

# 一般演題口演

(B会場・D会場)

B 会 場

O-01～04

O-10～31

D 会 場

O-05～09

10月15日（金） B会場 9：10～ 9：50, 13：30～14：30  
14：50～16：20  
D会場 9：10～10：00

10月16日（土） B会場 13：10～14：20

## O-01

マウス実験的歯周炎の進行期および治癒期におけるマクロファージ表現型の極性転換に関する研究

宮下 幸大

キーワード：実験的歯周炎、治癒モデル、サイトカイン、歯槽骨吸収、マクロファージ

【目的】近年マクロファージ (MΦ) はM1型 (炎症型) およびM2型 (抗炎症型) の2つの表現型が報告され、特にアルギニンを基質とする対照的な2つの代謝酵素である誘導型NO合成酵素 (iNOS) とアルギナーゼ (Arg) -1が、それぞれM1-MΦおよびM2-MΦマーカーとして知られる。本研究の目的は、マウス実験的歯周炎の進行期および治癒期における、MΦ表現型の経時的な動態を解明することである。

【材料と方法】C57BL/6Jマウスを3群に分けた：対照 (C) 群、歯周炎 (P) 群、および治癒 (H) 群。歯周炎惹起のため、P群とH群の上顎第二臼歯に糸を結紮した。さらにH群は結紮3日後に糸を除去し歯周組織の治癒を誘導した。実験開始からC群は0日目、P群は1, 3, 5, 7日目 (P1, P3, P5, P7)、またH群は5, 7日目 (H5, H7) に上顎サンプル採取を行った。左側は骨構造解析と遺伝子発現解析、右側はHE染色と免疫染色を行った。

【結果】骨構造解析において、骨密度は結紮後に経時的な減少を示し、H群では同時点のP群と比較して大きかった。HE染色像において、P群は接合上皮の潰瘍形成、炎症性細胞浸潤の増加を認め、一方H群は、炎症反応の軽減および付着の回復を認めた。遺伝子発現解析においてIL-6はP1群、IL-1βはP3群、iNOSはP7群でピークを示した。一方IL-10およびArg-1はH7群で有意に増加した。iNOS/Arg-1の発現も結紮により増加し、除去で有意な減少を示した。免疫染色によるiNOS<sup>+</sup>/Iba-1<sup>+</sup>陽性細胞数はP群で増加し、H群では減少した。対照的にArg-1<sup>+</sup>/Iba-1<sup>+</sup>陽性細胞数はP群で減少し、H群では増加した。

【結論】iNOSとArg-1の発現の変化が歯周炎の病態と経時的に一致しており、それらが歯周組織の炎症および治癒の状態を反映するマーカーであることが示された。

## O-02

歯周感染が子宮組織に及ぼす影響のマウス糸結紮歯周炎モデルにおける免疫学的検討

永田 千晶

キーワード：歯周感染、不妊、子宮

【目的】不妊の原因として、年齢や男女の生殖機能異常等が挙げられる。一方、器質的な異常を確認できない原因不明不妊が不妊症全体の約1/3を占めると報告されている。近年、歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis* (Pg) の感染が妊娠成立に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている。しかし、歯周病原細菌の感染が子宮組織に及ぼす影響は不明である。本研究では、マウス歯周炎モデルを用いて、歯周感染が子宮組織に及ぼす影響について免疫学的に検討した。

【材料と方法】マウス歯周炎モデル (C57BL/6J, 雌性, 9週齢) は通法に従い、上顎両側第二大臼歯に5-0糸を結紮し、Pg W83株 (1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL, 0.2mL) を週3回糸に浸透させ歯周感染を惹起した (岡山大学動物実験委員会: OKU-2019484)。歯周炎誘導から4週間後に歯周組織と子宮組織を摘出した。組織中の炎症性サイトカインの遺伝子発現は定量性real-time PCR法を用いて評価した。子宮組織は、組織学的解析 (H-E染色, 免疫染色) とFACS解析で、CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T細胞の動態を評価した。統計解析は、Student-*t*検定を用いた。

【結果と考察】歯周炎群では、対照群 (無処置) と比較して、子宮組織中のFoxp3<sup>+</sup>T細胞の割合が有意に上昇した (p<0.05)。また、子宮組織中の*Tnf-α*の発現が有意に抑制 (p<0.05) された。一方、*IL-6*の発現は亢進する傾向がみられた。以上の結果から、歯周感染が子宮組織の免疫バランスを崩して、妊娠成立に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## O-03

血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性は炎症誘導性VCAM-1発現制御が破綻することで歯周炎増悪に寄与する

瀬々 起朗

キーワード：血管内皮細胞、糖尿病関連歯周炎、VCAM-1、PI3K-Akt経路

【目的】糖尿病患者の歯周病罹患率は高く、疾患が重症化しやすい。また、近年の基礎研究では糖尿病では歯肉局所においてもインスリン抵抗性 (IR) が惹起されることが明らかとなっている。一方で、歯肉構成細胞におけるIRがどのように歯周炎増悪に寄与するかは明らかでない。そこで歯周組織感染に応答した炎症細胞浸潤に重要な役割を果たす血管内皮細胞に着目し、インスリンが同細胞における炎症誘導性白血球接着因子 (CAMs) 発現を制御するかを検討し、血管内皮細胞のIRが糖尿病関連歯周炎病態に寄与するメカニズムを探索することとした。

【方法】マウス腎小血管内皮細胞株 (TKD2) を用いて、*E. coli* LPS (10ng/ml) およびTNFα (10ng/ml) 誘導性CAMs発現に対するインスリンの作用をqPCR・Western blot (WB) 法で検討した。PI3K-AktおよびErk経路の活性化阻害剤 (wortmannin, PD98059) を用いてその作用の依存経路を検討した。機能評価として、ヒト単球由来細胞株THP-1とTKD2細胞の細胞接着試験を行った。

【結果】インスリン前処理したTKD2細胞では、*E. coli* LPS及びTNFα刺激によるVCAM-1のmRNA及びタンパク発現は有意に抑制されたが、それ以外のICAM-1やE-selectinなどのCAMsの発現には変化は見られなかった。このインスリンによる効果はwortmanninを添加すると有意に減弱したが、PD98059では変化が見られなかった。各種条件のVCAM-1の発現動態を反映し、THP-1細胞とTKD2細胞間の細胞接着はインスリン刺激によって制御され、wortmanninでその制御は減弱した。

【考察】血管内皮細胞のIRは炎症誘導性VCAM-1発現制御の破綻により、炎症細胞接着・浸潤が亢進することで歯周炎増悪に寄与することが示唆された。

## O-04

実験的歯周炎により2型糖尿病モデルKK-A<sup>y</sup>マウスの糖尿病性腎臓病は増悪する

佐藤 晃平

キーワード：糖尿病性腎臓病、実験的歯周炎、2型糖尿病

【背景】本邦において慢性腎臓病 (CKD) 罹患患者数は約1300万人と推定され、糖尿病を原疾患とする糖尿病性腎臓病 (DKD) がその約4割を占める。過去の臨床研究より、歯周病の進行と高値HbA1cはそれぞれ独立した腎機能低下のリスク因子となることが示唆されており、重度歯周炎によってDKD病態が増悪することが考えられる。一方で、実際に歯周病によってDKDが増悪するかを実証した基礎研究は行われていない。そこで、DKD動物モデルを用いて、実験的歯周炎によりDKD病態に進行が見られるかどうかを検討した。

