

日時：9月5日（金）12:50～18:30

会場：ポスター会場（会議場1階 イベントホール）

モリタ優秀発表賞審査「臨床・再生医療」（MP1-71～78）**MP1-71 「ヒト骨組織を用いた骨細胞の網羅的遺伝子発現解析－皮質骨再生に向けた分子基盤の探索－」**西澤 千晶^{1,2}、高垣 裕子³、道上 敏美¹、宮川 和晃^{1,2}（¹大阪母子 骨発育、²阪大 院歯 口外1、³神歯大 院歯）

【目的】骨は外側の皮質骨と内部の海綿骨から構成される。術後の長期安定性を得るには再生骨と周囲骨組織との一体化、特に皮質骨の連続性獲得が重要である。そこで本研究では、骨恒常性維持の要である骨細胞に着目し、皮質骨および海綿骨に含まれる骨細胞の機能的差異を解析することで、皮質骨を任意に再生できる技術開発の端緒となる分子基盤の解明を目的とした。

【材料・方法】学内倫理審査委員会の承認下、患者・代諾者の同意を得て骨移植術の際に残余検体となったドナー腸骨（女兒、平均6.5歳、n=6）を解析に使用した。前腸骨稜下の二次海綿骨および皮質骨から5回のコラゲナーゼ処理によって骨髓や骨芽細胞を除去し、各骨片中に残った骨細胞のbulk RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行い、皮質骨骨細胞と海綿骨骨細胞を比

較した。

【結果】全発現変動遺伝子（1393遺伝子）を対象としたIPA pathway解析では、皮質骨骨細胞にて活性化するpathwayは57個、海綿骨骨細胞で活性化するpathwayは2個だった。海綿骨骨細胞に比べ、皮質骨骨細胞で2倍以上高発現する遺伝子（439遺伝子）を対象としたEnrichment解析では、細胞外基質の形成、石灰化、骨格成長、軸索ガイダンスに関連する生物学的Termが顕在化された。

【考察】皮質骨と海綿骨に含まれる骨細胞の遺伝子発現プロファイルは明確に異なった。今後、骨細胞の機能的多様性に関する研究が新規骨再生治療に寄与する可能性が示唆された。

MP1-72 「歯小囊細胞からセメント芽細胞への分化における Hertwig 上皮鞘基底膜成分の役割」新藤 美湖^{1,2}、池崎 晶二郎²、大津 圭史²、加倉 加恵¹、原田 英光²（¹福歯大 インプラント、²岩医大 歯 発生生物）

歯根の成長過程で歯根象牙質の歯根膜側では歯小囊細胞が遊走してセメント芽細胞に分化し、セメント質を形成する。しかし、歯小囊細胞が象牙質表面でセメント芽細胞に分化するメカニズムは不明である。電子顕微鏡による観察からHertwig上皮鞘（HERS）が歯根象牙質表面に形成した基底膜構造が存在し、この構造がセメント芽細胞への分化誘導に深く関わると考えた。Hertwig上皮鞘細胞株（HERS02T）が分泌する基底膜成分の中で検出量の多かったlaminin332、tenascin、periostinの複合体について機能解析を行った。まず、これらのタンパクが歯根発生中の歯根象牙質表面に存在することを免疫組織学的に明らかにした。これらのタンパクをアパタイトの培養プレートにコート

して歯小囊細胞株（MDF）の接着性について検討した結果、非コートプレートでは培養2日目にはすべての細胞が凝集して剥がれて、細胞分化や石灰化は観察されなかった。一方、コートした培養プレートでは時間経過とともに高いALP活性とコラーゲン、Runx2、Osterixの遺伝子発現の上昇を認めた。さらにセメント芽細胞マーカーであるSparcl1（SPARC-like1）とbone sialoprotein（Ibsp）のタンパク発現ならびに遺伝子発現の上昇を認めた。以上のことから歯小囊細胞はHertwig上皮鞘が分泌した基底膜タンパクを介して象牙質表面に接着することがセメント芽細胞への分化誘導の起点となることが示唆された。

