

〈私立大学戦略的研究基盤形成支援事業〉

「口腔の加齢制御を目指した集学的研究拠点の形成」の進捗

齋 藤 一 郎

研究代表者 病理学講座

本学歯学部で実施されている私立大学戦略的研究基盤形成支援事業は文部科学省から2015年に採択され、今年度で4年目を迎えることになりました。本研究事業は私立大学の研究基盤の形成を目的に、研究プロジェクトに対して重点的かつ総合的に補助が行われ、わが国の科学技術の進展に寄与することが求められており、各大学が最先端の研究や地域に根差した研究などの観点から文部科学省が審査し、これまで決定されてきました。本学歯学部の研究課題名は「口腔の加齢制御を目指した集学的研究拠点の形成」であり、21世紀医療の緊急課題として長寿医療が担う責任は重大であることから、長寿科学研究の緊急課題として高齢者の様々な疾患の増加に如何に対処しうるのか、どのような具体的方策が可能であるのかを研究テーマとし各研究分担者が研究プロジェクトを遂行してきましたが、2019年は最終年度となりますので、これまでの研究成果を広く学内外に周知したく、研究プロジェクトの進捗を「鶴見歯学」にまとめました。

世界的にみても高齢者の口腔機能の低下を適切に評価し治療する方法に関してはいまだに確立されていません。従って、本学歯学部等の基礎講座と臨床講座の連携により集学的な研究を実施することで、口腔機能を維持し加齢に伴う口腔機能の低下を軽減ないし阻止することがこの研究課題の到達目標です。本研究プロジェクトの外部評価は関連領域の有識者である慶應大学医学部の坪田一男教授、東京大学医学部の水島昇教授、広島大学歯学部の高田隆教授に委嘱し研究成果の中間評価が実施され高い評価を頂きましたが、今後もさらなる発展が期待されるところです。

《私立大学戦略的研究基盤形成支援事業》

長寿病因・病態モデルマウスの作出と解析

—難治性唾液腺疾患の病因・病態解明と効果的診断法確立のための基礎的研究—

斎藤 一郎

鶴見大学歯学部病理学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

唾液腺には難病とされる自己免疫疾患や生活習慣病の症状として口腔乾燥症（ドライマウス）が生じる。ドライマウスは加齢変化を含め種々の要因により唾液分泌量の減少を来す疾患で、上部消化管障害や感染症などの誘因となるだけでなく、口腔においては摂食困難のほか、味覚異常、齲蝕、歯周病、舌痛症などの誘因となり患者の quality of life を著しく低下させるが、その大半は原因不明であることから疾患非特異的な診断法や対症療法が行われているのが世界の現状である。このことから本研究課題では難治性唾液腺疾患の病因・病態解明と特異的な診断法・治療法の確立を目指して、1) 唾液分泌障害における生活習慣病関連 SNPs の関与ならびに、2) 2 型糖尿病モデルマウスにおける唾液分泌障害成立機序を検討した。

2. 研究進捗状況と研究成果

＜研究成果＞

1) 唾液分泌障害における生活習慣病関連 SNPs の関与
ドライマウスの発症要因の一つとして糖尿病や高血圧の生活習慣病が背景にあることから、その遺伝的素因を明確にすることは唾液分泌障害の予防ならびに発症や進行を遅らせるために有用である。このことからドライマウスにおける生活習慣病関連一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism: SNP）の解析を行った。鶴見大学歯学部附属病院ドライマウス外来を受診しシェーグレン症候群を除いた女性 238 名を対象とした。対象者は安静時唾液分泌量と刺激時唾液分泌量によりドライマウス群（122 名）ならびに対照群としての非ドライマウス群（116 名）の 2 群に分類した。唾液中の剥離細胞から DNA を抽出し、ジェノタイピングを行った。解析対象とする SNPs は、日本人でのアレル頻度が確認されている糖尿病関連 16 種、メタ

ボリックシンドローム関連 16 種など計 185 種（一部重複）の生活習慣病関連 SNPs とした。

SNPs とドライマウスとの有無の相関を検討したところ、6 種の SNPs に統計的に有意な相関が得られた。また、ロジスティック回帰分析を行い、相互的な寄与率を考慮した結果、生活習慣病関連遺伝子として知られている HMOX 1 (Heme Oxygenase 1) がドライマウスの発症リスクとして、さらに CD36 遺伝子領域においてはリスク抑制的なマーカーとして関連が認められた。HMOX 1 は酸化ストレスから生体を防御する酵素として知られ、血管内皮細胞の恒常性の維持に関与しており、SNP による HMOX 1 遺伝子の機能的変化が酸化ストレスの緩衝作用に関与していると想定された。一方、CD36 はリポ蛋白質代謝に関与する B 型スカベンジャー受容体で、血小板や血管内皮細胞、マクロファージなどの細胞膜に発現している。とくに、マクロファージにおいては酸化 LDL (low density lipoprotein, 低密度リポタンパク質) やアポトーシスが生じた細胞などに結合することが知られ、脂質代謝、自然免疫など炎症応答およびアテローム血栓症の成立に寄与していることが知られている。CD36 遺伝子の SNP がドライマウスの発症を抑制する可能性が示されたことから局所の炎症がドライマウスの発症リスクと関連すると推測された。

2) 2 型糖尿病モデルマウスにおける唾液分泌障害成立機序の検討

糖尿病は全身の血管傷害に続発して全身に様々な症状を示すと共に口腔領域の症状としてドライマウスが知られている。従来、糖尿病患者のドライマウス発現機構は多尿と脱水が原因と考えられてきたが、近年、高血糖状態により活性酸素種の産生亢進がドライマウス成立の一因として推察されている。また蛋白質の糖鎖のうち β -N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 修飾の異常が心・血管疾患やメタ

ポリックシンドロームの悪化に関連していることが明らかにされつつある。一方、ヒストン 2A の 40 番セリン残基 (H2AS⁴⁰) の GlcNAc 修飾により細胞は遺伝子発現のエピジェネティックな変化と DNA 損傷に対する抵抗性・修復機能を獲得することが *in vitro* で示されている。糖尿病では ROS の産生による唾液腺傷害と、H2AS⁴⁰ の GlcNAc 修飾による唾液腺組織の保護の背反する現象が生じていると想定されることから上記の現象が 2 型糖尿病自然発症マウスである db マウスの唾液腺で生じている可能性を検討した。

唾液腺の組織変化を検討したところ明らかな炎症性変化は見られないものの、TUNEL による検討では db マウスでは増齢的な血糖値の上昇に伴い唾液腺組織でのアポトーシスの増加と共に唾液分泌量が減少した。高血糖による

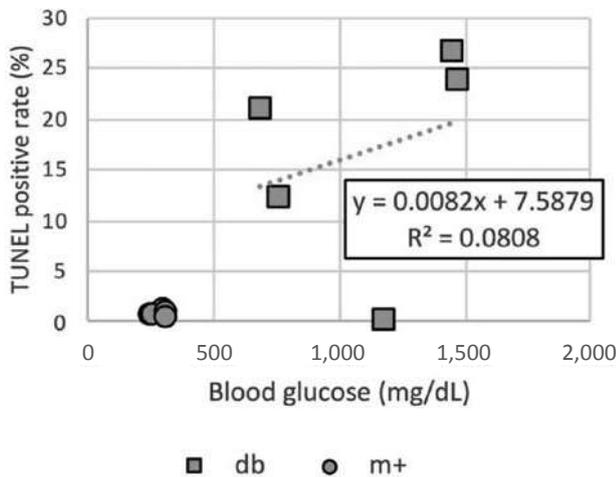


図 1 db マウス (23 週齢) の唾液腺上皮細胞における TUNEL 陽性細胞率

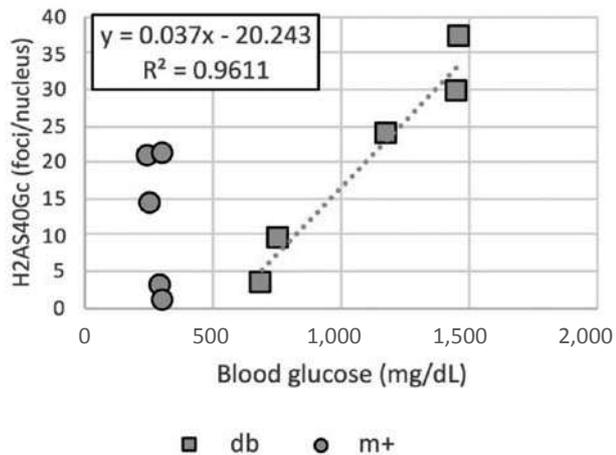


図 2 db マウス (23 週齢) の唾液腺上皮細胞における H2AS⁴⁰GlcNAc の foci 形成数

GlcNAc 修飾がアポトーシスに関与しているかを明らかにするために抗 H2AS⁴⁰GlcNAc 抗体を用いた蛍光染色を行ったところ、db マウスでは 6 ~ 13 週齢で腺上皮細胞の核に foci 形成を認め、23 週齢ではその数が増加したが、30 週齢では foci の数が減少した (図 1)。さらにアポトーシスおよび H2AS⁴⁰ への GlcNAc 修飾と血糖値は正の相関を示す傾向であった (図 2)。

これまでの予備的検討の結果は、2 型糖尿病モデルである db マウスの生体内では糖尿病の初期段階では H2AS⁴⁰ の GlcNAc 修飾が増強し DNA 保護に働くものの、やがて GlcNAc 修飾の減少に伴い、ROS 産生による DNA 傷害により唾液腺のアポトーシスが促進されると考えられ、糖尿病による高血糖が唾液腺の組織傷害を促進させる可能性が示唆された。

<今後期待される研究成果>

HMOX1 遺伝子の SNP により酸化ストレス耐性が低下しドライマウスの誘因となると仮説されることからその詳細を検討するために唾液腺由来細胞の HMOX 1 遺伝子の発現を RNAi によりノックダウンし酸化ストレス環境下における細胞傷害を検討する。また唾液腺由来細胞の培地をを高グルコースまたは通常グルコースに調整して培養し、H2AS⁴⁰GlcNAc 修飾の変化による細胞傷害の詳細を検討する。さらに GlcNAc 修飾阻害剤を db マウスに投与し GlcNAc 修飾の唾液腺傷害に及ぼす影響を詳細に検討する。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Tanaka, J., Ogawa, M., Hojo, H., Kawashima, Y., Mabuchi, Y., Hata, K., Nakamura, S., Yasuhara, R., Takamatsu, K., Irié, T., Fukada, T., Sakai, T., Inoue, T., Nishimura, R., Ohara, O., Saito, I., Ohba, S., Tsuji, T. and Mishima, K.: Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nature Commun.* 9 : 4216, 2018.
- 2) Sakano, K., Ryo, K., Tamaki, Y., Nakayama, R., Ebihara, S., Tozuka, K. and Saito, I.: Effects of Singing on Oral Function, Stress, and Immunity. *Oral Health and Care.* 2 : 1 ~ 6, 2018.
- 3) Saruta, J., To, M., Sugimoto, M., Yamamoto, Y., Shimizu, T., Nakagawa, Y., Inoue, H., Saito, I. and Tsukinoki, K.: Salivary Gland derived BDNF Overexpression in Mice Exerts an Anxiolytic Effect. *Int. J. Mol. Sci.* 18 : E1902, 2017.
- 4) Uehara, O., Takimoto, K., Morikawa, T., Harada, F., Takai, R., Adhikari, B. R., Itatsu, R., Namura, T., Yoshida, K., Matsuoka, H., Nagayasu, H., Saito, I., Muthumala, M., Chiba, I. and Abiko, Y.: Unregulated expression of MMP-9 in gingival epithelial cells induced by prolonged stimulation with arecoline. *Oncol. Lett.* 14 : 1186 ~ 1192, 2017.

