

-大学院歯学独立研究科-

第 125 回 大学院 研究科 発表会 プログラム
第 139 回 中 間 発表会 プログラム
第 45 回 テー マ 発表会 プログラム

大学院学生等が、これまでの研究成果を発表します。
どなたでも聴講できますので、多数の参加をお待ちしております (聴講申込不要)

場 所: 実習館 2 階 総合歯科医学研究所セミナー室

日 時: 2025 年 4 月 23 日 (水) 17 時 25 分 開会

-2025 年 4 月 23 日 (水) -

No.	発表区分・予定時間	演題名・発表者	審査委員
	17:25	開会挨拶 平岡研究科長	—
1	[大学院] 17:30~18:00 司会:小林 教授	「Osteoclast (OC) precursors from erythromyeloid progenitors are the main source of neonatal OC indispensable for tooth eruption」 李 若萱 硬組織疾患制御再建学 硬組織機能解析学	主査:平賀教授 副査:吉田教授 :李准教授
2	[中 間] 18:00~18:30 司会:村上 教授	「歯列矯正による歯の圧迫側を模倣したメカニカルストレス下での培養ブタマラッセ上皮遺残細胞における遺伝変動の網羅的解析」 土居 洋介 硬組織疾患制御再建学 硬組織疾患病態解析学	主査:中道准教授 副査:中村浩彰 教授 :黒岩教授
3	[中 間] 18:30~19:00 司会:村上 教授	「Plasma Rich in Growth Factors (PRGF®) と白血球を含む Platelet-Rich Plasma (L-PRP) の培養歯肉線維芽細胞における創傷治癒に係る遺伝子発現の比較検討」 樋口 琢善 硬組織疾患制御再建学 硬組織疾患病態解析学	主査:吉成教授 副査:宇田川教授 :川原一郎 教授
4	[テーマ] 19:00~19:10 司会:吉田 教授	「The Effect and Regulatory Mechanism of Oral Bacteria on Gut Permeability in Type 2 Diabetes Mice」 呉 暁沛 健康増進口腔科学 口腔健康分析学	—
5	[テーマ] 19:10~19:20 司会:芳澤 教授	「The activation of PI3K-AKT signaling in the spontaneous formed spheroid」 蘭 玲莉 硬組織疾患制御再建学 硬組織発生・再生工学	—
6	[テーマ] 19:20~19:30 司会:栗原 教授	「Effects of bioabsorbable materials in combination with spontaneous spheroid transplantation on bone repair」 岳 磊 硬組織疾患制御再建学 硬組織疾患病態解析学	—

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学 籍 番 号 Student ID No.	ID#G 2014	入 学 年 Entrance Year	2020 年 Year
(ふりがな)	リ ジャクケン		
氏 名 Name in Full	李 若萱		
専 攻 分 野 Major Field	硬組織機能解析学		
主 指 導 教 員 Chief Academic Advisor	小林 泰浩		
発 表 会 区 分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation			
Osteoclast (OC) precursors from erythromyeloid progenitors are the main source of neonatal OC indispensable for tooth eruption			
発表要旨 / Abstract			
Objective and background: Osteoclasts (OCs) regulate normal bone development and remodeling, but their excess activity causes metabolic and inflammatory bone disease such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, and periodontitis. RANK/RANKL signal pathway plays a critical role in the osteoclastogenesis. RANKL, as a transmembrane protein from the tumor necrosis factor superfamily, binding to RANK (Tnfrsf11a) induces the osteoclastogenesis. RANK is reportedly a hallmark of erythromyeloid progenitor (EMP)-derived macrophage precursors in developing embryo. Neonatal osteoclasts are derived by osteoclast precursors (OCPs) of 3 origins: early EMP, late EMP, and hematopoietic stem cell (HSC). OCs derived by early EMP are essential to tooth eruption, normal formation of skull and long bone. OCs arising in the primary ossification center, which would form bone marrow cavity, are derived from EMPs rather than HSC precursors. The mechanism causing the different functions of EMP- and HSC- origin is still not clear, and the persistence of EMP-origin OC in adulthood remains to be explored. We examined how different that osteoclast precursors from different origins or stages contribute to normal bone development using the conditional knockout (cKO) system. Result: 1. When RANK gene was conditionally knocked out in a particular stage in embryos, TRAP staining showed extremely significant decrease of OC number compared with control group ($p < 0.001$). The area of bone marrow cavity statistically decreased ($p < 0.05$). 2. The number of Csflr-expressing tdTomato cells after tamoxifen (TAM) injection increased within 24 hours and got the largest. The result supports a hypothesis of Cre recombination activity curve induced by TAM. 3. In RANK-Cre; Csflr cKO mice, TRAP staining showed the extremely significant decrease of OC number ($p < 0.001$). When they were generated to the older age such as 3 weeks and 4 weeks, the OC number partially and progressively increased. 4. RANK-Cre; Csflr cKO mice showed a lack of tooth eruption in 4 weeks. Conclusion: EMP derived OCPs have the main impact on osteoclastogenesis in neonatal stage. Osteoclastogenesis would be suppressed when RANK gene is deleted in OCPs during the early stage of embryos. Then combined to the conclusion of Cre recombination activity curve, we suppose a fitting curve that the frequency of Csflr positive OCPs differentiating into OCs in embryos.			