MP1-73 「イモリ下顎切除後の細胞分化と再生機序の解明」

坪崎 健斗¹、田谷 雄二^{1,2}、埴 太宥¹、工藤 朝雄¹、佐藤 かおり¹、添野 雄一¹
 (¹ 日歯大 生命歯 病理、² 日歯大 生命歯 初年次教育)

【目的】本研究ではヒト顎骨再生の実現のため、高度な再生能力をもつ両生類イモリを使って下顎切除後の再生機序の解明を目指した。

【材料と方法】アカハライモリの下顎前方1/2を切除し、64週にわたり下顎再生過程を解析した。

【結果】切除後2週までに断端組織は再生上皮で被覆、4週後には上皮下に再生芽を形成し、骨芽細胞などの細胞分化がみられた。骨・軟骨では、4週後にメッケル軟骨が再生し、8週後になると軟骨にガイドされて膜性骨化によって歯槽骨が再生し始め、歯槽骨再生部では歯胚発生と歯質形成が生じ始めた。16週後には再生軟骨が細くなりつつ正中まで達し、歯槽骨も伸長するとともに下顎骨体部の再生を始めた。32週後には下顎骨底部ができ、64週後には切除前の状態にほぼ回復

した。qPCR解析では、再生芽マーカ*kazald1*、軟骨細胞の分化マーカ*sox9*、骨芽細胞の分化マーカ*runx2*、エナメル質形成マーカ*amelogenin*の発現について、組織所見と一致した結果が得られた。

【結論】切除された下顎組織は顎骨や歯牙を含めて64週余りでほぼ復元した。イモリでは早期な再生上皮の被覆後、肉芽形成を伴わずに再生芽からの細胞分化と組織再生を生じた。メッケル軟骨が骨再生と伸長をガイドすること、膜性骨化により骨再生することなどが明らかとなった。

【会員外共同研究者】同大学 藤田和也、川本沙也華、慶応義塾大学 貴志和生・石井龍之、筑波大学 千葉親文。

MP1-74 「口腔組織由来間葉系幹細胞の抜歯窩治癒過程における細胞動態と骨分化制御機構の解明」

宮田 春香¹

(¹ 鹿大 院医歯 顎顔面補綴)

【目的】口腔内には様々な歯周組織由来の間葉系幹細胞(MSC)が存在し、分子特性によって局在する組織が異なることが報告されている。しかし分子発現の異なるMSCを生体内で同時に評価した報告は少なく、また各MSCが骨形成においてどのような機能を担っているか解明されていない。本研究では抜歯窩治癒過程における各MSCの局在や遺伝子発現を評価し、それぞれの機能解明につなげることを目的とする。

【材料と方法】10週齢オスC57BL/6Jマウスで下顎第2臼歯抜歯モデルを作成し、抜歯後1、3、5、7日目に下顎骨を採取し組織切片を作成した。作成した組織切片をH&E染色および、各MSCマーカーで免疫染色を行った。同タイムラインで下顎骨を回収し、RNAの抽出およびcDNAに逆転写後、RT-PCRにて各遺伝子発現評価を

行った。

【結果】生理的条件下では骨髓組織にLepR+/Axin2LowMSCおよびAxin2HighMSCを認めた。これら分子発現の異なるMSCは治癒過程において異なる局在を示した。RT-PCRでは抜歯1日後にMSCマーカーの遺伝子発現は減少傾向を認め、一方で骨分化マーカーであるRunx2は増加傾向を認めた。また、Axin2の発現をRunx2と依存して制御すると報告されているHdac3の発現も増加する傾向を認めた。

【考察】本研究でAxin2陽性MSCが顎骨骨髓組織にも存在することを示した。生理的条件下および抜歯窩の治癒過程において各MSCが異なる局在を示すことから、骨再生においても異なる役割を担っていることが示唆された。

