−大学院歯学独立研究科−
第　９１　回　中　間　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：2018 年 4 月 25 日（水）17 時 25 分　開会

2018 年 4 月 25 日（水）17 時 25 分　開会

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　高橋研究科長	
1	［中間発表］ 17：30〜18：00 司会：各務教授	「修復象牙質の形成メカニズムの解析」 趙　麗娟　　3 年　硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生・再生工学	主査：山　本 教授 副査：平　岡 教授 落　合 講師
2	［中間発表］ 18：00〜18：30 司会：八上准教授	「ヒト CD14 陽性単核細胞を用いた破骨細胞の分化・延命に対する薬剤の作用」 小松　佐保　4 年　健康増進口腔科学講座 口腔健康政策学	主査：各　務 教授 副査：大須賀 教授 中　村 教授
3	［中間発表］ 18：30〜19：00 司会：川原教授	「齲蝕活動性試験項目と歯肉炎との関連性 ー歯周疾患リスク判定への応用可能性の検討ー」 薦田　智　　4 年　健康増進口腔科学講座 口腔健康政策学	主査：吉　田 教授 副査：音　琴 教授 正　村 准教授

問合わせ先：本館 2 階　学事室（大学院）内線 2331

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　1608	入学年 Entrance Year	2016　年 Year
（ふりがな）	ちょう れいけん		
氏名 Name in Full	趙 麗娟		
専攻分野 Major Field	硬組織発生再生工学		
主指導教員 Chief Academic Advisor	各務 秀明		
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

修復象牙質の形成メカニズムの解析

発表要旨 / Abstract

【目的】

窩洞形成などの刺激により象牙質の石灰化が亢進する。この過程において、象牙芽細胞のアポトーシスが誘導され、引き続き新生象牙芽細胞の出現が観察される。しかしながら、象牙芽細胞の細胞死と修復象牙質形成との関係は良く分っていない。今回我々は、遺伝子改変マウスを用いて、ジフテリア毒素(DT)投与により、象牙芽細胞を特異的に死滅させる実験系を構築した。この実験系を用いて、修復象牙質の形成と象牙芽細胞死との関係性を調べることを目的とした。

【方法】

(1) **象牙芽細胞の検出実験系の確立**：I型コラーゲン(Col1)と Nestin 蛋白質をマーカーとして象牙芽細胞の検出を試みた。Col1 の発現は、Col1 のプロモーター[Col1(2.3)]の制御下で GFP を発現するマウス[Col1(2.3)-GFP マウス]を用いた。Nestin の検出には、抗 Nestin 抗体を用いた。

(2) **マウスの成長過程における象牙質形成の観察**：マウスは出生後も象牙芽細胞による石灰化が亢進する。6、7、12、20 週齢の野生型マウスにカルセイン(0.48 mg/マウス)を 4 日の間隔をあけて 2 回投与した。2 回目の投与の 1 日後に上顎第一大臼歯を回収した。凍結切片を作製した後に、共焦点顕微鏡を用いてカルセインラベルを観察し、象牙芽細胞の石灰化の程度を解析した。

(3) **象牙芽細胞の枯渇実験**：Col1 のプロモーター[Col1(2.3)]の制御下で Cre を発現するマウスと Cre 依存的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスを交配させた(Col1(2.3)-Cre/flox-stop- flox-DTR マウス)。Col1(2.3)-Cre/DTR マウスにジフテリア毒素(DT)(250 ng)を 6 日間投与した。最後の DT 投与の 1 日後に象牙芽細胞を観察した。また、最終の DT 投与の 1 週間後に修復象牙質の形成をカルセインラベルにより観察した。

【結果】

(1) **象牙芽細胞の検出実験系の確立**：Col1(2.3)-GFP マウスの第一大臼歯を回収し、凍結切片を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、象牙芽細胞に特異的な GFP の発現が認められた。また、パラフィン切片における抗 Nestin 抗体染色により、象牙芽細胞を Nestin 陽性細胞として観察できた。

(2) **マウスの成長過程における象牙質形成の観察**：6 週齢では象牙質全体にカルセインの取り込みが認められた。一方、12 週齢以降ではカルセインでラベルされた象牙質は殆ど確認できなかった。以上より、マウスでは生後 12 週以降に象牙芽細胞の石灰化活性が低下することが明らかになった。

(3) **象牙芽細胞の枯渇実験**：Col1(2.3)-Cre/DTR マウスに DT を投与することにより、象牙芽細胞の枯渇が観察された。また、DT による象牙芽細胞の枯渇後に、象牙質へのカルセインの取り込みの亢進が認められた。一方、コントロールマウス(DTR)では、DT 投与による象牙芽細胞への影響は認められず、象牙質へのカルセインの取り込みも確認されなかった。

【結論】

以上の結果より、象牙芽細胞の枯渇が新生象牙質を誘導することが明らかになった。すなわち象牙芽細胞死を引き金とした、新生象牙質の形成を調節する歯髄環境の存在が示唆された。

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　1503	入学年 Entrance Year	4　年 Year
氏名 Name in Full	小松　佐保		
専攻分野 Major Field	口腔健康政策学		
主指導教員 Chief Academic Advisor	八上　公利		
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

ヒトCD14陽性単核細胞を用いた破骨細胞の分化･延命に対する薬剤の作用

発表要旨 / Abstract

【目的】破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。そして、骨組織は骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのようにみえるため、この現象は、骨代謝共役と呼ばれている。