【方法】2型糖尿病モデルKK-A<sup>y</sup>マウスおよびC57BL/6マウス (対照群) のオスを用いた。13週齢時に上顎第二臼歯への6-0糸結紮を行い、歯周炎群と非歯周炎群を設定した。3週間後に採尿を行い屠殺し、歯槽骨吸収の確認と腎臓切片を作製し病理像を評価した。尿中アルブミン、クレアチニン、リポカリン2 (LCN2) 濃度を測定後、腎機能低下指標である尿アルブミン・クレアチニン比 (UACR) および、腎障害の程度を示す尿中LCN2・クレアチニン比を算出した。

【結果】KK-A<sup>y</sup>・C57BL/6マウスのいずれにおいても結紮の維持による体重・血糖値・血圧への影響は見られなかった。KK-A<sup>y</sup>マウスの歯槽骨吸収はC57BL/6マウスよりも有意に亢進していた。KK-A<sup>y</sup>マウスでは、非歯周炎群よりも歯周炎群で有意な糸球体サイズの増大・メサンギアル領域の拡大・糸球体線維化の亢進が見られ、有意なUACRの上昇とLCN2・クレアチニン比の増加を認めた。

【考察】2型糖尿病モデルKK-A<sup>y</sup>マウスにおいて、実験的歯周炎で腎機能障害が増悪する可能性が考えられた。歯周病は血糖と独立したDKDのリスク因子となり得る可能性が、動物実験の結果からも示唆された。

## O-05

細胞内グルコース飢餓によるヒト歯肉線維芽細胞の創傷治癒とストレスに及ぼす影響

李 潤伯

キーワード：歯肉、線維芽細胞、グルコース、創傷治癒

【目的】ヒト歯肉線維芽細胞（HGnFs）は、活発な細胞増殖と遊走により歯肉組織の恒常性を維持している。とくに、歯肉外科手術直後の治癒において、グルコース等の栄養素の供給が不十分な環境下でも、歯肉組織の創傷治癒能力は維持されていると考えられている。しかし、このようなグルコース不足の環境がHGnFsの創傷治癒と細胞ストレスに与える影響は明らかでない。本研究では、低グルコース環境がHGnFsに与える影響を検討することを目的とした。

【材料と方法】HGnFsを100, 50, 25, 0mg/dLのグルコース濃度で培養し、細胞増殖と遊走およびI型コラーゲン合成を検討し、歯肉創傷治癒について評価した。さらに、乳酸とLactate dehydrogenase (LDH) およびReactive oxygen stress (ROS) のレベルを測定することにより、低グルコース環境におけるHGnFsに対するストレスレベルを検討した。また、低グルコース環境における糖代謝の評価としてHGnFsのGLUT1の発現とグルコース取り込み量について検討した。

【結果と考察】短期間の低グルコース環境（50mg/dL）はGLUT1を介してグルコースの取り込み量を促進することによって、細胞増殖、遊走およびI型コラーゲン合成を促進することが認められた。しかし長期間の低グルコース環境では細胞増殖、I型コラーゲン合成を抑制することが明らかになった。また、HGnFsの乳酸、LDHおよびROSレベルが上昇することが認められた。

【結論】低グルコース環境はHGnFsの細胞ストレスを誘導することが明らかになった。また低グルコース状態において、HGnFsはグルコースの取り込みを促進することによって創傷治癒能力を活性化することが示唆される。

## O-07

歯肉組織の細胞老化について ～若齢および老齢マウスと培養ヒト歯肉線維芽細胞における検討～

古川 匡恵

キーワード：細胞老化、過酸化水素、慢性炎症、歯肉組織、歯肉線維芽細胞

【背景と目的】様々な組織や臓器の老化が病気の発症と関連することが示唆されている。歯肉組織の老化も慢性歯周炎の発症や進行に関係していると考えられる。しかし、歯肉組織の老化を細胞・分子レベルで解明することは十分にできていない。本研究では加齢マウスの歯肉組織および培養ヒト歯肉線維芽細胞における老化について分子生物学的に詳細に解析した。ついで、老化細胞除去剤（senolytic drug）による歯肉組織老化の制御の可能性について検討した。

【材料と方法】10週齢および20ヶ月齢のC57BL/6NCrlマウスの歯肉組織および歯肉線維芽細胞（MGF）の老化を老化関連β-ガラクトシダーゼ（SA-β-gal）染色およびp16発現によって評価した。加えて、同組織におけるM1/M2マクロファージの動態および各種コラーゲンmRNAの発現を解析した。次に、正常ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）における老化を長期継代または過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）による刺激によって誘導し、SA-β-gal染色およびp16, p21, IL-1βおよびTNF-αのmRNA発現によって評価した。老化細胞除去剤ABT-263（Navitoclax）添加による老化歯肉線維芽細胞培養系の遺伝子発現の変化を解析した。

【結果と考察】20ヶ月齢マウスの歯肉組織およびMGFにおけるSA-β-gal陽性細胞の割合およびp16およびp21のmRNA発現レベルは、10週齢マウスの歯肉組織およびMGFに比べて有意に高かった。また、IL-1β, TNF-α mRNA発現量および総マクロファージ数とM1マクロファージ数は、若齢マウスの歯肉組織と比較して、老齢マウスの歯肉組織で増加していた。また、加齢マウスの歯肉組織では、コラーゲン1a1, コラーゲン4a1, コラーゲン4a2のmRNAの発現量が、若齢マウスの歯肉組織に比べて著しく低下していた。In vitroの実験では、9回の継代またはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で5日間処理したHGFのp16, p21, IL-1βおよびTNF-αのmRNA発現量も、対照細胞と比較して大幅に増加した。さらに、ABT-263の添加によって老化誘導HGF培養系におけるSA-β-gal陽性細胞が減少するとともに、IL-1βおよびTNF-α mRNAの発現が有意に抑制された。

【結論】加齢マウスの歯肉組織や長期継代およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激HGFにおいて、老化に伴う変化が観察された。また、senolytic drugによって歯肉組織由来細胞の老化が制御できる可能性が示唆された。

## O-06

RNAシャペロンであるHfqはAggregatibacter actinomycetemcomitansの病原因子を制御する

尾内 千晃

キーワード：Hfq, RNAシャペロン、歯周炎、sRNA、Aggregatibacter actinomycetemcomitans

【目的】Hfqは、非翻訳性RNAと結合して転写後の遺伝子発現制御に関与する細菌のRNAシャペロンであり、細菌のストレス耐性や病原性に関わる重要な調節因子として認識されている。しかし、歯周病細菌においては、その機能の解析例は少ない。本研究では、感染性心内膜炎の起炎菌でもあるAggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) のhfq欠損株を構築し、宿主細胞への接着や感染におけるHfqの役割を検討した。

【材料と方法】Aa ATCC29523（親株）とhfq欠損株（相同組み換えにより作成）を用いた。宿主細胞には、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）およびマウス腹膜マクロファージを用いた。バイオフィームは、クリスタルバイオレット染色と走査型電子顕微鏡で評価した。HUVECとAaの共培養により、細胞内侵入数と遺伝子発現量の差を評価した。Aaをマウス腹膜マクロファージと共培養し、上清中の炎症性サイトカイン量を評価した。

【結果】親株に比べてhfq欠損株では、以下の所見を得た。バイオフィームの形成能が約30%減少していた。HUVECと共培養した際には細胞侵入能は50%程度減少した。さらにHUVECへ感染後の細胞接着に関わる遺伝子の発現量が有意に減少した。ヒトの免疫細胞を殺傷するロイコトキシン遺伝子の発現量は増加した。共培養したマクロファージからのTNF-αの産生量は290%増加した。