- 5) Kusakabe, Y., Shindo, Y., Kawai, T., Takahashi, Y., Koori, M., Inoue, H. and Saito, I.: Sex-Based Differences in Smgc Expression in the Submandibular Gland of C57BL/6 Mice. *Pathobiology*. 83 : 287 ~ 294, 2016.
 - 6) Tanaka, N., Muro, Y., Suzuki, Y., Nishiyama, S., Takada, K., Sekiguchi, M., Hashimoto, N., Ohmura K., Shimoyama, K., Saito, I., Kawano, M. and Akiyama, M.: Anticentromere antibody-positive primary Sjögren's syndrome: Epitope analysis of a subset of anticentromere antibody-positive patients. *Mod. Rheumatol.* 10 : 1 ~ 7, 2016.
 - 7) Inoue, H., Kishimoto, A., Ushikoshi-Nakayama, R., Hasaka, A., Takahashi, A., Ryo, K., Muramatsu, T., Ide, F., Mishima, K. and Saito, I.: Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjögren's syndrome. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 59 : 107 ~ 112, 2016.
 - 8) Takahashi, A., Inoue, H., Mishima, K., Ide, F., Nakayama, R., Hasaka, A., Ryo, K., Ito, Y., Sakurai, T., Hasegawa, Y. and Saito, I.: Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. *PLoS One.* 10 : e0116008, 2015.
- <代表総説論文>
- 1) 斎藤一郎：6ドライマウスと慢性炎症, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患, 7 : 33 ~ 35, 2018.
 - 2) 斎藤一郎：特集：口腔疾患のサイエンス 総論 歯科医学研究の最前線, 月刊 細胞, 50 : 2 ~ 3, 2018.
 - 3) 斎藤一郎：口腔から考える全身の抗加齢医学, 週刊医学のあゆみ, 261 : 638 ~ 641, 2017.
 - 4) 斎藤一郎：先制医療としての抗加齢歯科医学, 日本歯科医師会雑誌, 8 : 19 ~ 24, 2016.
 - 5) 斎藤一郎：超高齢社会におけるドライマウスへの対応—ドライマウスへどう取り組むべきか, 日本歯科評論, 3 : 30 ~ 6, 2015.
- <代表図書>
- 1) 斎藤一郎 (分担)：シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版, 診断と治療社, 東京, 2018.
 - 2) 斎藤一郎 (編著・分担)：超高齢社会におけるドライマウスへの対応—いま, ドライマウスにどう取り組むべきか, 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ, 東京, 2017.
 - 3) 斎藤一郎 (分担)：EBウイルス 自己免疫疾患 (関節リウマチ, Sjogren 症候群) 第3版, 診断と治療社, 東京, 2015.

微生物診断への応用

—抗真菌薬による口腔内 *Candida* の抑制は全身状態を改善させる—

草 塩 英 治 大 島 朋 子 前 田 伸 子

鶴見大学歯学部口腔微生物学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

口腔常在真菌 *Candida* は健康な宿主からも分離されるが、高齢者など易感染宿主における日和見感染症の原因微生物として、口腔および全身の健康状態に悪影響を及ぼすことが知られている。これまでの検討により、本真菌はドライマウス (DM) との高い相関が認められていることから、DM 外来患者を対象とし、診断バイオマーカー候補を検討すべく血清学的検査を行った。また、口腔内 *Candida* 量を減少させることが全身性の改善に繋がることを期待し、抗真菌剤を口腔ケアに用いてきた。今回、介護老人保健施設の入所者で DM が疑われる経管栄養を実施している入所者の口腔ケアに介入する機会を得たことから、抗真菌薬による口腔ケアの全身への効果について確認した。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

1) 口腔 *Candida* と血清学的検査値との相関について

2007年11月～2009年3月末に本学附属病院 DM 外来患者を対象とした。被験者は339名、平均63.7歳、女性282名、男性57名。*Candida* の検出方法は舌背表面を10回滅菌綿棒で擦り、CHROMagar *Candida* (Chromagar microbiology, France) へ直接接種し、30℃にて48時間培養した後、*Candida* CFU 数を計測した。血清分析は(株)SRLに委託し、統計解析はSPSS14.0Jを用いた。

外来患者から提供された口腔内 *Candida* CFU と血清サンプルの各項目との相関を調査した結果 (図1)、検出菌数と有意な負の相関が見られたのが、安静時唾液量、刺激唾液量、DHEA、血色素量、赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数、血清アマラーゼであった。年齢、唾液量の減少が *Candida* のキャリア率や菌数を上昇させることは以前の結果からも明らかであるが、本真菌の増加がこれらの血

液成分の低値と関連することに関しては、更なる検討が必要であると思われた。一方、有意な正の相関が LD_LDH、AST (GOT)、CRP 値との間に見られたことから、口腔内における *Candida* の存在が体内中における肝機能の低下や炎症の存在と関連する可能性が示唆された。

2) 経管栄養を実施している入所者 (2名) への口腔ケアについて

2015年6月～2015年10月、新潟県上越市の介護老人保健施設サンクス米山で、ご家族による同意が得られた経管栄養を実施している入所者の口腔ケアに日本薬局方アムホテシリン B シロップ 100 mg/ml (ハリゾンシロップ 100 mg/ml、富士製薬工業株式会社) を用いた。用法・用量は1回 AMPH-B 5 mg (付属のスプイトで1滴) を口

負の相関		<i>Candida</i> CFU	正の相関		<i>Candida</i> CFU
安静時唾液量 n=308	<i>r</i>	-0.456	LD_LDH n=326	<i>r</i>	0.180
	<i>p</i>	0.000		<i>p</i>	0.001
刺激唾液量 n=306	<i>r</i>	-0.395	AST_GOT n=326	<i>r</i>	0.164
	<i>p</i>	0.000		<i>p</i>	0.003
DHEA n=326	<i>r</i>	-0.252	CRP n=326	<i>r</i>	0.139
	<i>p</i>	0.000		<i>p</i>	0.012
血色素量 n=325	<i>r</i>	-0.140			
	<i>p</i>	0.012			
赤血球数 n=325	<i>r</i>	-0.126			
	<i>p</i>	0.023			
ヘマトクリット値 n=325	<i>r</i>	-0.122			
	<i>p</i>	0.028			
血小板数 n=325	<i>r</i>	-0.120			
	<i>p</i>	0.031			
アマラーゼ n=326	<i>r</i>	-0.112			
	<i>p</i>	0.043			

r, 相関係数
p, 有意確率 (両側)

図1 口腔 *Candida* CFU と血清学的検査データとの相関

腔内への塗布，1日3回食後，必要に応じ，医師の判断で適宜増減した。口腔環境の評価には言語聴覚士（Speech-Language-Hearing Therapist; ST）により行った。また，施設における口腔内 *Candida* 量は医療用体外診断薬ガンジダイエロー培地「F」（富士製薬工業株式会社）により判定した。

症例1の入所者（80歳，男性）の場合

右被殻出血により右上下肢麻痺・全失語が残存し，胃瘻造設を試みたが，胃癌に対して行われたルーワイ法のため，断念し経鼻経管栄養となる。日中でも介護士の声かけにも反応がなく，臥床して終日過ごされていた。義歯は使用しておらず，残存する歯は8本，う蝕，残根が多数存在しており，歯肉炎も有り，DMのためスポンジ清掃が痛いらしく，抵抗することが多かった。その他の症状として便秘症状が強く，4日毎の排便と暖下剤の投与でコントロールしていた。口腔内 *Candida* は擬陽性で AMPH-B の使用を開始した。1回5mg，1日3回で開始し，2週間経過時点でDMが緩和され，口腔清掃への抵抗が無くなった。さらに，これまでは声かけにも反応せず，テレビも見なかったが，テレビを見るなどの意思表示が生じた。口腔内の粘膜症状は多少改善した程度で，それ以上の改善は見られなかった。開始2か月後 AMPH-B を1回50mgまで増量した。AMPH-B の使用開始5か月で口腔内 *Candida* は陰性となり，それとほぼ同時期に便秘症状も暖下剤のみでコントロールされ，4日毎の排便処置を行うことが無くなった。

症例2の入所者（81歳，男性）の場合

頭蓋底骨髄炎による右顔面神経麻痺，左舌下神経麻痺，右舌咽神経麻痺を併発し，経口摂取が不能となり，胃瘻造設が施行された。寝たきりで，会話もできないが，声出しなどで意思表示を行っていた。義歯は使用しておらず，残存する歯は24本。治療を必要とするう蝕などは無かった。しかし，体重は低下傾向が続いており，抵抗力が無く，発熱を頻繁に起こしていた。また，重度のDMで，口腔内には口内炎などが生じており，粘り気の強い痰が多かった。口腔内 *Candida* は陽性であったことから，1回 AMPH-B 50mg，1日3回で開始した。1週間後，口腔内 *Candida* は擬陽性となり，粘着性の強かった痰が取れやすくなり，付着量も低下した。その後，1回5mg，1日3回に用量を変更したが，発熱も起こらず痰除去の負荷も無くなった。しかし，口内炎は改善しなかったため，症例1と同様に2か月後から再び1回50mgの用量に戻した。これにより

多少，口腔環境は改善したが，その2か月後に頭蓋底骨髄炎が再発・搬送された。

今回の2症例は含嗽が出来ない状況のため，投与量は当初予定していた1回 AMPH-B 5mgではなく，口腔内全体に塗布するために，その10倍量が必要であった。増量に伴う薬剤のコスト増はあるものの，過剰投与による有害事象などは認められなかったが，適切な投与方法や用法・用量については課題が残った。

<今後期待される研究成果>

口腔内への *Candida* 感染は，口腔内のみならず，血液成分にも影響して全身に悪影響を与える可能性が示唆された。一方，口腔内 *Candida* を抗真菌薬で除菌することで，口腔環境が改善し，便通の改善や発熱の抑制効果などの全身性の改善も見受けられ，抗真菌薬による口腔ケアの有用性が強く示唆された。今後は，臨床現場で得られた現象の詳細を検証し，高齢者のQOL向上に貢献していきたい。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Kojima, Y., Ohshima, T., Seneviratne, C. J. and Maeda, N.: Combining prebiotics and probiotics to develop novel synbiotics that suppress oral pathogens. *J. Oral Biosci.* 58 : 27~32, 2016. doi: 10.1016/j.job.2015.08.004
- 2) Ohshima, T., Kojima, Y., Seneviratne, C. J. and Maeda, N.: Therapeutic application of synbiotics, a fusion of probiotics and prebiotics, and biogenics as a new concept for oral *Candida* infections: A mini review. *Front. Microbiol.* 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00010>
- 3) 前田伸子：常在真菌 *Candida* の病原性—カンジダ症とその対応—，*歯薬療法*，35：115～123，2016.
- 4) 木村陽介，山本共夫，草塩英治，前田伸子：抗真菌剤の長期使用は歯垢量を減少させる，*歯薬療法*，36：9～14，2017.