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学 籍 番 号 Student ID No. (ふりがな)	ID # G 2212	入 学 年 Entrance Year	2022 年 Year
氏 名 Name in Full	土居 洋介		
専 攻 分 野 Major Field	硬組織疾患病態解析学		
主 指 導 教 員 Chief Academic Advisor	村上 聡		
発 表 会 区 分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		
演題名 / Title of Presentation			
歯列矯正による歯の圧迫側を模倣したメカニカルストレス下での 培養ブタマラッセ上皮遺残細胞における遺伝変動の網羅的解析 Comprehensive Genetic Alteration of Compressive Force Simulating Orthodontic Tooth Movement on Cultured Porcine Epithelial Cell Rests of Malassez			
発表要旨 / Abstract			
【背景】 歯列矯正治療において歯の移動時には歯根膜の幅が一定に維持されている。このような恒常性の維持には歯根膜のマラッセの上皮遺残（ERM）が関与している。具体的には ERM は歯根膜において歯槽骨の代謝およびセメント修復に寄与することが報告されている。歯根膜の恒常性の破綻を引き起こす原因としてメカニカルストレスがある。恒常性の破綻により炎症性歯根吸収や骨置換性歯根吸収が生じる。このような歯根吸収を示す病態が歯列矯正治療に発症することは望ましくない。 しかしながら、メカニカルストレス下で ERM がどのように歯根膜の恒常性を維持しているのかについての全貌は未だ明かにされていない。そこで本研究ではメカニカルストレス下における ERM の遺伝子発現を網羅的に解析することによって、恒常性維持に関与する遺伝子群およびタンパク質群を同定する。 【材料と方法】 本研究ではブタ歯根膜由来の ERM を用いた（北海道医療大学 安彦善裕教授より供与）。非加圧群と 4.0 g/cm²、12 時間で加圧した群から抽出した mRNA をもとに RNA シークエンスを行い、解析ツールを用いてパスウェイを含む後解析を行った。RNA シークエンスの結果をもとに絞り込んだ発現変動遺伝子群は定量 PCR を用いて再現性を確認した。タンパク質の定量にはシンブルウェスタン法、タンパクの局在には蛍光免疫染色を用いた。 【結 果】 パスウェイ解析の結果、加圧群における発現変動遺伝子群は TNF シグナル伝達経路、サイトカインおよびサイトカイン受容体 IL-17 シグナル伝達経路とウイルスタンパク質の相互作用、NF-κB シグナル伝達経路を含む 13 のパスウェイに統計的に有意な違いが認められた。これらの経路内で共通して、BMP2、NFKBIA、CXCL8、CCL4、SOCS3 および FOS などの発現変動遺伝子の有意な発現上昇が認められた。BMP2 タンパク質のレベルの上昇は認められたが、CXCL8 タンパク質レベルに変化はなく、NF-κB タンパク質は核内移行を示さなかった。 【結 論】 メカニカルストレス下で ERM が発現する BMP2 は歯根吸収と骨添加を制御し、歯根膜の恒常性を維持することが示唆された。また、CCL4、SOCS3 および FOS は血管新生、過剰な破骨細胞形成の抑制および抗ヒアリン化によって、歯根吸収を抑制すると考えられる。また、メカニカルストレス下の ERM 細胞では、NF-κB 以外の経路が CXCL8 の転写を促進している可能性が示唆された。			