MP1-75 「細胞増殖活性に基づく歯根膜幹細胞の細胞動態解析」

小野 喜樹^{1,2,3}、土橋 梓¹、小林 水輝¹、Pwint Phyu Hlaing¹、加来 賢¹(1)新潟大 院医歯 生体補綴、²新潟大 院医歯 オミックス組織再生、³新潟大 研究統括)

【目的】歯根膜は歯と歯槽骨を結合し、口腔機能において重要な組織である。しかし、歯根膜幹細胞(PDLSC)の局在ならびに増殖分化動態は十分に解明されていない。そこで本研究では、組織幹細胞の特徴である組織中での増殖活性に着目し、これをLabel-retaining cell(LRC)として検出するとともに、誘導性の多色蛍光ラベリングを用いて、発生、リモデリング、再生過程における細胞増殖活性の変化を解析することを目的とした。

【方法と結果】LRCの検出には、生後15日齢のマウスに5-ethynyl-2'-deoxyuridine(EdU)を投与し、12週間にわたり標識細胞を追跡した。投与直後では歯根膜全域にEdU陽性細胞が検出されたが、12週間後には陽性細胞数は減少し、セメント質近傍に局在していた。

また、LRCは高頻度で幹細胞マーカーを発現していた。次に、RGBow: UBC-CreERT2マウスを用いて、薬剤誘導性に多色蛍光標識を行い、単一細胞に由来する細胞クラスターを追跡した。リモデリング過程における最長1年間の追跡では、細胞クラスターの成長速度は緩やかであるものの、歯根膜全域で多細胞クラスターが確認された。一方、発生期および再生(即時再植)過程では、細胞クラスターの細胞数が顕著に増加し、特にセメント質表面で明瞭な多細胞クラスターが検出された。

【結論】従来、PDLSCが好局在するとされてきた骨近傍の血管周囲だけではなく、セメント質近傍にもPDLSCが存在することが示唆された。

MP1-76 「BMP-2 誘導骨による免疫・造血機能の再構築」

土佐 郁恵¹、大原 直也¹、窪木 拓男²(1)岡大 院医歯薬 口腔微生物、²岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴)

【目的】BMP-2は再生医療への応用が進んでおり、本邦でも顎骨再生を目的とした治験が開始されている。再生骨には力学的支持に加え、免疫機能の担保も求められる。血球細胞は骨髄で産生され、そのニッチはCAR(Cxcl12-abundant reticular)細胞が構築する。本研究では、BMP-2により形成された骨(BMP-2誘導骨)が、機能的な骨髄ニッチを持つかを検討した。

【材料および方法】Cxcl12-GFPマウスおよび野生型マウスにrhBMP-2/ β -TCP複合体を皮下移植し、4週後に形成された骨を回収した。組織学的解析、フローサイトメトリー、scRNA-seqにより長管骨骨髄と比較した。放射線照射マウスに対してBMP-2誘導骨由来細胞または骨髄細胞を静脈投与し、造血再構築とニッチ機能を評価した。

【結果】BMP-2誘導骨は骨髄に類似した構造を持ち、造血幹細胞、CAR細胞、血球系細胞を含んでいた。scRNA-seqでは、細胞群の遺伝子発現が長管骨骨髄と高い類似性を示した。BMP-2誘導骨由来細胞の移植により、放射線照射マウスの生存率は0%から100%に回復し、末梢血および骨髄細胞の大半がドナー由来GFP陽性細胞で置換された。照射を受けたBMP-2誘導骨内にも、CD45.1陽性造血幹細胞の生着が確認された。主要な免疫細胞もドナー由来として再構築されており、BMP-2誘導骨の免疫造血機能が示唆された。