<代表図書>

- 1) 口腔カンジダ症治療指針：共著 日本歯科薬物療法学会，口腔カンジダ症薬物療法ガイドライン制定委員会編，医歯薬出版，2016.

<代表学会発表>

- 1) 抗真菌薬添加含嗽薬による口腔ケアの有用性の確認（口頭発表），日本口腔ケア学会，千葉，2016年4月.
- 2) 経管栄養を受けている入所者の口腔ケアについて（ポスター），日本口腔ケア学会，千葉，2016年4月.
- 3) Analysis of effective component produced by oral probiotic Candidates against *Candida albicans*. 第58回歯科基礎医学会学術会，札幌，2016年8月.

長寿関連遺伝子の基礎的研究

黒田 範行

鶴見大学歯学部解剖・組織細胞学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

老化の原因の一つとして、加齢に伴ってタンパク質の異常が発生し、そのようなタンパク質を分解することができず蓄積していき、やがては細胞そのものの機能の異常をきたすようなケースが有ることが指摘されている。生体内で産生されたタンパク質はその役割を終えると、ユビキチン・プロテアソーム系、もしくはオートファジー系によって分解されることが知られているため、これらのタンパク質分解系を促進させることによって不要タンパク質を迅速に分解することで、老化の一部を防止することができることが示唆されている。

そのようなタンパク質分解系を促進させるような物質を見出し、老化防止への応用を目的とする研究である。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

漢方薬として様々な場面で用いられる甘草の主成分として知られるグリチルリチンは、肝炎などに対して処方されているが、その作用機序などは詳細な部分に関しては未だに判明していない。

まずグリチルリチンの薬理作用を確認するために LPS と D-galactosamine をマウスの尾静脈より投与することで急性肝炎のモデルを作成し、事前のグリチルリチン投与の有無によって起きる変化を確認したところ、ALT、AST といった肝炎の指標がグリチルリチンの事前投与によって有意に減少することが判明した。またこの際に肝臓で見られた肝細胞のアポトーシスがグリチルリチンの事前投与によって減少することも明らかにした。

このような肝臓における炎症抑制のメカニズムを明らかにするために、炎症関連分子である HMGB1 (High Mobility Group Box 1) の挙動を確認したところ、炎症の進行に伴ってその局在は核内から核外、そして細胞外へと変化していくのに対し、グリチルリチンの事前投与によ

て、その局在の変化は抑制されることも判明した。この HMGB1 の局在の変化にはアセチル化が関与しているのではないかという仮説があるので、抗アセチル化リジン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、グリチルリチンの投与によってリジンのアセチル化は抑制されていることが判明した。これらのことよりグリチルリチンは HMGB1 のアセチル化を調節することにより、その局在を調節している可能性が示唆された。

また HMGB1 の機能としてはこれまで核内に存在するタンパク質であり、DNA 結合ドメインが存在することから当初は転写因子ではないと言われていたが、実際に転写因子として働いている証拠が見当たらなかったために転写関連因子とされてきた。それに対して抗 HMGB1 抗体を用いて ChIP アッセイを行った結果、HMGB1 タンパクが *Gsto1* 遺伝子 (*Glutathione S-Transferase Omega-1*) のプロモーター領域に結合することを明らかにした。これらのことより、HMGB1 が転写因子として *Gsto1* 遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

このようにしてグリチルリチンの薬理作用の一部を明らかにしてきたが、オートファジーの系への影響を明らかにするべく、グリチルリチンの事前投与の有無の肝臓より RNA を抽出し DNA マイクロアレイ法を用いて発現遺伝子を網羅的に解析した結果、オートファジー関連遺伝子である *Atg5*、*Rab24* の発現が変化していることが明らかとなった。そこでマウス肝細胞由来のセルラインである Hepal-6 にグリチルリチンを添加した場合としなかった場合での *Atg5*、*Rab24* 遺伝子の発現を real time PCR を用いて確認したところ、有意に *Atg5*、*Rab24* 遺伝子の発現は亢進していた。

このように遺伝子レベルでオートファジー関連遺伝子の発現が亢進していることが確認されたので、実際にオートファゴソームに特異的に結合する蛍光色素を用いて、オートファゴソームの生成を確認してみたところ、グリチルリチンの投与によって、培地から血清を除くことによって飢

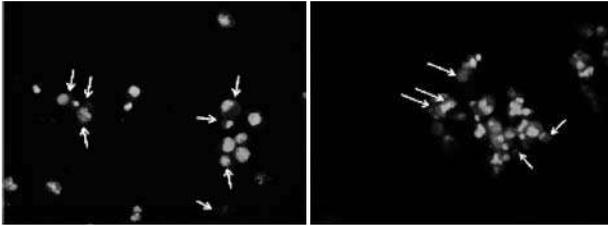


図 1 左はポジティブコントロールとして血清を除去して HBSS 緩衝液中で培養し飢餓状態に置いたもの。右はグリチルリチンを添加し血清存在下で培養したもの。細胞質にオートファゴソームが検出された部分を矢印で示している。

餓状態にしたポジティブコントロールより顕著なオートファゴソームの生成が確認された (図 1)。これらのことからグリチルリチンにはオートファジー亢進作用があることが判明した。

<今後期待される研究成果>

グリチルリチンのオートファジー亢進作用が明らかになったので、今後は亢進剤としての定量を行うことで亢進剤としての位置付けが可能となる。また様々な不要タンパク質の蓄積に対して、グリチルリチンが有効性を示すこと

が可能であれば、そのような病変に対する薬剤として期待される。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Hara, Y., Wake, K., Inoue, K., Kuroda, N., Sato, A., Inamatsu, M., Tateno, C. and Sato, T.: Development of the heart endocardium at an early stage of chick embryos evaluated at light- and electron-microscopic levels. *Anatomical Record*. 299 : 1080 ~ 1089, 2016.

<代表図書>

- 1) Kuroda, N. and Sato, T.: Novel Mechanism Supporting Therapeutic Effects of Glycyrrhizin in Acute or Chronic Hepatitis. In book: *Biological Activities and Action Mechanisms of Licorice Ingredients*, Chapter 9, Intech Open, 2017.

<代表学会発表>

- 1) 黒田範行, 佐藤哲二: LPS 投与炎症モデルにおけるグリチルリチンによるオートファジーへの影響, 第 23 回日本病態プロテアーゼ学会, 甲府, 2018 年 8 月.
- 2) 黒田範行, 佐藤哲二: LPS 投与炎症モデルにおけるグリチルリチンの作用効果とオートファジー関連遺伝子, 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月.

硬組織の老化度分析

—加齢に伴う歯質変化について—

石川美佐緒 塩崎一成
田中倫 下田信治

鶴見大学歯学部口腔解剖学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

本研究プロジェクトは、5年間の研究事業計画において、ヒトの歯を構成する無機質が加齢に伴いどのように変化するのか、有機質や水分の構成割合とともに定量的観察を行い、歯質の経年的変化に関する物理化学的データベースを構築することを目的とする。

生物学的な代謝を営み、かつ加齢とともに変化する歯に関する定量的組成データは、他の生体器官と調和しつつ、加齢とともに変化することを求められる歯科材料開発のための重要かつ必須の基礎的データとなりうると思う。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

若年者から高齢者までの各年代で抜去時年齢および歯種の明らかな日本人永久歯を用いて、歯質（エナメル質および象牙質）の組成（無機質、有機質、水分）、物理化学的性質（石灰化度、硬度、構造）、溶解性（耐酸性）の変化について検討を行った。

エナメル質の組成

X線マイクロCTを用いて20代と60代の抜去歯エナメル質の無機質量を測定した結果、CT画素値は20代では $x = 1223 \sim 1346$ 、60代では $x = 1468 \sim 1552$ と緩やかな増加傾向を示した。また、エナメル質のビッカース硬度は若年者300 Hvから高齢者500 Hvと増加していることも確認された。比色定量法により各年代の有機質量を測定した結果、若年者ではタンパク量はばらつきが大きいが、加齢とともに次第に値が収束する傾向が認められた。アルコール脱水法により各年代の水分量を測定した結果、 $x = 0.886 \pm 0.003\%$ となり、加齢に伴い緩やかな減少傾向が認められた。

以上の結果より、エナメル質は加齢に伴い有機質量のばらつきが小さくなり、水分量も減少傾向を示していた。これは無機質量の増加を意味していると考えられる。

象牙質の組成

シンクロトンCTを用いて象牙質の無機質量を測定した結果、20代までは2.3%（/年）、30代から50代では1.7%（/年）、60代以降で1.1%（/年）ずつ経年的に増加した。加齢現象で出現する透明象牙質（高石灰化象牙質）の形成は、30代までの群と、40代から60代までの群で有意差を認めたが、70代以降では有意差が認められなかった（Fig. 1）。

以上の結果より、加齢に伴い象牙質の無機質量は増加するが、経年的な増加量は次第に緩やかとなる傾向を示した。これは70代以降で象牙質の生理的代謝の減少が関与しているのではないかと考えられる。

溶解性（耐酸性）の変化

還流脱灰法により酸による歯質の溶解性を測定した結果、20代と60代各群内で被験歯ごとにばらつきが大きく、

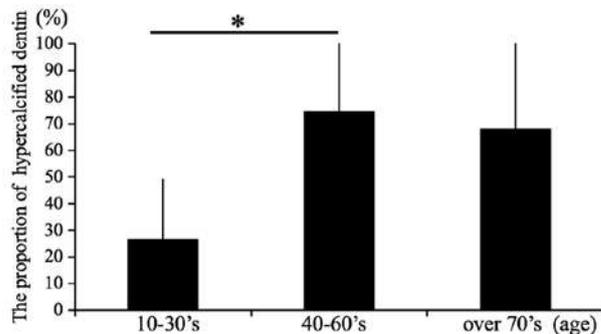


Fig. 1 Comparison of the percentage of hypercalcified dentin by age. A significant difference was observed between 10 to 30 and 40 to 60 years. (* : $p < 0.05$)

Table 1 Means of Volumetric Loss of Enamel

age group*	demineralized time			mm ³ /s (S.D.)
	30 sec	2 min	1 h	5 h
20's	69.8 (28.7)	34.3 (11.6)	3.6 (0.7)	2.8 (0.7)
60's	116.8 (73.0)	46.2 (18.5)	4.1 (1.5)	2.5 (0.6)

*n=8 each age group, tooth n=16, one same sample was used demineralized time

2群間に有意差は認められなかった (Table 1, 2).