発表内容の要旨(課程博士)
Abstract of Presented Research (For the Doctoral Course)

学 籍 番 号 Student ID No.	ID # G 2213	入 学 年 Entrance Year	2022 年 Year
(ふりがな)	ひぐち たくよし		
氏 名 Name in Full	樋口 琢善		
専 攻 分 野 Major Field	硬組織疾患病態解析学		
主 指 導 教 員 Chief Academic Advisor	村上 聡		
発 表 会 区 分 Type of Meeting	中間発表会 ・ 大学院研究科発表会 ・ 松本歯科大学学会 Midterm Meeting / Graduate school research meeting presentation / The Matsumoto Dental University Society		

演題名 / Title of Presentation

Plasma Rich in Growth Factors (PRGF®) と白血球を含む Platelet-Rich Plasma (L-PRP) の培養歯肉線維芽細胞における創傷治癒に係わる遺伝子発現の比較検討

発表要旨 / Abstract

【背景】

多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma ; PRP) とは自己血を遠心分離して得られる血小板を豊富に含んだ血漿の一部である。PRP は組織欠損部に投与することで、血小板由来の成長因子が高濃度で局所に作用し、組織再生や創傷治癒を促進させることから、褥瘡や熱傷の治療などに用いられている。PRP は Marx らの報告によると遠心分離によって血小板濃度を高めることに重点を置いており、白血球成分の混入を伴う (R. E. Marx, 1998)。現在に至るまで術者によって様々な PRP 作成法が開発されてきたが、画一化はなされていない。Anitua らにより PRP 作成のための画一化された遠心分離方法 (ENDORET PRGF System®) が開発された。これにより赤血球、白血球および血小板を明確に相分離することが可能となった。このシステムにより作成された多血小板血漿は PRGF (Plasma Rich Growth Factors) と呼ばれ、高濃度の血小板濃度だけでなく、低濃度の白血球濃度を獲得することが可能といわれている (E. Anitua, 2012)。

PRGF は日本でも 2022 年に薬事承認され、創傷治癒促進の観点から歯槽骨を含む歯周組織の再生に盛んに応用されるようになってきている。近年 PRGF と PRP を添加した真皮線維芽細胞の遺伝子の網羅的解析により、創傷治癒を促進する遺伝子群が明らかとなった (E. Anitua, 2022)。しかしながら、PRGF の歯周組織構成細胞、特に歯肉線維芽細胞の機能的な遺伝子の発現については不明な点も多い。特に白血球を多く含む PRP (L-PRP) との違いは未だ明らかとなっていない。

先行研究によって真皮線維芽細胞と歯肉線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルの類似性が報告されている (K. Ebisawa, 2011)。これらの報告を踏まえ、今回我々は PRGF が L-PRP と比べて、特定の創傷治癒を促進し、細胞増殖や創面閉鎖率を司る遺伝子群の増加がみられるとの仮説を立てた。この仮説をもとに細胞培養実験にて歯肉線維芽細胞の増殖と創傷治癒に及ぼす影響を PRGF と L-PRP を比較しながら明らかにする (松本歯科大学倫理審査認証：許可番号 第 0363 号)。