【考察と結論】RNAシャペロンであるHfqは、細胞接着関連遺伝子を制御し、Aaの細胞侵入能に関与していることがわかった。

## O-08

メカニカルストレス誘導性CD40-CD40L相互作用の歯肉組織における機能解析

山本 優

キーワード：CD40-CD40L、歯根膜細胞、セメント芽細胞、歯肉組織リモデリング

【目的】CD40は歯根膜細胞上に恒常的に発現しており、咬合力のような生理的メカニカルストレスにより発現が上昇することが明らかになっている。我々はこれまでに、歯肉組織に矯正力を付与すると、牽引側においてセメント芽細胞にCD40 Ligand (CD40L) の発現が誘導されることを明らかにしている。しかしながら、メカニカルストレス誘導性CD40Lの歯肉組織における機能は未だ不明である。そこで本研究では、メカニカルストレス誘導性CD40-CD40L相互作用が歯肉組織において果たす機能について解析した。

【材料および方法】CD40L導入ヒトセメント芽細胞（CD40L-HCEM）、ヒト歯根膜幹細胞並びにヒト歯根膜線維芽細胞を実験に用いた。コントロールには、empty vector導入HCEM（HCEM）を用いた。これらの細胞を共培養した後、細胞毒性をヨウ化プロピジウム（PI）染色、細胞増殖能をBrdUアッセイ、石灰化関連遺伝子及び細胞外マトリックス（ECM）関連遺伝子の発現をReal-Time PCR法にて検討した。（遺伝子組換え実験承認番号：3928-2）

【結果】CD40L-HCEMと歯根膜線維芽細胞を共培養した群では、HCEMと歯根膜線維芽細胞を共培養した対照群と比較して、細胞の生存及び増殖は上昇したが、石灰化関連遺伝子並びにECM関連遺伝子の発現に変化は認められなかった。一方、CD40L-HCEMと歯根膜幹細胞を共培養すると、HCEMと歯根膜幹細胞を共培養した対照群と比較して、細胞の生存及び増殖に変化は認められなかったが、石灰化関連遺伝子及びECM関連遺伝子の発現が有意に上昇することが明らかとなった。

【考察】歯根膜細胞上のCD40とセメント芽細胞上のCD40Lが相互作用することにより、細胞の生存、増殖及び硬組織形成細胞への分化が促進し、歯肉組織のリモデリングが誘導されることが示唆された。



## O-09

NAD<sup>+</sup>依存性のミトコンドリアの異常が老化歯根膜における酸化ストレスに及ぼす影響

橋本 康樹

キーワード：歯根膜細胞、活性酸素、ミトコンドリア、Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)、β-Nicotinamide mononucleotide (β-NMN)

【目的】酸化ストレスは高齢者の慢性炎症性疾患の大きな要因と考えられている。歯周病においても、歯肉溝滲出液中の活性酸素(ROS)代謝産物の増加が報告されており、酸化ストレスによる歯周組織の炎症への関与が強く示唆されている。しかしながら、加齢がどのように歯根膜の酸化ストレスに影響を及ぼしているかについては、未だ十分に明らかとなっていない。近年、加齢に伴う生体内NAD<sup>+</sup>の減少が、ミトコンドリア機能低下の原因の一つであることが明らかとされている。そこで本研究では、老化歯根膜細胞におけるNAD<sup>+</sup>活性とミトコンドリアの動態について解析するとともに、NAD<sup>+</sup>補充による酸化ストレス制御の可能性について検討した。

【材料と方法】ヒト歯根膜細胞 (HPDL) に複製老化を誘導した老化HPDLと正常HPDLの細胞機能を比較、検討した。ミトコンドリアの動態については電顕とJC-1標識による観察を行い、細胞内NAD<sup>+</sup>、ROSについてはELISA、蛍光標識にて評価した。そして、NAD<sup>+</sup>前駆体であるβ-NMNの投与により、NAD<sup>+</sup>補充の及ぼす影響を検討した。また、NMNを投与した老齢マウス歯周組織における歯根膜の酸化ストレスについてROSの蛍光染色にて評価した。

【結果と考察】老化HPDLにおいてはNAD<sup>+</sup>の減少が認められた。NMN処理により膜電位が脱分極した異常ミトコンドリアが減少するとともに細胞内ROSが減少した。NMNを投与したマウスにおいては、歯根膜のROSの減少が観察された。

【結論】加齢によるNAD<sup>+</sup>の低下は、老化歯根膜の酸化ストレスの大きな要因の一つであるが、有効な治療標的となりうることが示唆される。

## O-11

## 歯肉線維芽細胞由来液性因子によって誘導されるmicroRNAは間葉系幹細胞の骨分化を制御する

岩田 倫幸

キーワード：間葉系幹細胞、歯周組織再生、歯肉線維芽細胞、マイクロRNA

【目的】間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を有しており、MSC移植による歯周組織再生療法が検討されている。移植されたMSCは、移植局所での分化過程において歯周組織構成細胞から分泌される液性因子によって制御されている可能性が考えられる。そこで、本研究では歯周組織構成細胞のうち歯肉線維芽細胞(HGF)に着目し、HGFから分泌される液性因子がMSC骨分化に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】MSCの単独培養および非接触でHGFとの共培養を行ない、未分化MSC特徴的転写因子のmRNAレベルおよびmicroRNA発現をReal-time PCRによって検討した。さらに、特徴的な発現を示したmicroRNAの発現調整を行ない、MSCの骨分化誘導時における骨分化関連遺伝子発現および石灰化を検討した。

【結果および考察】HGFの分泌する液性因子は、未分化MSCに特徴的な転写因子であるETV1 mRNA発現を増加させた。また、HGFとの共培養での骨分化誘導によって、MSCのオステオカルシン(OC)およびBMP2発現を減少させた。microRNA発現レベルを比較したところ、miR-101-3pとmiR-210の発現が特徴的に誘導された。また、miRNA mimicを用いたmiR-101-3pおよびmiR-210の過剰発現によって、OC発現の抑制およびBMP2発現の亢進、石灰化の抑制が生じた。これらのことから、HGFの分泌する液性因子はMSC移植局所において、miR-101-3pおよびmiR-210を介して、MSCの骨分化を抑制している可能性が示唆された。

## O-10

## 歯周組織におけるリンパ管の役割

松本 修治

キーワード：歯周組織、リンパ管、透明化、創傷治癒

【目的】歯周組織の再生初期過程においては血管新生が誘導されることが重要である。一方で、様々な組織のリンパ管は、組織損傷後の線維化を防止し、正常な治癒を促進することが近年示されている。しかしながら、歯周組織におけるリンパ管の三次元的なネットワークやその創傷治癒における役割はほとんど解明されていない。そこで、本研究ではレポーターマウスと組織透明化技術を応用し、リンパ管の動態や創傷治癒における役割を検討することを目的とした。

【材料と方法】リンパ管の観察を行うためにProx1-tdTomatoマウスを使用した。同マウスの組織学的解析に加えて、whole-mount法および組織透明化法を応用し、共焦点顕微鏡およびライトシート顕微鏡にて観察した。ついでマウス組系結紮モデルを作製し、結紮除去後における創傷治癒過程を経時的に解析した。さらにRNAscope *in situ* hybridizationによりVegf mRNA発現細胞を同定した。加えて歯肉由来リンパ管内皮細胞をセルソーターにて単離し、3次元培養を行った。【結果と考察】組織学的解析により歯肉結合組織部においてリンパ管の密なネットワーク形成が確認され、そのネットワークは創傷治癒過程においてより密に再構築された。また、その増加は歯肉上皮細胞由来Vegfによって誘導されている可能性が示唆された。さらに単離したリンパ管内皮細胞は3次元培養を行うことでネットワーク形成することが観察された。