また、形成直後の接合上皮に面するエナメル質、萌出後に口腔内環境に晒されたエナメル質、白斑 (ホワイトスポット) の認められるエナメル質各表層のリン酸カルシウムの結晶状態を解析した結果、形成直後のエナメル質では Mg が多量に検出され、これは非晶質リン酸カルシウム (ACP) の存在を示唆すると考えられた。萌出後に口腔内環境に晒されたエナメル質では Mg は痕跡的であり、低分子リン酸カルシウム (TCP/OCP) が確認された。白斑の認められるエナメル質では、Mg 量、TCP/OCP 含有量ともに被験歯間での差異が大きく、ばらつきが認められた。

以上の結果より、歯質の溶解性は経年的に変化する歯質組成とは異なり、その歯のおかれている環境要因 (萌出前後、脱灰) に影響を受ける可能性が示唆された。

<今後期待される研究成果>

現在の歯科医療において、個体寿命以上に永く機能し調和する金属等人工的かつ不変的歯科材料が応用されている。しかしながら、加齢とともに変化する個体と不変の人工物の不調和により、種々の問題が生じていることも確か

Table 2 Means of Demineralization Depth of Enamel

age group*	demineralized time			μ m (S.D.)
	30 sec	2 min	1 h	5 h
20's	4.2 (2.3)	15.8 (4.8)	163.7 (98.7)	548.4 (269.7)
60's	3.5 (1.3)	14.1 (4.7)	131.2 (83.6)	448.7 (172.6)

*n=9 each age group, tooth n=18, one same sample was used demineralized time

である。本研究は常に変化する生体の定量的分析を行うことにより、経年的基礎的データを集積することを目的としている。本研究結果が今後、生体親和性材料開発に参照されることを期待する。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Oki, H., Chiba, T., Shimoda, S. and Momoi, Y.: Demineralization and Remineralization Phenomena of Human Enamel in Acid Erosion Model. J. Hard Tissue Biol. 25 : 27 ~ 34, 2016.
- 2) Sekimizu, T., Shimoda, S. and Hosoya, N.: Age-related Changes in Root Dentin - Measurement of Hypercalciated Root Dentin Using Monochromatic Synchrotron Radiation X-ray Micro-CT. J. Hard Tissue Biol. 27 : 103 ~ 108, 2018.

<代表学会発表>

- 1) 関水健宏, 下田信治, 細矢哲康: 歯髄内血管および全身の動脈の石灰変性との関連に関する研究~歯の石灰変性の種類と髓石発生率の評価~, 第121回日本解剖学, 郡山, 2016年3月.

硬組織の病態解析

—加齢に伴う象牙質中の TGF- β の変化—

千葉理紗子 山本竜司 唐木田丈夫
齊藤まり 山越康雄

鶴見大学歯学部分子生化学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

象牙質は容量で45%が無機質、33%が有機質、22%が水分で構成されているが、加齢に伴ってそれらの成分がどのように変化しているか不明である。本プロジェクトでは研究期間内に加齢に伴う象牙質中の生理活性物質の一つであるトランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) の動態変化について調べることを主目的とした。本研究を通して、加齢に応じて歯髄腔全体に見られる第二象牙質の形成機構の知見が得られれば、何らかの原因によって歯質の欠損が象牙質にまで至った際に、その部分の歯髄腔側に生体防御反応として生じる象牙質形成機構の情報を得ることが可能となり、臨床応用に向けた基礎研究として重要な意義があるものと考えられる。

2. 研究進捗状況と研究成果

1) 象牙質中の TGF- β 活性の検出

生後約6か月のブタ第二大臼歯象牙質よりタンパク質画分を抽出し、各画分をヒト歯根膜培養細胞 (HPDL) に添加して上昇するアルカリホスファターゼ (ALP) 活性値を TGF- β 活性として評価したところ (ALP-HPDL システム)、象牙質シアロリタンパク (DSPP) 由来の象牙質リタンパク (DPP) および象牙質シアロタンパク (DSP) を含む酢酸-食塩画分 (AN) およびトリス-食塩画分 (TN) に TGF- β 活性が検出された¹⁾ (図1)。さらに AN 画分より DSP および DPP を分離精製してリコンビナント TGF- β 1 を用いて *in vitro* で結合実験を行ったところ、TGF- β 1 活性は、DSP および DPP と結合することで活性が維持される²⁾ことが判明した。

2) 免疫組織化学染色による臼歯歯胚中の TGF- β と TGFBR1 の検出

象牙質-歯髄複合体における TGF- β 1 と I 型 TGF- β 受容体 (TGFBR1) の局在をマウス第一大臼歯歯胚切片を用いて TGF- β 1 および TGFBR1 抗体に対する免疫染色にて調べたところ、TGF- β 1 および TGFBR1 抗体に対する陽性シグナルは象牙芽細胞層に局限しており、歯髄、象牙前質、象牙質ではほとんど観察されなかった³⁾。

3) 加齢に伴う象牙質中の TGF- β 活性の動態

生後約6か月のブタ第一、第二大臼歯 (6m-1, 6m-2) および12か月のブタ第一、第二、第三大白歯 (12m-1, 12m-2, 12m-3) (図2A) より歯根分岐部を調製し (図2B)、DSP および DPP を抽出して電気泳動およびウェスタンブロッティングによりそれらタンパク質の変化を調べた。その結果、SDS-PAGE 上で DPP は 6m-2 = 12m-3 > 6m-1 > 12m-2 > 12m-1 の順で多く認められた (図2C)。また DSP は 6m-2 と 12m-3 においては高分子 DSP が観察されたものの 6m-1, 12m-1, 12m-2 の試料では分解された DSP が観察された (図2D)。また、ALP-HPDL システムを用いた ALP 活性は DSP および DPP の分解に伴って低下する傾向にあった³⁾ (図2E)。

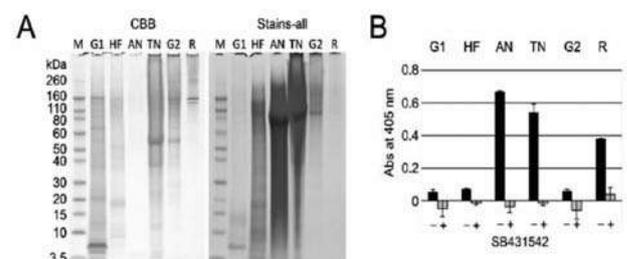


図1 生後約6か月のブタ第二大臼歯象牙質より抽出したタンパク質画分と TGF- β 活性

A: タンパク質画分の SDS 電気泳動像。

B: ALP-HPDL システムを用いた各画分中の TGF- β 活性の検出。

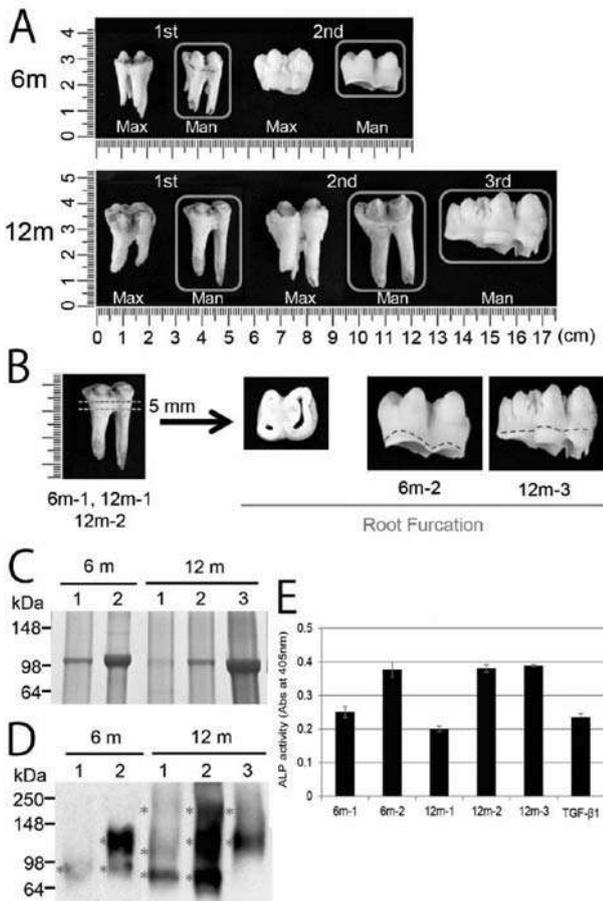


図 2 加齢に伴う DSPP 由来タンパク質と TGF- β 活性の動態
 A : 生後約 6 か月および 12 か月のブタの各種歯牙.
 B : 歯根分岐部の調製.
 C : SDS-PAGE による DPP の変化.
 D : Western blot による DSP の変化.
 E : ALP-HPDL システムによる TGF- β 活性の変化.

4) 今後期待される研究成果

本研究により、象牙質中の TGF- β は、象牙質中の主要非コラーゲン性タンパク質である DSPP 由来の DPP や DSP と結合することでその活性が維持され、加齢による DPP や DSP の分解に伴って、それらタンパク質から遊離して象牙芽細胞表面の TGFBR1 に結合してシグナル伝達を誘導することが示唆された。このオートクリン作用は、加齢に伴う第二象牙質の形成機構の解明に繋がるだけではなく、歯質の欠損が象牙質にまで至った際の生体防御反応として生じる第二象牙質形成機構解明の一助ともなり、将来的に生理活性物質を用いた歯髄保存治療への臨床応用に展開することも可能であると考えられる。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Yamamoto, R. and Yamakoshi, Y.: Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in porcine pulp and dentin—Gene expression and function. *J. Oral Biosci.* 58 : 120 ~ 127, 2016.
- 2) Yamakoshi, Y., Kinoshita, S., Izuhara, L., Karakida, T., Fukae, M. and Oida, S.: DPP and DSP are Necessary for Maintaining TGF- β 1 Activity in Dentin. *J. Dent. Res.* 93 : 671 ~ 677, 2014.
- 3) Niwa, T., Yamakoshi, Y., Yamazaki, H., Karakida, T., Chiba, R., Hu, J., Nagano, T., Yamamoto, R., Simmer, J., Margolis, H. and Gomi, K.: The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci. Rep.* 8: 4450, 2018.

<代表学会発表>

- 1) 丹羽堯彦, 長野孝俊, 五味一博, 山越康雄: 象牙質中の DSPP 由来タンパク質の加齢に伴う変化について. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会, 札幌, 2016 年 8 月 24 日.

