。GCFは、同一被験者から健全部位(PD < 3mm、BOP (-))と歯周病罹患部位(PD ≥ 4mm)を上顎前歯・小臼歯部より選択し、歯周治療開始前、SRP処置後4、8週後にそれぞれペーパーポイントを用いて採取を行った。GCF中のLDLと酸化LDLの測定は、抗ねpoB抗体、抗酸化PCモノクロナール抗体を用いてサンドイッチELISA法にて行った。なお、本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会承認の下遂行した(承認番号2014 - 006号)。【結果および考察】歯周病罹患部位から採取したGCF量、GCF中のタンパク濃度およびLDL・酸化LDLの濃度は、健全部位に比べ高値を示した。また、SRP処置後4週の時点で、GCF中のLDLおよび酸化LDL濃度は減少した。これらの結果より、GCF中のLDLおよび酸化LDL。歯周病に伴う歯周組織の傷害の状態を示すマーカーとして有用性が示唆された。

SYIA-04

Platelet-rich fibrin (PRF) とヒト培養骨膜シートの 複合化による相乗的骨再生促進効果

3103

堀水 慎

キーワード:培養骨膜シート, Platelet-rich fibrin

【目的】これまで我々は顎顔面領域の骨再生療法において培養骨膜シートとともにPlatelet-rich plasma(PRP)を移植し、顕著な治療成果を挙げてきた。近年、その操作性を向上させたPlatelet-rich fibrin(PRF)が開発され、臨床応用が進んでいる。PRFは血小板とその増殖因子をPRPと同様に多く含むフィブリンゲルであることから、我々はPRFをスキャホールドとして培養骨膜シートを複合化することを着想し、in vitroおよび動物移植モデルにおいて有効性を検証した。

【材料および方法】ディッシュ上で14日間組織片培養したヒト培養骨膜シートをヒトPRF上に静置し、さらに14日間培養後、組織学的に評価した。一方、この複合体をヌードマウス背部皮下および頭蓋骨骨欠損部へ移植し、骨再生能を組織学的、X線学的に評価した。

【結果および考察】in vitroではPRF内部に骨膜シート由来のALP陽性細胞が侵入し、細胞周囲のコラーゲン沈着と石灰化物形成の増加がみられた。マウス背部皮下に移植したPRFは分解され、厚いコラーゲン層に置換されていた。骨欠損部では、複合体移植部周囲のPCNA陽性細胞と血管数が増加し、骨膜シート単独移植と比較して骨新生の促進が認められた。この結果から、PRFの増殖因子と細胞接着性が骨膜シートの細胞増殖・分化を促進し、骨再生機能の向上に寄与することが示唆された。

【結論】PRFとヒト培養骨膜シートの複合化は、歯周組織の骨再生療法における優秀な移植材料となることが期待された。

SYIA-05

骨芽細胞および歯根膜幹細胞を用いた二層細胞転写 羊膜の作製

2504

赤澤 惠子

キーワード:組織工学,幹細胞,再生

【目的】近年、組織工学的手法の発展により、培養細胞と移植担体を組み合わせる様々な方法が開発されている。我々は半導体作成などに用いられる「光リソグラフィー」技術を応用することにより細胞を担体表面へ転写する「細胞転写技術」を開発し、動物モデルにおける再生治療への応用の可能性を報告してきた。本技術の応用範囲の拡大の可能性を検討するため、間葉系幹細胞と骨芽細胞の二種類の異なる細胞を転写し、二層の細胞層を有する細胞転写移植担体を作成することを本研究の目的とした。

【材料と方法】健全抜去歯より得られた歯根膜を酵素処理し歯根膜幹細胞を培養した。ヒト頭蓋骨由来骨芽細胞(ScienCell社)を購入し実験に用いた。歯根膜幹細胞はアデノウィルスを用いてGFP遺伝子導入を行い、骨芽細胞のラベルにはPKH26を用いた。細胞転写基板としてガラス基板上にtetraethylene glycol層を作製し、UV照射により基板表面を細胞接着面とした。細胞転写用の担体として脱細胞処理を施したヒト羊膜を使用した。転写状態の検討は蛍光顕微鏡下および凍結切片の観察により行った。

【結果と考察】歯根膜幹細胞と骨芽細胞が二層となった転写基板上を 羊膜にさらに転写することにより、生体内に移植可能な細胞を得るための至適条件を検討した。その結果、転写基板に歯根膜幹細胞を播種 した2.5時間後に骨芽細胞を播種し、その30分後に二層となった細胞 付着基板を羊膜上に載せ、5時間後に基板を除去することで、効率よく細胞を羊膜上に転写できることが明らかとなった。

【結論】細胞転写技術を用いて異なる細胞を二層構造を保ちながら生体に移植することが可能となり、新たな再生医療方法として役立つことが示された。