【結論】歯周組織においてリンパ管ネットワークが歯肉に存在しており、創傷治癒過程において同ネットワークが増生し、組織の治癒を促進している可能性が示唆された。

## O-12

## 骨補填材としてのリン酸化プルラン/β-TCPコンビネーションマテリアルの応用

森本 康仁

キーワード：骨補填材、リン酸化プルラン、TCP

【背景・目的】多糖体であるリン酸化プルラン(PPL)は、リン酸残基にCa<sup>2+</sup>などの陽イオンを吸着して骨と接着する可能性、ならびに、骨補填材の保持を容易にし、様々な骨欠損形態に使用できる可能性が推察される。そこで本研究では、PPLとβ-TCPを混和した新規コンビネーションマテリアルが、他材に比べて優れた骨形成能、また、新規的な骨誘導メカニズムを有するか組織化学的に検索した。

【材料・方法】生後10週齢Wistarラット脛骨に直径2mmの骨欠損を作成し、PPL、β-TCP、PPL+β-TCPを埋入した。埋入1, 2, 4週間後の骨欠損部で、各種免疫組織化学およびEPMAによる元素マッピングを行った。また、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞をPPL存在下で培養し、ALPやIntegrinαV発現量をreal time-PCRで解析した。

【結果】PPL表面にALP陽性骨芽細胞が局在し、直接、新生骨が形成されていた。EPMA解析では、PPL表層にCa/P元素が局在し、針状の石灰化結晶が形成される一方、osteopontinなどの骨基質蛋白が局在していた。また、血管内皮細胞や骨芽細胞などがPPL内部に侵入するだけでなく、TRAP/cathepsin K陽性破骨細胞がPPL上に局在する像も認められた。骨基質維持に関しても、β-TCP単材よりもPPL+β-TCP群で良好な成績が得られた。また、MC3T3-E1細胞培養におけるPPL投与群ではALPおよびIntegrin αVは経時的に上昇したが、control群と有意差は付かなかった。

【考察・結論】PPLはリン酸基にCa<sup>2+</sup>やosteopontinなどの骨基質タンパクを吸着・濃縮する特異性を有し、β-TCPとの併用でPPLに、直接、骨形成を誘導する新規の足場材として機能する可能性が推測された。

## O-13

抗菌光線力学療法の殺菌効果と細胞毒性に関する *in vitro* 研究

吉川 佳織

キーワード：抗菌光線力学療法, 殺菌効果, 細胞毒性

【目的】抗菌光線力学療法 (a-PDT) においては、これまでに様々な光感受性物質 (PS) とレーザー波長の組み合わせによるシステムが報告されている。しかし、臨床応用を前提としたPSの濃度とレーザー照射時間下での有効性と安全性についての詳細は不明である。本研究ではPSの濃度およびレーザー照射時間が殺菌効果と細胞毒性に及ぼす影響について *in vitro* で検討した。

【材料と方法】*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, およびマウス線維芽細胞様細胞株L929細胞に対し、無処理, PS添加, レーザー照射, a-PDTの各種処理を行った。PSはmethylene blueまたはtoluidine blue Oを使用し, 各PSに対応する半導体レーザー, Periowave™ およびPACT®300を組み合わせてa-PDTを行った。

【結果と考察】*A. actinomycetemcomitans* に対しPSを添加したところ, 濃度依存的に細菌生存率が減少した。無処理と比較して各処理群では有意な細菌生存率の減少を認め, 特にa-PDTは最も強い殺菌効果を示した。また, その効果は照射時間依存的に増加した。L929細胞においても同様, PS濃度依存的に細胞生存率が減少し, 無処理と比較して各処理群では有意な細胞生存率の減少を認めた。また, a-PDTは他の処理群と比較し細胞毒性が強い傾向を示し, その効果は照射時間依存的に増加した。今後は *in vivo* でもこれらの条件を組み合わせ, 適切な条件を検討する必要があると考えられる。

## O-14

なぜ口腔細菌の誤嚥で肺炎が悪化するのか? —菌周病原菌によるMUC5AC発現とムチン産生の誘導—  
渡辺 典久

キーワード：菌周病, 肺炎, ジンジバイン

【背景及び目的】近年, 周術期口腔機能管理の重要性が高まり, 医科歯科連携による口腔ケアが広く行われている。特に有病者においては, 術後の摂食嚥下機能の低下により口腔細菌を含んだ唾液や食物残渣を誤嚥する機会が多く, 誤嚥性肺炎発症のリスクも高い。しかし, 口腔細菌がどのように肺炎の発症に関与しているのか, なぜ肺炎の予防に口腔ケアが有効なのかは解っていない。呼吸器におけるムチンの過剰産生は喀痰過多の原因となるのみならず, 気管支の狭窄をもたらすことから呼吸機能の低下に繋がる。そこで今回, 口腔細菌がムチンのコア蛋白であるMUC5ACの発現を誘導するのではないかと考え本研究を企画した。

【方法と結果】*P.g.* 培養上清は呼吸器上皮細胞株において濃度依存的にMUC5ACの発現を誘導した。本作用は, *P.g.* の病原因子 (LPSと線毛) では認められなかったことから2種類のジンジバイン (KgpとRgp) に着目した。ジンジバイン欠損株を用いた実験から, *P.g.* によるMUC5ACの発現には特にRgpが深く関与していることが明らかとなった。同様の結果は, プライマリー気管支上皮細胞を用いた実験においても認められた。さらに, マウスに*P.g.* 培養上清を誤嚥させた結果, マウス肺においてもMUC5ACの発現とムチンの産生が*P.g.* により強く誘導された。

【考察】我々はこれまでに, 菌周病原菌が肺炎球菌等の受容体と炎症性サイトカインを誘導することを見出しているが, 今回新たに, *P.g.* がジンジバインを介してMUC5ACの発現を誘導し, ムチンの過剰産生を引き起こすことにより呼吸機能の低下に関与していることが示唆された。

## O-15

*Porphyromonas gingivalis*由来の内毒素による心疾患発症におけるToll様受容体4シグナルの重要性

松尾 一朗

キーワード：心疾患, TLR4受容体, リポポリサッカライド

【目的】グラム陰性桿菌*Porphyromonas gingivalis*は菌周病の主要な原因菌であり, その内毒素 (PG-LPS) と心疾患との関連が示唆されているが, そのメカニズム解明は不十分である。本研究では「PG-LPSによる心筋細胞に発現する toll-like receptor 4 (TLR4) への慢性刺激が心疾患を発症する」という仮説を立てた。

【方法】雄性マウス (C57BL/6/J, 12週齢) を用いてPBS投与群 (Control群), PG-LPS投与群 (0.8mg/kg/day, ip), TLR4遮断薬 (TAK242) 投与群 (3mg/kg/day, ip), TAK242 + PG-LPS併用投与群の4群を作成し, 4週後に生理学, 組織学, 分子生物学的解析を行った。

【結果】1) Control群に比較してPG-LPS群での心機能は低値を示したが, TAK242併用群ではその効果は有意に抑制されていた。2) Masson-trichrome染色による心筋線維化, TUNEL染色による心筋細胞アポトーシス陽性率はPG-LPS群では高値を示したが, TAK242併用群ではその効果は有意に抑制されていた。3) 心筋細胞内の線維化マーカーである $\alpha$ -SMA, アポトーシスのマーカーであるBCL-2はPG-LPS群で高値を示したが, TAK242併用群ではその効果は抑制されていた。