新規治療法の分析

早 川 徹

鶴見大学歯学部歯科理工学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

現在、様々な骨補填材が臨床で使用されているが、骨再生が困難な高齢者や骨粗鬆症などの有病者に対する有効性については未だに問題を有している。我々は、DNA/プロタミン複合体が高齢者モデルとしての加齢ラットの骨形成を促進することを既に見出している。

本プロジェクトではまず、操作性や保存安定性に優れた改良型 DNA ペーストを製作することを目的とした。DNA ペーストは様々な形態の骨欠損に適応可能なインジェクタブル骨補填材としての可能性を有している。骨成長因子や薬剤などを内包した新規インジェクタブル DNA 複合体ペーストの骨形成について加齢モデルラットや骨粗鬆症モデルラットでの動物実験によって確認する。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

図1にDNAおよびプロタミンの構造式を示す。プロタミンはアルギニンリッチな塩基性タンパク質であり、DNAと水中で複合体を形成することが知られている。従来のDNA/プロタミン複合体ペーストは、この反応を利

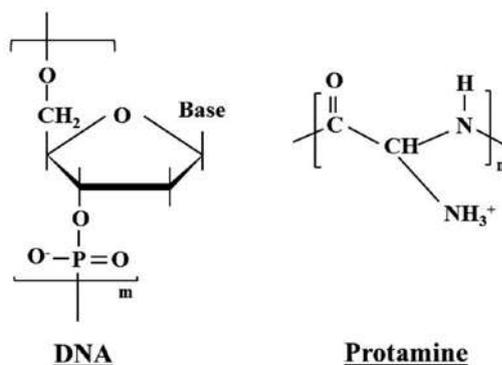


図1 DNAとプロタミンの構造式

用して、DNAとプロタミンから複合体を合成し、その複合体パウダーに大量の水を加えて作製していた。この方法では、ペースト作製に大量の水が必要である、少量のペースト作製が困難である、保存安定性に劣るなど、臨床応用に向けて幾つかの課題があった。

まず、DNA/プロタミン複合体から作製したペーストとの安定性を向上させるために、ポリビニルアルコールやポリアクリル酸、ポリ-N-ビニルピロリドンなどの水溶性高分子を複合化させたDNAペーストの作製を試みたが、適切な調度のDNAペーストを得ることはできなかった。

次に、DNA/プロタミン複合体に水を添加してペースト化するのではなく、複合体を合成することなく、その場でペーストを作製する方法を考案した。すなわち、粘調性のあるDNA水溶液にプロタミンを添加し、DNA水溶液の濃度や添加するプロタミンの量を調整して、賦形性の保持および流動性に優れた改良型DNA/プロタミンペーストを作製することができた。

また、カチオン性タンパク質として塩基性ゼラチンに注目し、DNA/ゼラチンペーストの作製も試みた。塩基性ゼラチンはDNAと反応することが報告されている。この場合、プロタミン同様に粘調性DNA水溶液にゼラチンを添加してペースト作製を試みたが、ゼラチンのかさ高さのためにペースト作製は困難であった。そこで、粘調性ゼラチン水溶液にDNAを添加し、ペースト作製を試みた所、流動性に優れた改良型DNA/ゼラチンペーストを作製することができた。

改良型DNA/プロタミンペースト、DNA/ゼラチンペーストの流動性は従来のDNA/プロタミン複合体から合成したペーストよりも優れていることも判明した。

2種類の改良型DNA複合体ペースト（DNA/プロタミンペーストおよびDNA/ゼラチンペースト）の骨形成に与える影響を検討するために動物埋入実験を行った（鶴見大学歯学部動物実験委員会 承認番号：28A071）。

6週齢のラット（Wistar系、オス）の上顎第一大臼歯を

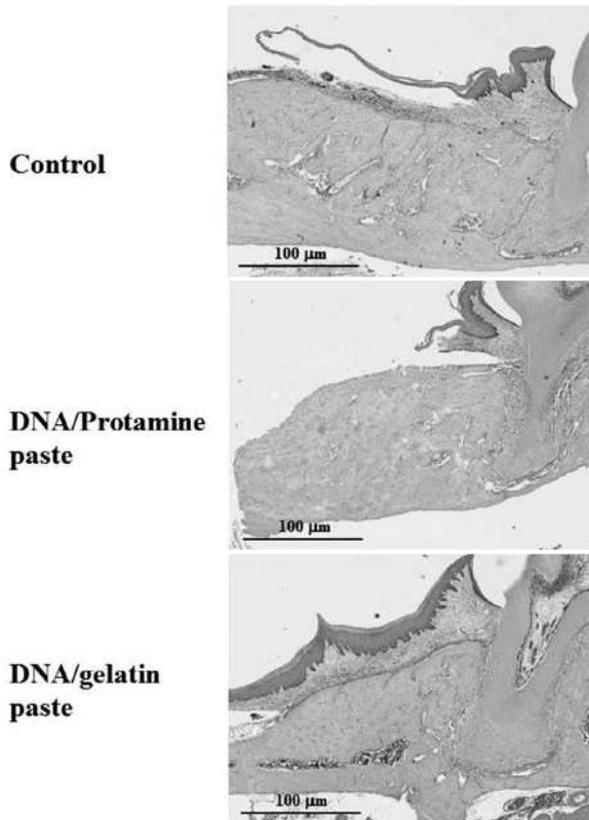


図 2 DNA ベースト埋入後のラット抜歯窩の脱灰研磨標本観察像

抜歯後、抜歯窩に2種類の改良型 DNA 複合体ペーストをその場で作製して埋入した。ペーストの埋入には、既成の CR シリンジとノズルを用いて注入した。抜歯後、ペーストを埋入しない群をコントロールとした。ペースト埋入2週後に周囲骨を含めて試料を摘出し、ホルマリン固定、アルコール脱水を行い、X線マイクロCTにて抜歯窩の治癒状態を観察した。次に、非脱灰研磨標本（塩基性フクシン・メチレンブルー染色）および脱灰標本（ヘマトキシリン・エオジン染色）を作製した。

X線マイクロCT観察の結果、2種類の改良型 DNA 複合体ペーストを埋入した場合、コントロールと比較して骨形成状態は良好であった。非脱灰研磨標本および脱灰標本における観察の結果でも、コントロールと比較して、良好な骨形成が認められ、抜歯窩の治癒が促進されていることが確認された。図2に脱灰研磨標本像を示す。特にDNA/ゼラチンペースト埋入の場合には、抜歯窩表面に骨組織が明瞭に観察され、DNA/プロタミンと比較すると骨髓腔が広く確認できた。また、新生骨形成量もDNA/ゼラチンペーストの方が多く観察された。

DNAペーストの骨形成メカニズムを解明するために、

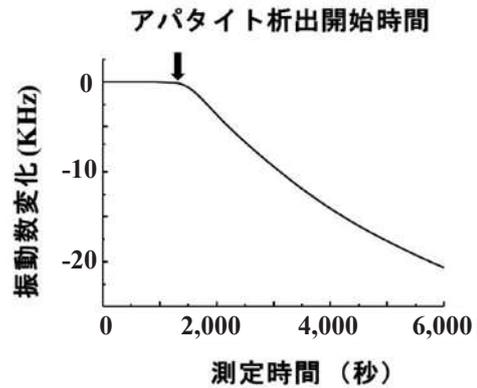


図 3 QCM 測定での振動数変化

DNAの骨形成能を水晶発振子マイクロバランス（QCM, 27MHz）法を用いて基礎的に検討した。チタンセンサーにトレスクロリド法を用いて、DNA/プロタミンの積層固定化を行い、セル内には疑似体液としてハンクス溶液を注入した。DNAとして2本鎖DNA、1本鎖DNAの2種類を用いて、QCMの振動数変化を測定した。チタンセンサーにアパタイトが析出すると、図3に示すように振動数の減少が観測できる。その結果、2本鎖DNA、1本鎖DNAどちらもアパタイトの析出開始時間が無処理チタンの2倍程度に速くなることがわかり、骨形成へのDNAの関与が示唆された。

今回、DNAの粘調水溶液にプロタミンを添加する、あるいはゼラチンの粘調水溶液にDNAを添加するだけで、その場で簡便にDNAペーストを作製することができた。さらに、従来の方法と比較して、調度の調整が簡便であり、少量のペースト作製が可能である、成長因子の添加も容易であるなどの利点を有している。今後、我々が開発したアミノ酸含有アパタイトペーストとの比較を行い、骨形成能について詳細な評価を行う。

以上、臨床応用可能な改良型DNAペーストの合成法を確立することができ、また、改良型DNAペーストが骨形成にも優れていることが判明した。

<今後期待される研究成果>

今回、DNAの粘調水溶液にプロタミンを添加する、あるいはゼラチンの粘調水溶液にDNAを添加するだけで、その場で簡便にDNAペーストを作製することができた。従来の方法と比較して、調度の調整が簡便であり、少量のペースト作製が可能である、成長因子の添加も容易であるなどの利点を有している。

今回は、流動性に優れたDNAペーストの特性を活かすために、微小な骨欠損モデルとしてラット抜歯窩を用

い、DNAペーストを埋入した。改良型DNAペーストは、垂直性骨欠損やくさび状骨欠損などの骨縁下欠損への適応も期待できる。今後、加齢モデルラットなども用いて、DNA水溶液/プロタミンペースト、ゼラチン水溶液/DNAペーストの骨形成について詳細に検討していく予定である。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Sakurai, T., Yoshinari, M., Toyama, T., Hayakawa, T. and Ohkubo, C.: Effects of a multilayered DNA/protamine coating on titanium implants on bone responses. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 104 : 1500 ~ 1509, 2016.

- 2) Miyamoto, N., Yamachika, R., Sakurai, T., Hayakawa, T. and Hosoya, N.: Bone response to titanium implants coated with double- or single-stranded DNA. *BioMed. Research. International.* Volume 2018, Article ID 9204391, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/9204391>.

<代表図書>

- 1) 福島忠男, 大野 純, 鍛冶屋浩, 御手洗誠, 早川 徹: 歯科再生・修復医療と材料, サケ由来骨再生材, シーエムシー出版, 東京, pp 35 ~ 49, 2015.

<代表学会発表>

- 1) 山近梨奈, 宮本永浩, 細矢哲康, 早川 徹: 改良型DNA複合体ペーストの骨形成能について, 平成30年度春期第71回日本歯科理工学会学術講演会, 大阪, 2018年4月.