ITAMは、T細胞やB細胞の受容体と会合する細胞膜アダプター分子の細胞内ドメインに共通してみられるモチーフとして発見された。破骨細胞では、DAP12とFcRγの発現が高く、ダブル欠損マウスは大理石骨病を呈する。最近、DAP12 と会合する免疫グロブリンスーパーファミリー分子として、シアル酸受容体タンパク質Siglec-15が同定された。Siglec-15は破骨細胞の分化に伴って誘導される。Siglec-15 遺伝子欠損マウスは、骨吸収が抑制され骨量が増加するが、破骨細胞数は減少しない。この実験結果は、破骨細胞の存在が骨芽細胞の活性を支え、骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示唆している。今回、ヒト末梢血液由来の破骨細胞の分化と延命に対するSiglec-15抗体の効果について検討した。

【方法と結果】健常人ボランティアから採取した末梢血から調製した単球を含む細胞画分からCD14抗体ビーズを用いてCD14陽性細胞を単離した。CD14陽性のヒト単核細胞を破骨細胞分化因子であるRANKLとマクロファージ刺激因子であるM-CSFの存在下で7日間培養することによりTRAP陽性ヒト多核細胞が形成された。この培養系にSiglec-15抗体を添加することにより、RANKLとM-CSFにより誘導されるTRAP陽性ヒト多核破骨細胞形成は阻害されなかった。
また、培養7日目で形成された多核破骨細胞はRANKLとM-CSFの非存在下でその後死滅していくが、Siglec-15抗体を処理することにより、その延命作用は更に抑制された。

【結論】 Siglec-15抗体は、ヒト末梢血液由来の多核破骨細胞の延命を阻害するものと考えられる。

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　G1504	入学年 Entrance Year	4　年 Year
（ふりがな）	こもだ	さとし	
氏名 Name in Full	薦田	智	
専攻分野 Major Field	健康増進口腔科学講座		
主指導教員 Chief Academic Advisor	川原　一郎		
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

齲蝕活動性試験項目と歯肉炎との関連性　－歯周疾患リスク判定への応用可能性の検討－

発表要旨 / Abstract

【目的】

小児の定期検診の結果から齲蝕罹患リスクの汎用検査方法である齲蝕活動性試験の検査項目において歯周疾患のリスク判定と予防への応用が本研究の目的である。

【方法】

研究実施者が勤務する歯科医院に来院した小児患者を対象に、重篤な全身および口腔内疾患を持っていない小児患者を対象とし、検査対象者には初診時の口腔内検査直前に飲食・歯磨きをしないよう事前指導した。無味無臭のガムを5分間咬んでもらい、口腔内で貯めない様に随時口腔外へ吐出してもらい採取した。齲蝕活動性試験および保健指導を実施して、齲蝕活動性試験結果と歯肉炎状況のそれぞれの変化と関連に着目し歯肉炎の予後判定における齲蝕活動性試験の活用性を検証した。

歯肉炎の状況は口腔内検査において歯肉炎指数(PMA index)を用いて計測し、本研究では 7 点以上を歯肉炎と判定した。一方で齲蝕活動性試験はdf/DMF 歯計測、プラーク染め出しによるPCR、口腔内写真撮影、吐出された唾液の流出量、唾液緩衝能、そして唾液を検体とし CRT® Bacteria(Ivoclar Vivaden 社)を用いて口腔内細菌数測定(*S.mutans&Lactobacillus*)を行った。 初診終了後に対象者と保護者に対してブラッシング指導を行い再来院時は繰り返し指導を行った。そして初診終了後 3～4 か月後の再来院時に歯肉炎指数と齲蝕活動性試験を行い初診時と比較しブラッシング指導による口腔内環境の改善の程度を検証した。

【結果】

初診時に歯肉炎患者と判定された群(PMA index≧7)では対照群(PMA index<7)と比較し、DMF 歯率、口腔内 *S.mutans* 菌量(Fig.1)が有意に多いことが認められた。また検証を進めていくと DMF 歯率は PMA index との間に強い正の相関が認められた。また再診時の齲蝕活動性試験の結果を検証すると、歯肉炎患者群では歯肉炎指数、*S.mutans* 菌量の改善に有意差が認められた。*S.mutans* 菌量は歯肉炎患者群・対照群関わらず再診時に PMA index が改善した群についても改善が優位に認められた。齲蝕活動性試験は歯肉炎の予後判定の1つに用いられる可能性が示唆された。

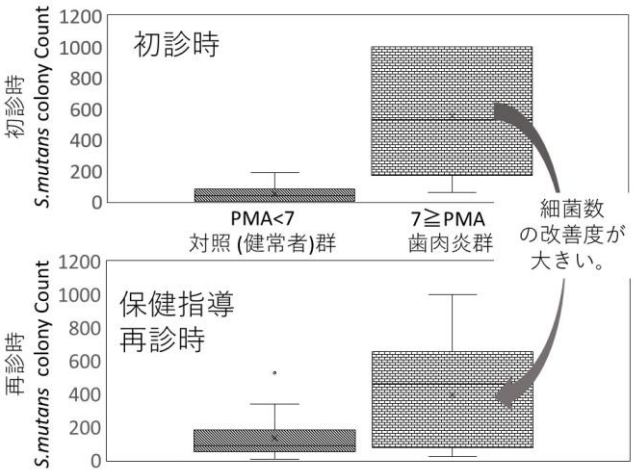

Fig.1