【結論】BMP-2は造血ニッチを備えた機能的な骨髄組織を異所的に誘導する。

会員外共同研究者：大野充昭(岡大 院医歯薬)

MP1-77 「上皮封鎖性向上を目的とした Ce-TZP/Al₂O₃ インプラントの表面性状の最適化」山森 庄馬¹、浦野 絵里¹、望月 文子²、岩佐 文則³(¹ 昭医大 歯 補綴、² 昭医大 歯 口腔生理、³ 明海大 歯 冠橋義歯補綴)

【目的】インプラントの長期的な成功には十分な周囲軟組織封鎖性の獲得が重要だが、チタン(Ti)代替材料として注目されるCe-TZP/Al₂O₃(Zr)の上皮付着を促進する最適な表面性状は未解明である。そこで本研究では、マウス歯肉接合上皮細胞(JE-1)を用いてCe-TZP/Al₂O₃の表面性状が歯肉上皮細胞接着に及ぼす影響を検討した。

【方法】TiおよびZr基盤に機械研磨(M)または鏡面研磨(Mr)を施し、各基盤の表面性状はSEM、AFM、およびRa値により評価した。各基盤上でJE-1を培養し、MTS法にて細胞増殖を評価した。また、接着性タンパク質(Laminin-5、Integrinβ4、Cadherin-1)の発現を免疫組織化学染色(IHC)と定量リアルタイムPCR(qPCR)で解析した。さらに、振動刺激による細胞接着試験により

基盤と細胞との接着強さを測定した。

【結果】Ra値は、MTiおよびMZrで約0.9μm、MrTiおよびMrZrで約0.02μmであった。いずれの基盤上のJE-1の増殖は培養時間とともに増加し、7日目にはMTiよりもMrTiで、MZrよりもMrZrで有意に増殖が亢進した。IHCでは各基盤上のJE-1にLaminin-5、Integrinβ4、Cadherin-1の発現を認め、qPCRでは、MZrと比較してMrZrでLaminin-5とIntegrinβ4の発現量が高い傾向を示した。さらに、細胞接着試験において、MZrと比べてMrZrとJE-1との接着強さが有意に強かった。

【結論】Ce-TZP/Al₂O₃において、鏡面研磨は歯肉上皮細胞の接着性を高める有効な表面処理である可能性が示唆された。

MP1-78 「接合上皮細胞の修復材料への再付着に関する ODAM の効果」

高満 正宜¹、大津 圭史²、池崎 晶二郎²、野田 守¹、原田 英光²(¹ 岩医大 歯 う蝕、² 岩医大 歯 発生生物)

【背景】接合上皮はエナメル質と接着することで歯周組織への異物の侵入を防ぐ役割を担っているが、歯頸部齲蝕の場合、修復材料によっては接合上皮の接着性の低下が生じる。そこで材料への上皮細胞接着性を向上させるために接合上皮分泌タンパクであるODAM(odontogenic, ameloblast associated protein)が有用であるかを検討した。

【方法】ハイドロキシアパタイトディスク(Hp)上に窩洞を形成し、コンポジットレジン(CR)を充填した培養プレートを作製した。そのプレートのODAMコート群と非コート群で接合上皮細胞株(mHAT-JE01)の初期接着、接着時の細胞の形態、細胞増殖能、アクチンフィラメ

ントの形成等について検討した。また走査電子顕微鏡(SEM)撮影にて細胞形態の違いや細胞突起の形態や数を調べた。

【結果】ODAMコート群は非コート群に比べて極めて高い初期接着能、増殖能、細胞の伸展に伴ったアクチン形成能を示した。SEM解析からもODAMコートしたCRの方が、より細胞の伸展性や突起形成を顕著に認めた。

【考察】以上の結果から、ODAMコートはレジン充填による接合上皮接着能・増殖能の低下を回復させる可能性が示された。ODAMで表面コートすることは、コンポジットレジン修復による治療ケースでも歯周病予防効果が期待できると思われる。