加齢変化の解析への応用

—ロコモティブシンドローム解明に寄与する靭帯・腱細胞の分化制御メカニズム—

二 藤 彰 小松浩一郎
中 島 和 久 出 野 尚

鶴見大学歯学部薬理学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

加齢に伴い増加する運動器症候群：ロコモティブシンドローム (locomotive syndrome) では要介護になるリスクが高いことから、その病態の解明・治療法の開発が急務とされている。とりわけ運動器を構成する重要な要素である靭帯・腱組織については障害がおきるとその対応に苦慮する事が多い。靭帯・腱特異的な細胞の単離が容易でないことから、靭帯・腱組織形成・維持の基礎的知見については不明な事が多い。本研究では我々が開発した靭帯・腱細胞の単離方法に基づき、靭帯・腱細胞を単離し、その細胞の分化制御メカニズムを調べる。さらにモデルマウスを用いた *in vivo* 実験により生体での靭帯・腱の分化制御機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

腱・靭帯はコラーゲンに富み、scleraxis などの腱・靭帯特異的な分子を発現する。腱・靭帯組織の発生・分化過程ならびにその遺伝子発現制御機構は不明な点が多い。ヒストン末端のメチル化修飾が遺伝子発現制御や細胞分化に関わることが知られており、特にヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化を触媒する酵素である G9a は様々な組織の分化に関わることが知られる。そこで、G9a が腱細胞の分化制御に関わるか否かについて検討した。まず whole mount *in situ* hybridization を行ったところ G9a の発現は胎生 13.5 日の指の腱・靭帯原基相当領域で認められた。抗体染色で胎生 16.5 日の腱組織に発現が見られた (図 1)。次に我々が開発した靭帯・腱細胞の単離方法を応用し、初代培養腱細胞を単離後 *in vitro* で分化させた。G9a を含む分化関連遺伝子の発現を調べたとこ

ろ、scleraxis や tenomodulin のパターンと同様、分化に従って発現上昇が見られた。分化初期に高く、それ以降発現が減少した。次に生後の G9a flox/flox マウスから尾由来靭帯細胞の単離、培養を行い、この細胞に Cre 発現アデノウイルスを感染させることで G9a の機能を消失させたノックアウト細胞を作成した。G9a 欠損腱細胞の多くは扁平な細胞形態を示した。MTT 活性を測定したところ、G9a 欠損によって増殖能が低下していた。さらに qPCR にて分化形質の発現を調べたところ、コントロール細胞に比べ G9a 欠損細胞で scleraxis, type I collagen alpha 1chain, Six1 および Six2 などの腱細胞関連遺伝子の発現減少が認められた。tenomodulin のタンパクレベルでの発現も低下した。これらの結果から、腱細胞では G9a が増殖と分化双方の点で必須であることが示された。

靭帯・腱組織の骨への結合部は、enthesis と呼ばれ、靭帯・腱組織、線維軟骨組織、骨組織から構成される。この enthesis に強く発現する分子としてアネキシン A5 (Anxa5) を見出した。Anxa5 はメカニカルセンサー、アポトーシスシグナル伝達、細胞膜裏打ちタンパクとしての膜修復調節など多彩な機能が見出されているが、靭帯・腱

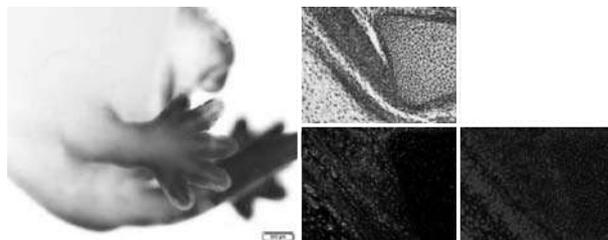


図 1 G9a の腱組織での発現
whole mount *in situ* hybridization (左) と G9a 抗体を用いた免疫組織染色 (下段左) と DAPI 染色 (下段右)

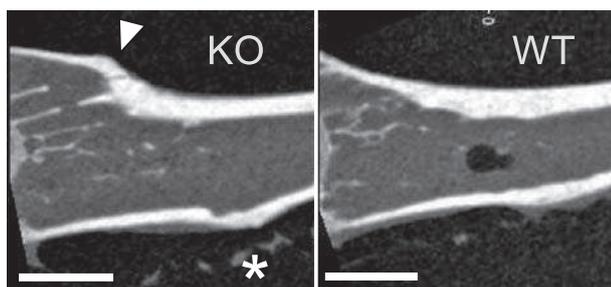


図 2 脛骨断面図
KO: Anxa5^{-/-}, WT: 野生型

組織における機能についてはこれまで報告が無い。Anxa5 遺伝子内部に lacZ をノックインした Anxa5 機能欠損マウス (Anxa5^{-/-}) を用い、成体マウスにおける Anxa5 の発現部位を lacZ の組織染色によって調べた。Anxa5-lacZ は、関節軟骨、骨膜、および骨と腱・靭帯付着部に強く発現していた。マイクロ CT による Anxa5^{-/-} マウスの解析の結果、生後 4 週において、Anxa5^{-/-} と野生型の間骨の顕著な差は認められなかったが、生後 7 週以降の Anxa5^{-/-} マウスにおいて、野生型に比べて enthesis 近傍に特異的な骨の肥大を認めた。この表現型は脛骨、大腿骨、上腕骨、下顎骨など、調べた骨でいずれも共通していた (図 2)。

Anxa5^{-/-} マウスの骨格系組織の変化が生後直後には無く、成長するに従って変化が認められることから、骨格系組織への力学的負荷の関与が想定された。そこで、前脛骨筋の腱組織を切除することで、骨への付着部への力学的負荷を軽減し、その影響を調べたところ、Anxa5^{-/-} マウス、野生型マウスともに同部位の大きさが減少した。さらに、尾部懸垂によって下肢への力学的負荷を減少させた場合も同様の結果を得た。これらの結果は、力学的負荷を

介して Anxa5 が腱・靭帯の骨への付着部の形成・維持を制御することを示唆するものである。

<今後期待される研究成果>

靭帯・腱細胞でもヒストンメチル化酵素はその増殖・分化について重要な役割を果たすことが示唆され、今後は転写因子の機能をどのように調節しているか詳細な解析が待たれる。また靭帯・腱が骨に接合する enthesis 領域では、力学的負荷がその維持や分化に重要であり、enthesis の新規制御因子としての Anxa5 がどのように力学的負荷からの細胞内シグナルを調節するか、詳細な解析が待たれる。Anxa5 の正常な機能はとりわけ成長期以降に必須であるため、加齢による影響の解析も重要な課題である。これらの研究を通じ、靭帯・腱細胞の分化制御の新たな仕組みを明らかにすることが期待できる。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Shimada, A., Ideno, H., Arai, Y., Komatsu, K., Wada, S., Yamashita, T., Amizuka, N., Pöschl, E., Brachvogel, B., Nakamura, Y., Nakashima, K., Mizukami, H., Ezura, Y. and Nifuji, A.: Annexin A5 Involvement in Bone Overgrowth at the Enthesis. *J. Bone Miner. Res.* 33 : 1532 ~ 1543, 2018.
- 2) Wada, S., Ideno, H., Shimada, A., Kamiunten, T., Nakamura, Y., Nakashima, K., Kimura, H., Shinkai, Y., Tachibana, M. and Nifuji, A.: H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochem. Cell Biol.* 144 : 13 ~ 20, 2015.
- 3) Ideno, H., Nakashima, K., and Nifuji, A.: Roles of the histone methyltransferase G9a in the development and differentiation of mesenchymal tissues. *J. Phys. Fitness Sports Med.* 4 : 357 ~ 362, 2015.

筋組織の病態解析

—咬筋萎縮に起因する咀嚼機能障害に対する新規治療法の開発—

奥 村 敏

鶴見大学歯学部生理学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

8020 運動の解析結果から、咀嚼機能を維持してきた高齢者は、生活習慣病や心疾患の合併が少ないことが報告されている。一方心疾患は死亡原因の第2位であり、高齢化社会を迎えて年々患者数は増加傾向にある。心不全治療の世界指針は交感神経の遮断であることから、交感神経の過剰刺激状態は心疾患の病態を悪化させる。以上の事実は「交感神経の過剰刺激状態が心筋ならびに咬筋に及ぼす効果を分子レベルで解明することの重要性」を示唆している。我々は咬筋ならびに心筋のリモデリング形成過程における交感神経の役割を、慢性カテコラミン刺激ならびに開口負荷動物モデルを作成して薬理的、生化学・分子生物学、生理学、組織学的手法を用いて解明し、得られた研究成果について臨床応用の可能性を探索した。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

1) 咬筋萎縮動物モデルを用いた検討

高齢化社会を迎え咬筋の廃用性萎縮に起因する咀嚼機能障害、いわゆるサルコペニアによる摂食嚥下障害 (Sarcopenic dysphagia) が増加している。また健康な咀嚼機能を維持することは、健康寿命の延伸にきわめて重要である。選択的 β_2 アドレナリン受容体 (β_2 -AR) 作動薬であるクレンブテロール (CB) は、咬筋に比較的特異的な肥大作用を有することが報告されている。そこで我々は「CBは、咬筋萎縮に起因する咀嚼機能障害の新しい治療方法になる」という仮説をたて、8週令雄ラットを用いて1) コントロール 2) CB群 3) デキサメサゾン投与群 (DEX群) 4) CBとDEX併用投与群 (CB+DEX群) を作成。その結果、CB群では、咬筋重量の増加、DEX群では、咬筋重量の低下がみられた。興味深い結果とし

てCB+DEX群では、DEXによる咬筋萎縮が抑制され、そのメカニズムとして、DEXによる咬筋萎縮機序 (Akt/mTOR 経路ならびにインスリン増殖因子 (IGF) に対する抑制) に対してCBは抑制的に作用することが示唆された (図1)。

2) Epac1 欠損マウスを用いた検討

咬筋萎縮モデルの解析結果より、CBはAkt/mTOR経路の活性化により咬筋の萎縮に対して抑制効果を示すことが明らかになった。以上の分子レベルをさらに詳細に解明するため、新規cAMP活性化因子Epac (exchange protein activated by cAMP) に着目し、その欠損マウス (Epac1KO) を用いてCBによる咀嚼機能改善効果におけるEpac1の役割について検討した。その結果、野生型マウスではCB (2 mg/kg/day) を3週間投与により、CB非投与群に比較して、咬筋重量の有意な増加が見られたが、Epac1KOではその効果が消失し、そのメカニズムとして、Akt/mTOR経路とCalmodulin kinase II (CaMKII)/histone deacetylase 4 (HDAC4) 経路の活性化がEpac1KOでは抑制されていた。以上の結果は、Akt/mTORとCaMKII/HDAC4の2経路の上流にEpac1が存在し活性を制御していることが示唆された。以上の実験結果よりEpac1がサルコペニアによる摂食嚥下障害の新規治療標的になることを示唆している (図2)。