【結論】PG-LPSによる心機能低下のメカニズムとして, TLR4刺激に起因する心筋細胞の細胞死と置換性線維化が示唆された。

## O-16

## HERS細胞のセメント芽細胞への分化による菌周組織再生の可能性

高瀬 稔

キーワード：セメント芽細胞, 上皮間葉転換, apical bud, Hertwig上皮鞘

【目的】Hertwig上皮鞘 (HERS) は, 歯の発生において重要な役割を果たすが, HERS及びMalassezの上皮遺残 (ERM) が菌周組織の再生において果たす役割については未だよく分かっていない。我々はHERS/ERMの細胞動態に着目している。生涯にわたって伸び続けるマウスの下顎前歯の根尖部の組織幹細胞集団 (apical bud) はHERS/ERMに分化するので, これを細胞ソースとし, *in vivo* 実験系において移植後の動態を追跡した。

【材料及び方法】ドナーとなる細胞は, GFP遺伝子を導入した10日齢のC57BL/6-TG (CAG-EGFP) マウスの下顎前歯apical budから採取した。これを分散化して6週齢の野生型のマウス (C57BL/6) 上顎臼歯歯根膜に移植した。移植後1, 2, 4, 12, 24週にて動物を安楽死させ, サンプルを採取しホルマリン固定を行った。組織学的な形態については, 川本法による未脱灰凍結切片によって作製した標本をHE染色及び免疫組織染色法にて観察を行った。免疫染色法において1次抗体として, ウサギAnti-Osteocalcin, チキンAnti-GFP, 2次抗体として抗ウサギAlexafluor568抗体, 抗チキンAlexaFluor488抗体を使用し, GFPの緑色蛍光を頼りにHERS細胞の動態を追跡した。

【結果】移植手術後4週以降では, GFP陽性細胞が歯根膜腔内に埋伏されているのを確認した。GFP陽性細胞は, 歯根膜に接する固有歯槽骨表面, セメント質表面でのOsteopontin陽性を示していることから骨芽細胞, セメント芽細胞/セメント細胞に分化している可能性が示唆された。

【結論】HERS細胞は移植後, 上皮間葉転換を生じて, 骨芽細胞, セメント芽細胞/セメント細胞に分化することで, 菌周組織の再生に関与している可能性が示唆された。

## O-17

## 幹細胞移植による歯周組織再生療法における炭酸アパタイトの足場材としての有効性検証

川 崎 公 輔

キーワード：歯周組織再生療法，脂肪組織由来多系統前駆細胞，炭酸アパタイト

【目的】脂肪組織由来多系統前駆細胞（ADMPC）移植による歯周組織再生療法の有効性を向上させる足場材を選定することを目的とし，人工骨補填材である炭酸アパタイトのADMPC移植療法における有効性について検証した。

【材料と方法】ディスク状に成型した炭酸アパタイトあるいは細胞培養用プラスチックプレート上にてADMPCを培養し，ロダミン染色，ヘキスト染色後に細胞形態を蛍光顕微鏡にて観察する一方で，細胞内小器官を透過電子顕微鏡にて観察した。さらに，細胞増殖能については，ATPルシフェラーゼアッセイにて，硬組織形成細胞への分化能については，分化誘導培地で培養後に硬組織関連遺伝子の発現を解析した。

また，*in vivo*における検討として，イヌ実験の歯周病モデルに対し，炭酸アパタイトあるいはフィブリンゲルを足場材として自己ADMPCを移植した。移植6週後に顎骨を採取し，マイクロCT解析，組織学的解析により歯周組織再生効果を評価した。

【結果と考察】炭酸アパタイトの上で培養したADMPCは，プラスチックプレート上で培養したADMPCと比較し，細胞形態，細胞増殖能に有意な差を認めなかった。硬組織形成細胞への分化能は，炭酸アパタイト上での培養において有意に促進した。一方で，イヌ実験の歯周病モデルに対するADMPC移植実験において，フィブリンゲルを足場材として移植した群と比較し，炭酸アパタイトを足場材として移植した群では歯肉の陥没が抑制され，有意な歯槽骨再生効果を示した。

【結論】以上の結果から，炭酸アパタイトはADMPCの細胞機能を阻害することなく，高いスペースメイキング能力を有することでADMPC移植による歯周組織再生効果を向上させる足場材であることが示唆された。

## O-19

## 特定臨床研究：歯周炎を対象とした歯周組織再生剤（REGROTH®）と人工骨（Cytrans® Granules）の併用療法の安全性及び有効性の評価

北 村 正 博

キーワード：歯周組織再生，線維芽細胞増殖因子，炭酸アパタイト，フラップ手術

文書で同意が得られた歯周炎患者10名（男性1名，女性9名，同意取得時の平均年齢：47.4歳：31～61歳）における隣接面部のブロービングポケット深さ（PPD）が4mm以上で，深さが3mm以上の垂直性骨欠損を被験部位として，フラップ手術時に試験薬（歯周組織再生剤「リグロス®」）と試験機器（骨補填材「サイトランス®グラニュール」）を投与し，その臨床成績を，安全性を主要評価項目，有効性を副次評価項目として評価した。その結果，研究対象者10名に対して，プロトコールで規定した治療と術後のフォローアップが完遂された。主要評価項目である「試験薬および試験機器との関連が否定できない有害事象」は，試験薬および試験機器の投与後36週までの本研究の観察期間を通じて認められなかった。副次評価項目に関しては，術前に比べ試験薬および試験機器投与36週後の時点において，新生歯槽骨の増加（平均48.0%），臨床的アタッチメントレベル，PPD，ブロービング時の出血および歯肉炎症指数および歯の動揺度の改善が認められた。一方，角化歯肉幅と辺縁歯肉の退縮量は，術前と投与36週後の時点において変化を認めなかった。また，研究期間を通じて，試験機器の不具合や疾病等の発生を認めなかった

以上の結果から，重度歯周炎に対する「リグロス®」と「サイトランス®グラニュール」を併用した歯周組織再生療法の安全性と有効性が示された。

本研究は，大阪大学臨床研究審査委員会（CRB5180007）にて審査，承認後，特定臨床研究（臨床研究実施計画番号：jRCTs051190045）として実施された。

## O-18

## 歯周組織の破壊・治癒過程におけるCGRPの機能解析

竹 下 登

キーワード：CGRP，歯根膜神経，マウス糸糸結紮歯周炎モデル

【目的】カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）は感覚神経終末から分泌される37アミノ酸で構成される神経ペプチドである。CGRPは主に血管拡張作用を示すが，近年骨形成を促進するという報告がされている。我々は昨年の秋季日本歯周病学会学術大会において，CGRP刺激は歯根膜細胞における石灰化関連遺伝子の発現を上昇させ，硬組織形成細胞への分化を促進すると報告した。本研究では，*in vivo*におけるCGRPの機能を解析するため，マウス糸糸結紮歯周炎モデルを用いて，歯周組織の破壊・治癒過程におけるCGRPの発現動態の検討を行った。

【材料および方法】8週齢のマウス上顎第2臼歯に5-0糸糸を結紮し，7日間飼育した後に糸糸の除去を行い，その後7日後まで飼育した。糸糸結紮前，結紮後3，7，10，14日後のマウスのCT撮影および組織切片を作製し，HE染色および抗CGRP抗体を用いた免疫染色を行った。

【結果および考察】糸糸結紮前の生理的な状態では，CGRP陽性神経は，歯根膜全体におよそ均等な密度で認められた。糸糸結紮後3日目，急激な組織破壊により，結紮部直下の歯根膜のCGRP陽性神経が消失している像が認められた。結紮後7日目，結紮部直下の歯根膜にCGRP陽性神経が増加，集積している像が認められた。その後CGRP陽性神経は減少を示し，14日目において，ほぼ生理的な分布状態となった。本研究の結果より，CGRPは歯周組織の破壊を受けて組織中でその発現が上昇し，創傷治癒が進むことから，同分子は，歯周組織の治癒・再生に寄与している可能性が示唆される。