【材料と方法】

PRGF と PRP はドナー3 人の血液から作成した。ポジティブコントロールとしてウシ胎仔血清 (FBS) 含有の完全培地を使用した。また、ネガティブコントロールとして FBS を除いた培地を用いた。セルブロック法と血球計算盤を使用して PRGF と L-PRP に含まれる血小板の有無と白血球濃度を評価した。PRGF および L-PRP 下で歯肉線維芽細胞を培養し、WST-1 による歯肉線維芽細胞の増殖を計測した。セルカルチャーインサートを用いて、細胞の増殖能だけでなく走化能も反映する創面閉鎖モデルを作成後、創面閉鎖率を計測した。PRGF 添加群において真皮線維芽細胞で有意な増加を示し、GO term として Wound Healing がタグづけられた III 型コラーゲン $\alpha 1$ (Col3 $\alpha 1$)、Decorin および Inactive tyrosine- protein kinase 7 (PTK7) の mRNA 発現を定量的に比較した。

【結果と考察】

【多血小板血漿製剤における血球成分】

PRGF と L-PRP の両者において Giemsa 陽性を示す多数の血小板様構造物が認められた。また、PRGF に含まれる白血球濃度は L-PRP よりも有意に低値を示した。

【細胞増殖】

細胞増殖の初期 1, 2 日目では PRGF および L-PRP は、ポジティブコントロールと同等の値を示した。3 日目には PRGF および L-PRP はポジティブコントロールよりも有意に高値を示した。特に L-PRP は PRGF と比して有意に高かった。この理由は、PRGF よりも PRP に有意に多く含有される PDGF (C. R. Irwiln, 1994) や TGF- β (H. J. Chae, 2006) および IL-1 β (A. DuFour, 1993) が歯肉線維芽細胞の増殖に対してより促進的に作用したためであると考えられる。

また、歯肉上皮細胞では細胞増殖の初期 1, 2 日目において PRGF が L-PRP と比べて高い増殖を示すこと (Y. Watanabe, 2025) が知られており、PRGF や L-PRP などの多血小板血漿製剤は特に初期の増殖促進を伴う創傷治癒に寄与する可能性が考えられた。

細胞増殖の後期 7 日目では PRGF および L-PRP は、ポジティブコントロール比べて有意に低値であり、14 日目では低い傾向を示した。これらの結果より、PRGF や L-PRP は細胞増殖の後期にみられる過度な線維芽細胞の増殖を阻止し、瘢痕形成を抑制する可能性が示唆された。とくに、PRGF には L-PRP と比べて TGF- β の含有量が少ないことが報告されており (H. Masuki, 2016)、TGF- β 誘導性の筋線維芽細胞による瘢痕形成 (G. D. Marconi, 2021) をより抑えることが可能であると考えられた。

【細胞閉鎖率】

PRGF および L-PRP はポジティブコントロールと同様に 48 時間後に約 100% の閉鎖率を示した。PRGF は L-PRP と比較して歯肉線維芽細胞の創面閉鎖率に差が認められず、増殖能と走化能の総和としての作用は同程度であると考えられた。その理由としては、白血球に由来する IL-8 や IL-1 β などの各々のサイトカインが細胞の閉鎖率を低下させることが報告されており (F. G. Basso, Lasers Surg Med, J Periodontol, 2016)、PRP で有意に認められた増殖能を相殺した結果である可能性が考えられる。

【遺伝子発現】

PRGF と L-PRP とともに歯肉線維芽細胞の足場作成に関わる Col3 α 1 と血液の供給調整を担う Decorin および細胞増殖と移動を制御する PTK7 の mRNA 発現量には差がみられなかった。この結果を示した原因として、真皮線維芽細胞よりも歯肉線維芽細胞が、成長因子 (TGF β 1) に対する mRNA 発現の増加倍数が少なく (H. Murphy-Marshman, 2017)、サイトカイン (IL-4) への反応の閾値が高いこと (E. Judith, 2013) に起因すると考えられる。これらの結果から、PRGF と L-PRP はこれらの遺伝子に係る創傷治癒の観点からは同程度の能力を有すると考えられた。

【結 論】

PRGF および L-PRP の多血小板血漿製剤は、歯肉線維芽細胞の初期の細胞増殖を促進することによって創傷治癒に寄与すると考えられる。