3) 開口負荷動物モデルを用いた検討

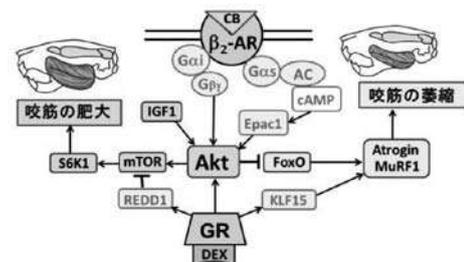


図1 DEXによる咬筋萎縮がCBにより抑制される分子機序

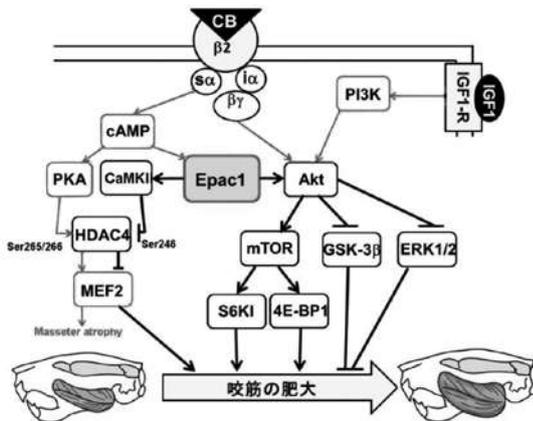


図 2 CB による咬筋肥大における Epac1 の役割

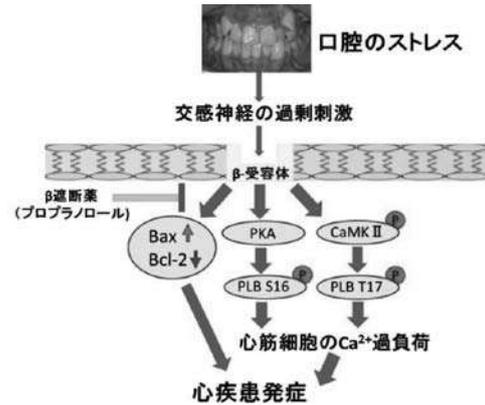


図 3 口腔のストレスと心疾患の関連

口腔内のストレス増加は、交感神経活性を高めて心疾患発症を促すことが示唆されている。最近心不全患者に摂食嚥下機能障害が高率に合併することが注目されている。本研究では「下顎切歯に開口装置を装着して口腔内のストレスを高めた開口負荷 (Bite-opening; BO 群) による口腔のストレス増加は交感神経の慢性刺激状態を引き起こし、心臓リモデリングを誘導する」という仮説を立て、その検証を行った。16 週齢雄性マウスを 1) コントロール群、2) BO 群、3) β アドレナリン受容体遮断薬投与群 (プロプラノロール投与群; Pro 群)、4) BO+Pro 群の 4 群に分けた。2 週間後に心筋を摘出して筋重量測定後、BO 負荷が心臓に及ぼす影響を組織学的ならびに生化学・分子生物学的手法を用いて解析した。以上の研究成果は、開口負荷による口腔内ストレス増加による交感神経の慢性刺激効果は心臓リモデリング (心臓の線維化と心筋細胞のアポトーシス) を誘導し、心疾患発症を促す可能性を示唆している (図 3)。

<今後期待される研究成果>

高い QOL に富んだ健康長寿を確保するためには、硬いものでも食べれる咀嚼機能を維持することは心疾患や認知症の予防に重要であることが報告されている。しかしながら咀嚼機能を改善する有効な薬物治療法の報告はない。本研究成果は咬筋萎縮による咀嚼機能低下 (Sarcopenic dysphagia) に対する β_2 -AR 刺激薬 CB の有効性を示唆している。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Shiozawa, K., Mototani, Y., Suita, K., Ito, A., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Matsuo, I., Hayakawa, Y., Nariyama, M., Umeki, D., Saeki, Y., Ohnuki, Y. and Okumura, S.: Relationship between bite size per

mouthful and dental arch size in healthy subjects. *J. Physiol. Sci.* 2018 (in press).

- 2) Mototani, Y., Okamura, T., Goto, M., Shimizu, Y., Yanobu-Takanashi, R., Ito, A., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Umeki, D., Nariyama, M., Suita, K., Ohnuki, Y., Shiozawa, K., Sahara, Y., Kozasa, T., Saeki, Y. and Okumura, S.: Role of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in β -arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors. *Pflugers Arch.* 470 : 937 ~ 946, 2018.
- 3) Suita, K., Fujita, T., Cai, W., Hidaka, Y., Jin, H., Prajapati, R., Umemura, M., Yokoyama, U., Sato, M., Knollmann, B. C., Okumura, S. and Ishikawa, Y.: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced arrhythmia without adverse effect on heart function in mice. *Pflugers Arch.* 470 : 923 ~ 935, 2018.
- 4) Ohnuki, Y., Umeki, D., Mototani, Y., Shiozawa, K., Ito, A., Kawamura, N., Jin, H., Cai, W., Suita, K., Saeki, Y., Fujita, T., Ishikawa, Y. and Okumura, S.: Role of phosphodiesterase 4 expression in the Epac1 signal-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol. Rep.* 4 : e12791, 2016.
- 5) Umeki, D., Ohnuki, Y., Mototani, Y., Shiozawa, K., Suita, K., Fujita, T., Nakamura, Y., Saeki, Y. and Okumura, S.: Protective effects of clenbuterol against dexamethasone-induced masseter muscle atrophy and myosin heavy chain transition. *PLoS One.* 10 : e0128263, 2015.

<代表図書>

- 1) 奥村 敏監修, 塩澤光一著: スタディー生理学・口腔生理学 第 3 版, 永末書店, 2018.
- 2) 奥村 敏: 第 19 章 動脈圧の長期調節と高血圧症における腎臓の主要な役割: 圧調節のための統括システム, 第 20 章 心拍出量, 静脈還流量とそれらの調節, ガイトン生理学 原著 第 13 版, エルゼビアジャパン社, 2018.

<代表学会発表>

- 1) 大貫芳樹, 梅木大輔, 伊藤愛子, 川村直矢, 八木澤由

- 佳, 早川佳男, 松尾一朗, 石川美佐緒, 吹田憲治, 成山明具美, 奥村 敏: 咬筋における β アドレナリン受容体およびcAMP活性化因子Epacの役割, 第60回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム 若手の口腔生理学研究最前線, 福岡, 2018年9月.
- 2) 奥村 敏: 歯周病ならびに不正咬合が心臓に及ぼす影響, 第28回病態生理学会大会 病態生理教育シンポジウム, 横浜, 2018年8月.
 - 3) 奥村 敏: 基礎生理学講義 今さら聞けない生理学講義 循環器系, 第18回生理学若手サマースクール (日本生理学会主催), 東京, 2018年8月.
 - 4) 吹田憲治, 奥村 敏, 石川義弘: 心臓型アデニル酸シクラーゼを標的にした新しい不整脈薬物療法, 第57回日本生体医工学会 (シンポジウム 医工学と循環治療薬), 札幌, 2018年6月.
 - 5) 梅木大輔, 大貫芳樹, 伊藤愛子, 八木澤由佳, 成山明具美, 川村直矢, 吹田憲治, 中村芳樹, 奥村 敏: マウス咀嚼筋適応機構の解明, 第59回歯科基礎医学会学術大会総会 (アップデートシンポジウム 若手の口腔生理学研究最前線), 松本, 2017年9月.

口腔機能と全身疾患の検討

—現在歯数に着目した高齢者施設での食と栄養指導システムの構築—

野村 義明 村田 貴俊
曾我部 薫 花田 信弘

鶴見大学歯学部探索歯学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

口腔の加齢制御を目指して、食と栄養指導システムの構築から iPS 細胞を用いた口腔機能の再建まで、保健・医療・福祉の 3 分野にわたって、幅広い研究を実施し、高齢者の口腔と全身の健康維持を目指している。本研究プロジェクトでは、細菌学、栄養学、再生医学の基礎研究から臨床研究に至るまでの Translational Research を推進している。研究プロジェクトの前半は現在歯数と食事形態、上下の歯の接触状況と食事形態の関係を明らかにした。後半は健全な口腔細菌叢を樹立する技術を開発し、高齢になっても現在歯数を失わない手法を確立する。さらに本講座で樹立した iPS 細胞を用いて歯根膜の再生医療の実用化を目指した研究を実施し、歯を失わない技術と再生する技術の両面で歯科医療の発展に寄与する予定である。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

本研究プロジェクトでは、関西地方の高齢者施設（有料老人ホーム）に入り、施設に入居する 276 名の要介護度、現在歯数の状況、可撤性有床義歯の状態、食事形態を調査した（男性、 $n = 56$ ；女性、 $n = 220$ ；平均年齢、87.7 歳）。調査結果に基づき要介護度、食事形態、上下の歯の接触部位数の 3 者の関連を解析した。

対象高齢者施設内の要介護度の分布は、要支援 1 が 5.8%，要支援 2 が 5.4%，要介護 1 が 18.0%，要介護 2 が 23.0%，要介護 3 が 16.5%，要介護 4 が 16.9%，要介護 5 が 14.4% の割合であった（図 1）。

対象高齢者施設内に居住する高齢者の現在歯数の状況を図 2 に示す。平均歯数は 9.23 本であった。

対象高齢者施設内に居住する高齢者の食事形態は、普通

対象高齢者施設内の要介護度

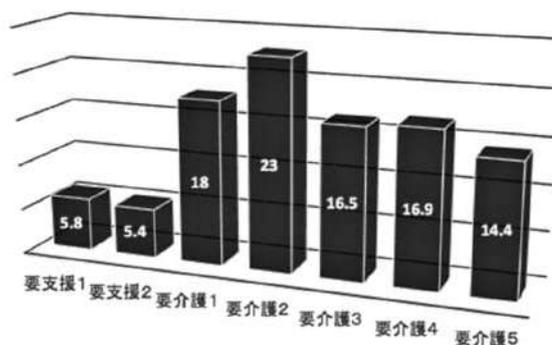


図 1 対象高齢者施設内の要介護度の分布

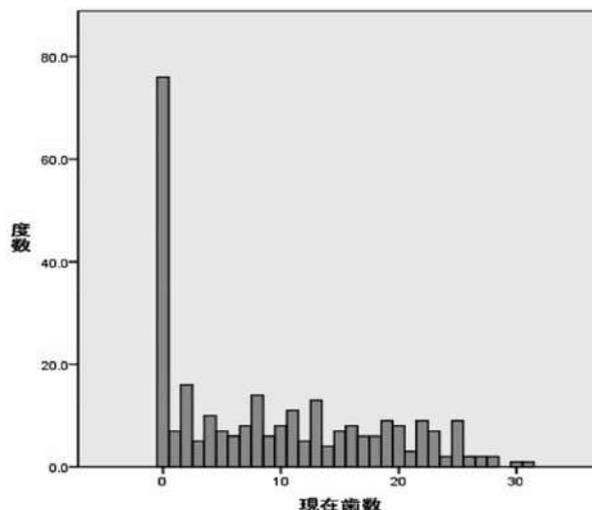


図 2 対象高齢者施設内の高齢者における現在歯数の分布

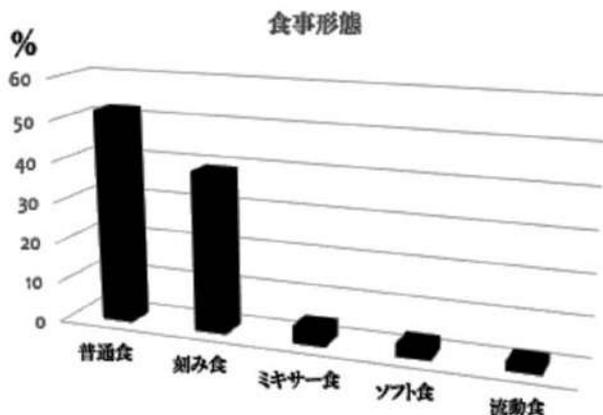


図 3 対象高齢者施設内の高齢者の食事形態の分布

表 1 上下の歯の接触と食事形態について、上下の歯の接触部位数と食事形態に関連。

要介護度と上下の歯の接触状態	オッズ比 (95% CI)	P 値
要支援 1, 2 および要介護 1, 2		
上下天然歯の接触数	1.16 (0.85-1.77)	0.341
上下の天然歯と義歯の接触数	1.06 (0.84-1.33)	0.581
上下の義歯の接触数	1.13 (0.87-1.20)	0.722
要介護 3-5		
上下天然歯の接触数	1.43 (1.13-2.25)	0.004
上下の天然歯と義歯の接触数	1.42 (1.11-1.95)	0.004
上下の義歯の接触数	1.26 (1.10-1.55)	0.003