## O-20

## 全身性強皮症患者に出現した多発性歯根外部吸収のメカニズム解明

目 見 田 匠

キーワード：全身性強皮症，歯根外部吸収，RNAシーケンス

【目的】全身性強皮症（SSc）は膠原病の一つで，皮膚硬化，免疫異常，血管障害を特徴とする疾患である。2017年当科でSSc患者に多発する骨置換性歯根外部吸収（multiple bone-replacing tooth resorption (MBTR)）の報告を行なった。（Memida T.et al., 2019）本研究では，MBTRを伴うSSc患者（SSc-MBTR）から樹立したiPS細胞（SSc-MBTR-iPS）を用いて本疾患で観察された現象のメカニズムの解明をすることを目的とした。

【材料及び方法】SSc-MBTR-iPSと理化学研究所から購入した健康な人から樹立したiPS細胞（hiPS）を間葉系幹細胞（SSc-MSC及びhMSC）へと分化させ，RNA-seqで遺伝子発現の網羅的解析を行った。また，発現に差があった遺伝子についてリアルタイムPCRを用いてMSCとiPS細胞でその発現を評価した。また，骨分化培地でそれぞれのMSCを7日間培養し，アリザリンレッド染色を行った。

【結果】RNA-seqの結果をもとにエンリッチメント解析を行い，SSc-MSCでは，複数の骨形成関連シグナルの上昇を認めた。またhMSCと比較してSSc-MSCで高い発現の見られたSerpinE1はhiPSとSSc-iPSの間では発現の差はなかった。また，アリザリンレッド染色ではSSc-MSCの方がより早期にアリザリンレッド陽性を示した。

【考察】以上の結果からSSc-MSCではhMSCと比較して骨分化能が亢進していることが示された。SScに認められるMBTRはMSCの高い骨形成能による可能性が示唆された。



## O-21

## PISAを用いた全身疾患リスク評価の検討

藤井 利哉

キーワード：肝機能、糖尿病、PISA

【背景と目的】近年歯周病と全身疾患が関連するという報告が多い。特に歯周病と糖尿病は相互に影響を及ぼすとされている。他にも肝臓疾患である非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）との関連が多く取り上げられている。新規歯周炎症指標であるperiodontal inflamed surface area（PISA）は歯周ポケットの臨床的アタッチメントレベル、歯肉退縮量とプロービング時の出血の値から歯周ポケット炎症面積を計算する方法で、歯周病の状態を定量的に評価することのできる数値である。ただし、PISAと糖尿病、NASHなどの全身状態のマーカに關係があるかについての情報は少ない。本研究の目的は、PISAと糖尿病やNASHなどの全身状態マーカーとの相関を明らかにすることである。

【方法】2018年から2021年まで、神奈川歯科大学附属病院医科歯科連携センターで被験者を募集した。歯周病臨床検査を行い、PISAを算出した。全身状態の評価としては、医療面接に加え、採血、体組成分析を行い評価した。PISAと全身状態を表すマーカーについての相関を検討した。本研究は神奈川歯科大学倫理審査委員会の承認を受けて実施した（No.553）。

【結果と考察】平均年齢67歳の合計277名（女性182名、男性95名）の被験者を本研究の対象とした。糖尿病マーカーである血糖値、肝機能マーカーであるγ-GTP、ALTにPISAとの正の相関関係を認めた。他にも肥満の指標であるBMI、体脂肪率、腹囲とPISAとの間に正の相関関係を認めた。今回の結果からPISAを用いた歯周病の状態から全身疾患のリスクを評価できる可能性が示唆された。

## O-23

## 歯槽堤保存術における吸収性遮蔽膜を用いたOpen Membrane Techniqueに関する基礎的検討 第2報

夏堀 杜一郎

キーワード：歯槽堤保存術、Open Membrane Technique、吸収性遮蔽膜

【目的】近年、歯槽堤保存術（Alveolar Ridge Preservation：ARP）において、創面の初期封鎖を行わずに遮蔽膜や骨補填材を口腔内に開放させる術式（Open Membrane Technique：OMT）の有効性が報告されているが、治療の経過や周囲組織への影響についての基礎的な検討は不足している。本研究の目的は、ラットの歯槽堤に形成した実験的骨欠損モデルを用いてOMTの有効性を評価することである。

【材料と方法】5週齢のWistar系ラットを45匹用いた。上顎右側第一臼歯を抜去し、規格化した骨欠損を作製した後、脱タンパクウシ由来骨基質（Bio-Oss®）を填入し、プタ由来コラーゲン膜（Bio-Gide®）を設置した。実験群を遮蔽膜の設置や骨補填材の填入を行わなかった群（ARP（-）群）、ARPを行い、創部の初期封鎖を行わずに遮蔽膜が口腔内に露出するように設置した群（Open ARP（+）群）、歯肉弁を歯冠側に移動して創部を初期封鎖した群（Close ARP（+）群）の3群に設定し、術後0日、7日、および14日に創傷面積の計測、μCTを用いて放射線学的に頬側骨の高さと骨形態計測、および組織学的な観察を行った。

【結果】Open ARP（+）群は、ARP（-）群と比較して創部の面積が早期に縮小し、Close ARP（+）群と比較しても、軟組織は同様に治癒することが観察された。また、放射線学的観察においても、Open ARP（+）群とClose ARP（+）群の頬側骨の高さと骨形態計測の結果は、近似した結果が得られた。組織学的観察においても、同様に両群に骨補填材周囲の新生骨の発現が観察された。

【結論】吸収性遮蔽膜を使用したARPにおけるOMTは、上皮の治療や骨の新生に対し有効な方法となりうる。

## O-22

## 広汎性重度歯周病患者に線維芽細胞増殖因子—2を用いた歯周組織再生療法を用いた症例

藤野 健正

キーワード：FGF-2、線維芽細胞拡張因子

患者は45歳男性、職業は消防士であり以前はヘビースモーカーであったが今は禁煙しています。ほぼすべての歯に5～10mm以上の深い歯周ポケットが存在し、プロービング時の出血＝BOP陽性率は31%がみられ、多数歯にM1～M2の動揺がみられました。全顎にわたる高度な骨吸収を認め、上下前歯部全歯にロート状（4壁性）吸収とクレーター吸収を認め、左右上下顎のほとんどすべての歯に1壁性～4壁性の垂直性骨欠損、4本の第一大臼歯にⅠ～Ⅲ度の根分岐部病変がみられました。10本近くの歯は骨欠損が根尖近くまで至っていました。広汎型侵襲性歯肉炎 ステージⅣ グレードCと診断しました。

歯周基本治療は4ヶ月かけて全顎のスケーリング、全顎SRP、歯科衛生士による丁寧な口腔清掃指導を行いました。しかし、BOP陽性率は39%あり、5mm以上の歯周ポケットが多数歯に存在し、結果的に顕著な改善は見られませんでした。9回に分けFGF-2を用いた歯周組織再生療法を実施し改善しましたが、左上4、5、6、7番および左下6番は歯周組織再生が不十分でしたので再歯周組織再生誘導手術をFGF-2に加え骨代用物質を併用して実施しました。全額手術2年後、ほぼすべての歯は3mm以下の浅い歯周ポケットとなり、BOP陽性率は3%へ、動揺度も全歯M0に改善しました。4本の第一大臼歯の根分岐部病変はⅠ～Ⅲ度ありましたが、これらも0～Ⅰ度となっています。

## O-24

## 洗口液による口腔内環境の改善と細菌叢の変化

飯島 杏奈

キーワード：口腔内細菌叢、メタゲノム、メタ16S解析、Nanopore、次世代シーケンサー、洗口液

【背景・目的】近年、歯周病や齲蝕等の口腔疾患が全身疾患にも影響を及ぼすという報告が増え、その要因となる口腔内細菌叢の変化が注目されている。今回、我々はNanopore社製次世代シーケンサーMinIONを用いて口腔内細菌叢のメタゲノム解析を行った。同時に、洗口液使用による菌叢への影響も調査した。

【方法】本研究に同意の得られた健康者12名（20～60代）を対象とし、洗口液を1日3回、3ヶ月間使用させた。使用前及び使用3ヶ月後に、ペリオオーバーを用いて歯肉縁下プラークを採取し、歯周組織検査による評価を実施した。採取したプラークサンプルからDNA抽出後、16S rRNAメタゲノム解析を行った。（日本メナード化粧品株式会社総合研究所倫理審査委員会承認）

【結果・考察】1）口腔内細菌叢のメタゲノム解析  
被験者12名の歯肉縁下プラークサンプルから検出された各細菌の相対存在比率を算出すると、菌叢バランスは2回の測定において被験者毎に類似していた。この結果より、口腔内細菌叢は個人毎に固有であると考えられた。またサンプル中の、健康な口腔状態に関連するとされる細菌（以下、善玉菌とする）の比率は、歯周病原細菌の比率と負の相関を示した。

2）洗口液使用による口腔内細菌叢の変化  
洗口液の使用によって臨床パラメーター（GI：Gingival index, PD：Probing Depth, BOP：Bleeding on probing）の改善を認めた。また、善玉菌率40%以下且つ歯周病原細菌率3%以上の被験者9名について解析すると、洗口液使用により善玉菌率は有意に上昇していた。さらに、臨床パラメーターのうちBOP率が0%まで改善した被験者に関しては歯周病原細菌率の有意な減少もみられ、臨床症状だけでなく口腔内細菌叢バランスについても明確な改善が認められた。

O-25

Nifedipine 誘発性歯肉増殖症 *in vitro* モデルにおける  
肝細胞増殖因子の抗線維化作用の検討

山崎 桂

キーワード：薬物性歯肉増殖症，ニフェジピン，肝細胞増殖因子，歯肉線維芽細胞，抗線維化作用

【目的】Nifedipine 誘発性歯肉増殖症は，nifedipine 服用患者に副作用として起こる歯肉の過形成であり，そのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では，nifedipine 誘発性歯肉増殖症 *in vitro* モデルを構築し，肝細胞増殖因子（HGF）の抗線維化作用について検索を行った。

【材料と方法】ヒト歯肉線維芽細胞を10%FBS添加DMEM/F-12にて培養し，0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml nifedipine, 10ng/ml IL-1 $\beta$ +0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml nifedipine（N0.1, N1, N10, IL+N0.1, IL+N1, IL+N10）を作用させ，細胞数の測定およびコラーゲン I 型，TGF- $\beta$ ，CTGF を ELISA 法にて測定した。定めた IL および nifedipine と 10, 50ng/ml HGF を同時投与し，培養上清中のコラーゲン I 型，TGF- $\beta$ ，CTGF を ELISA 法にて測定した。

【結果と考察】N0.1 群，N1 群，IL+N0.1 群，IL+N1 群では細胞増殖に有意な差は認められなかった。コラーゲン I 型，TGF- $\beta$ ，CTGF は N1 群，IL+N0.1 群の作用後48時間で有意な増加が認められた（ $p < 0.05$ ）。HGF の添加により，コラーゲン I 型，CTGF では有意な減少が認められ，さらに抗 HGF 抗体の添加により HGF のコラーゲン I 型の産生の減少を有意に抑制した（ $p < 0.05$ ）。

【結論】本研究では，*in vitro* での nifedipine 誘発性歯肉増殖症モデルが構築され，そのモデルにおいて HGF が抗線維化作用をもたらすことが示唆された。

O-27

PPAR $\gamma$ -induced global H3K27 acetylation is required to maintain osteo/cementogenic abilities of periodontal ligament fibroblasts

Yuan Hang

Keywords: periodontal ligament fibroblasts, PPAR $\gamma$ , histone acetylation, osteo/cementogenic differentiation

**Objective:** Periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) are heterogeneous population in periodontal ligament (PDL) tissue and the diversity of PDLFs has not been clearly revealed yet. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) is one of the nuclear receptors and involves in energy metabolism through directly regulating numerous metabolic genes. PPAR $\gamma$  also exerts anti-osteoclastogenesis in periodontal tissue. Thiazolidinediones compounds (TZDs) are the exogenous agonist of PPAR $\gamma$  and are able to increase the global histone acetylation mainly through inhibiting HDACs, histone deacetylases, which remove acetyl group from lysine residue. Therefore, PPAR $\gamma$  a target of TZDs, are presumed to have pivotal roles for maintaining PDL homeostasis. Here, in this study investigated whether the alteration of PPAR $\gamma$  activity in PDLF modulated osteogenic and ECM-related gene expression. In addition, the global epigenetic changes of H3K27ac induced by suppression of PPAR $\gamma$  was clarified to reveal the underlying mechanisms by which PPAR $\gamma$  maintains osteo/cementogenic abilities in PDLF.

**Materials and methods:** PDLFs culturing, PPAR $\gamma$  specific siRNA transfection, osteo/cementogenic inducing and chemical (TZDs, TCA metabolites) stimulation. Alkaline phosphatase enzymatic (ALP) activity measurement, MTT cell counting staining and Alizarin red staining, q-PCR. Total histone isolation and western blot for histone samples. RNA-seq and ChIP-seq combined analyses identify 4 osteogenic transcripts in the PPAR $\gamma$ -dependent active chromatin region marked by H3K27ac.

**Results:** Knockdown of PPAR $\gamma$  drastically deprives PDLF of ALP activity and Alizarin staining density *in vitro*. In contrast, PPAR $\gamma$  agonists enhance it. Knockdown of PPAR $\gamma$  inhibits global acetylation of H3K9 and H2K27 and the supplementation of acetyl-CoA can restore PPAR $\gamma$  knockdown-induced decreased osteo/cementogenic abilities in PDLF. RNA-seq and ChIP-seq combined analyses identify 4 osteogenic transcripts in the PPAR $\gamma$ -dependent active chromatin region marked by H3K27ac.

**Conclusion:** Our findings identify PPAR $\gamma$  is the key transcriptional factor of PDLF to retain osteo/cementogenic abilities and reveal that global H3K27ac modification involves in the comprehensive osteo/cementogenic transcriptional alteration mediated by PPAR $\gamma$ .

O-26

III 型 interferon（IFN）である interleukin（IL）-29 の  
口腔粘膜における抗ウイルス応答増強作用

四釜 洋介

キーワード：口腔粘膜，自然免疫，ウイルス感染

【目的】口腔粘膜疾患にはウイルス感染が原因と考えられている疾患が数多く存在し，また口腔粘膜がウイルス感染・伝播のゲートウェイである事が知られている。IL-29 はその受容体発現パターンが I 型 IFN とは異なり，上皮細胞等に局限しているのが特徴である。口腔粘膜における IL-29 シグナルの役割およびその受容体発現はほとんど明らかにされていない為，本研究は口腔粘膜における抗ウイルス応答の賦活剤として IL-29 を臨床応用し得るか検討する事を目的とした。

【材料と方法】ヒト歯肉上皮初代培養細胞（GK）や歯肉組織切片を用い，遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて，タンパク発現を western blotting 法，flow cytometry 法，ELISA 法，及び免疫組織化学染色法を用いて検討した。

【結果】ヒト歯肉上皮細胞において IL-29 受容体（IL-28Ra）は発現・機能しており，その下流にある STAT1 は IL-29 濃度依存的にリン酸化された。GK において，I，II 型 IFN は炎症サイトカインである IL-6 および IL-8，さらに近年 SARS-CoV-2 感染への関与が報告されている ACE2 および TMPRSS2 発現を誘導したが，IL-29 ではほぼ変化しなかった。GK において IL-29 はウイルス核酸を認識するパターン認識受容体である RIG-I および TLR3 発現を誘導し，それら受容体の合成リガンド誘導性抗ウイルスタンパク産生を増強した。

【結論】IL-29 は他の IFN と比較し，炎症反応等を誘導せず，RIG-I や TLR3 発現を誘導する事で口腔粘膜における抗ウイルス応答を増強し得ることが示唆された。

O-28

口腔細菌による肺炎発症メカニズム — *P. gingivalis* のジンジバインは PAFR 発現と肺炎レンサ球菌の肺細胞への付着を促進する—

横江 将

キーワード：歯周病，PAFR，ボルフィロモナス・ジンジバリス

【目的】口腔細菌が誤嚥性肺炎の原因となること，口腔ケアがその予防に有効であることから，周術期の患者を中心に医療連携による口腔管理が行われている。特に高齢者や要介護者では口腔細菌を含んだ唾液や食物残渣を誤嚥する機会が多く，誤嚥性肺炎の発症リスクが高い。しかし，口腔細菌がどのように肺炎の発症に関与しているのか，EBM 実践の上でも重要な点は未解明のままである。この点を明らかにするために，肺炎起因菌のレセプターとして機能している Platelet-activating factor receptor（PAFR）に着目し実験を行った。

【方法と結果】*P. gingivalis*（*P.g*）の培養上清で肺上皮細胞を刺激した結果，mRNA と蛋白レベルで PAFR 発現が増加した。Luc assay の結果，*P.g* は転写レベルで PAFR 発現を誘導した。また，*P.g* 刺激により肺炎球菌の細胞への付着が増加すること，付着が PAFR 阻害剤で抑制されることを認めた。PAFR の誘導に *P.g* の LPS や線毛は関与しなかったが，ジンジバイが重要な役割を担っていることがジンジバイ欠損菌株を用いた実験から明らかとなった。

【考察】*P.g* のジンジバイは PAFR の発現を誘導，肺炎起因菌の定着・感染を促進することで肺炎の発症に関わっていることが示唆された。実際に PAFR KO マウスでは肺炎による死亡率が減少すること，肺炎患者では PAFR 発現が亢進していることが報告されている。我々は歯周病原菌がマウスの肺において IL-8 や IL-6 を強く誘導することも見出しているが，口腔細菌による誤嚥性肺炎発症機序の一端を分子レベルで提示できたと考える。



O-29

*Porphyromonas gingivalis* ジンジバインによる血管内皮細胞のPAI-1分解と創傷治癒遅延

多田 浩之

**キーワード:** 慢性歯周炎, *Porphyromonas gingivalis*, 血管内皮細胞  
**【緒言】** *Porphyromonas gingivalis* が産生するシステインプロテアーゼのジンジバインは、慢性歯周炎と全身疾患の病態連関に関わる。血管内皮細胞が産生する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は、プラスミンによるフィブリン分解を阻害することで線溶系を調節する一方、血管内皮の修復を担う。本研究は、*P. gingivalis* 感染がヒト血管内皮細胞のPAI-1産生および創傷治癒に及ぼす影響について検討した。

**【材料と方法】** ヒト血管内皮細胞 (HUVECs) を *P. gingivalis* で感染後、HUVECs のPAI-1産生をELISAで測定した。*P. gingivalis* による血管内皮の創傷治癒の影響は、擦過した血管内皮細胞の遊走 (*in vitro* scratch assay) を測定した。

**【結果】** *P. gingivalis* 野生型株の感染によりHUVECsのPAI-1産生は著明に減少した。ジンジバイン欠損株およびジンジバイン阻害剤を処理した *P. gingivalis* ではPAI-1産生の減少は見られず、精製ジンジバインはPAI-1を分解した。*P. gingivalis* はHUVECsの遊走を遅延させ、同作用はPAI-1依存的である可能性が示唆された。

**【考察】** ジンジバインはヒト血管内皮細胞が産生するPAI-1を分解し、PAI-1を介する血管内皮細胞の遊走を遅延させた。*P. gingivalis* による血管内皮細胞のPAI-1分解は血管内皮バリアの創傷治癒を阻害し、血管から他臓器へ感染を拡大する可能性が示唆された。共同研究者: Song Liting (東北大学), 菅原俊二教授 (東北大学)

O-30

Establishment of an *in vitro* senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment and reversal of senescence by fisetin  
 Sarita Giri

**Keywords:** aging, gingival epithelial cell, hydrogen peroxide, fisetin, periodontitis

**Objective:** Gingival tissue shows progressive alterations with aging. An *in vitro* model of gingival tissue could be useful in understanding age associated oral conditions. We aimed to establish a hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) treatment model to induce aging in human gingival epithelial cells. In addition, fisetin, a flavonoid component studied for its anti-aging property is used to examine if it could reverse the induced senescence.

**Materials and methods:** Primary human gingivitis epithelial progenitor (HGEp) cells were cultured and treated with different hydrogen peroxide of  $H_2O_2$  and fisetin. A cell vitality and morphology, senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining, mRNA and protein expression analysis of known senescence markers p16, p21, and p53, and cell cycle assay were performed.

**Results:** The cells showed dose-dependent changes in vitality and morphology, SA- $\beta$ -gal staining, relative mRNA and protein expression, and cell cycle assay with different concentration of  $H_2O_2$  treatment. Based on these results, 400  $\mu$ M  $H_2O_2$ .

**Conclusion:** An *in vitro* model of gingival epithelial cellular senescence by  $H_2O_2$  was considered as an optimal concentration to induce senescence. Senescence induced cells were further treated with optimum concentration of fisetin which downregulated all the senescence markers used in this study. Treatment was established. Also, the ability of fisetin to downregulate all the senescence markers was shown in our study.

O-31

Evaluating efficacy of a novel dentifrice in reducing probing depths in stage I and II periodontitis maintenance patients

Nicolaas Cornelis Geurs

**Keywords:** anti-inflammatory agents, oral hygiene, periodontitis, plaque control, tooth brushing

**Objectives:** The aim of this clinical study was to investigate the effect of a novel dental gel on probing depths (PD) and inflammation when used as a home care dentifrice in Stage I and II periodontitis patients.

**Materials and methods:** This double-blind clinical study randomized 65 subjects with Stage I and II periodontitis to the novel dental gel containing 2.6% EDTA, and a commercially available anti-gingivitis dentifrice with 0.454% stannous fluoride. Primary endpoint was PD at 6 months for those sites with baseline PD  $\geq$  4mm and secondary endpoints included whole mouth mean scores of modified gingival index (MGI), modified sulcus bleeding index (mSBI) and plaque index (PI). No SRP was performed at baseline.

**Results:** Subjects using the novel dentifrice showed significant PD reductions of 1.18mm (from 4.27mm at baseline to 3.09mm at 6 months) compared to 0.93mm (from 4.23mm at baseline to 3.30mm at 6 months) shown for those using the positive control dentifrice. Difference between treatments at 6 months was 0.21mm with p-value=0.0126. Significant improvements in MGI (P=0.0000), mSBI (P=0.0000), and PI (P=0.0102) were also observed in 6 months.

**Conclusions:** The novel dentifrice showed significant reductions in PD and gingival inflammation over 6 months solely as a home care dentifrice without baseline SRP in Stage I and II periodontitis maintenance patients.