食が 52%，刻み食が 39%，ミキサー食が 4%，ソフト食が 3%，流動食が 2%であった (図 3)。

現在歯数に着目した高齢者施設での食と栄養指導を確立する目的で、対象高齢者施設内に居住する高齢者の要介護度、食事形態、上下の歯の接触部位数の 3 者の関連を解析した。その結果、要介護 3, 4, 5 の高齢者は、上下の歯の接触部位数と食事形態に関連が見られた (表 1)。また、

現在歯数、有床義歯の有無と食事形態の関係について解析したところ、現在歯数、上下の歯の接触状況、有床義歯の有無が高齢者の食事形態と関連していた。

以上のことから、現在歯数、上下の歯の接触状況、有床義歯の有無に着目した高齢者施設での食事管理が必要であることが明らかになった。また、要介護 3, 4, 5 の高齢者に対して、上下の歯の接触部位数を増加させる歯科治療が必要であることが推測された。この研究成果は国際誌に投稿中である。

<今後期待される研究成果>

人生の最期まで口から普通食を摂ることは人類に共通する夢である。本研究プロジェクトのこれまでの研究成果で、上下の歯の接触部位数を確保することが要介護高齢者の普通食の食事形態の維持のために重要であることが明らかになった。今後は、健全な口腔細菌叢を樹立する技術や iPS 細胞からの歯根膜細胞の再生技術を確立して、上下の歯の接触部位数の確保を目指す。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Suma, S., Naito, M., Wakai, K., Naito, T., Kojima, M., Umemura, O., Yokota, M., Hanada, N. and Kawamura, T.: Tooth loss and pneumonia mortality: A cohort study of Japanese dentists. PLoS One. 13 : e0195813, 2018.
- 2) 花田信弘: 歯周病と生活習慣病, アニムス (Animus), 23 : 29 ~ 32, 2018.

<代表図書>

- 1) 花田信弘, 萩原芳幸, 北川 昇 監修: 臨床歯科栄養学, 口腔保健協会, 東京, pp1 ~ 148, 2018.
- 2) 花田信弘 監修: 歯科発アクティブライフプロモーション 21—健康増進からフレイル予防まで, デンタルダイヤモンド社, 東京, pp 1 ~ 200, 2017.

<代表学会発表>

- 1) 曾我部薫, 野村 義明, 村田貴俊, 花田信弘: 現在歯数に着目した高齢者施設での食と栄養指導システムの構築, 日本口腔衛生学会, 山形市, 2017年5月.

硬組織疾患関連遺伝子の解析と臨床応用

—骨格筋における小眼球症関連転写調節因子 MITF の生理機能の解明—

成山明具美 朝田芳信

鶴見大学歯学部小児歯科学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

加齢に伴う筋力低下を防ぐことは、高齢者の QOL の向上のために必要不可欠である。MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 構造を持つ小眼球症関連転写調節因子である。MITF は、心肥大の発症過程に重要であることが報告されている。一方、MITF は骨格筋でも発現していることが報告されているが、その生理的役割には不明な点が多い。

本研究では、 β -AR の慢性刺激により誘発される骨格筋肥大に対する MITF の役割を明らかにするために、*mitf* 遺伝子に突然変異をもつ小眼球症マウス (*mi/mi*) を用い、クレンブテロール (CB) [β 2-AR (骨格筋の主要なサブタイプ) アゴニスト] 投与による骨格筋肥大に対する MITF の役割を分子レベルで解析する。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

12 週齢雄の *mi/mi* および野生型 (WT) マウスをそれぞれコントロール群と CB 群にわけて、コントロール群には PBS を、CB 群には CB を 3 週間腹腔内投与した。それぞれのマウスから咬筋 (速筋)、前脛骨筋 (速筋)、ヒラメ筋 (遅筋)、心筋を採取し、各群のマウスの体重、筋重量、脛骨長に対する筋重量の比 (筋重量 / 脛骨長)、各筋の筋線維横断面積、および線維化の割合について測定した。

WT マウスでは、CB 投与により、咬筋、前脛骨筋、心筋の筋重量 / TL が有意に増加 ($p < 0.05$) したのに対し、*mi/mi* マウスでは、有意な増加はみとめられなかった (図 1A, B, D)。

筋線維横断面積は、WT では CB 投与により咬筋 ($p < 0.01$)、前脛骨筋 ($p < 0.05$) では肥大効果が確認されたが、

mi/mi では有意な増加は確認されなかった (図 2A, B)。一方、ヒラメ筋に対する CB の筋肥大効果は WT, *mi/mi* ともにみとめられなかった (図 1C, 図 2C)。

また、*mi/mi* の咬筋および心筋では CB 投与に関係なく有意な線維化がみとめられた。

以上の結果より、MITF は心筋同様に、速筋型骨格筋においても β -AR を介した筋肥大に重要な役割を果たすことが示唆された。

<今後期待される研究成果>

mi/mi マウスを用いて咀嚼筋の生後発達における MITF の生理機能を解明することにより、骨格筋の発育

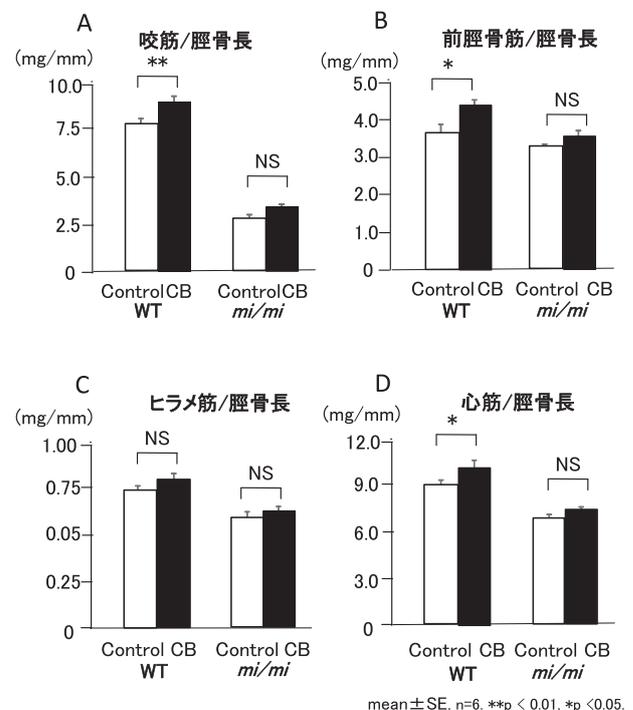


図 1 脛骨長に対する筋重量の比

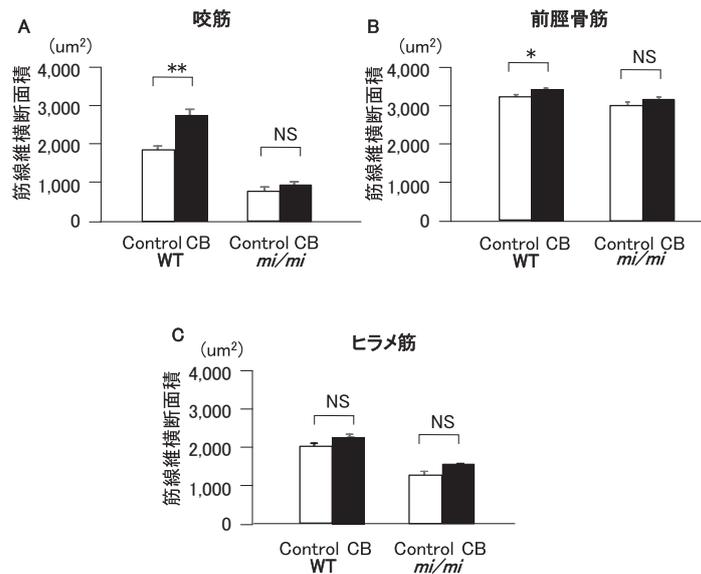


図 2 咬筋, 前脛骨筋, ヒラメ筋における筋線維横断面積

不全に対する原因や筋に関連する病態解明のための基礎的データを得ることができる。咀嚼筋の形態に影響を及ぼす因子, MITF のターゲットと考えられる因子や骨格筋の成長や萎縮に関連するシグナル分子, 転写因子を解析し, 骨格筋の肥大, 萎縮, 生後発達における MITF の生理機能を明らかにすることにより, 骨格筋の肥大, 萎縮のメカニズム, および筋に関連する病態の解明の一助となるデータが得られることが期待される。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Nariyama, M., Mori, M., Shimazaki, E., Ando, H., Ohnuki, Y., Abo, T., Yamane, A. and Asada, Y.: Functions of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles. *Mol. Cell. Biochem.* 407 : 17 ~ 27, 2015.
 - 2) Chikenji, A., Ando, H., Nariyama, M., Suga, T., Iida, R. and Gomi, K.: MyoD is regulated by the miR-29a-Tet1 pathway in C2C12 myoblast cells. *J. Oral Sci.* 58 : 219 ~ 229, 2016.
- <代表学会発表>
- 1) 成山明具美, 大貫芳樹, 奥村 敏, 朝田芳信: 咬筋における小眼球症関連転写調節因子 (MITF) の生理機能について, 第 55 回日本小児歯科学会, 北九州市, 2017 年 5 月.
 - 2) Nariyama, M., Ohnuki, Y., Umeki, D., Ito, A., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Okumura, S. and Asada, Y.: Role of Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by β 2-adrenoceptor Stimulation, 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会, 札幌市, 2016 年 8 月.
 - 3) Nariyama, M., Ohnuki, Y., Umeki, D., Ito, A., Kawamura, N., Okumura, S. and Asada, Y.: Role of Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by β 2-adrenoceptor Stimulation, 第 10 回アジア小児歯科学会, 東京都文京区, 2016 年 5 月.
 - 4) 成山明具美, 島崎絵美, 安藤 準, 大貫芳樹, 奥村敏, 朝田芳信: 咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1, miR-133a の機能, 第 57 回歯科基礎医学学会学術大会, 新潟県新潟市, 2015 年 9 月.

形態学的診断への応用

—咀嚼機能の維持が加齢制御に及ぼす影響について—

小川 匠 重本 修 伺

鶴見大学歯学部クラウンブリッジ補綴学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

口から食物を摂取し、自分の歯や義歯などの補綴装置によって十分咀嚼し、適切に嚥下することができることが、高齢者の QOL や健康を維持、すなわち、健康余命を獲得する上で重要な要件であることの医学的根拠は、現在十分に示されている。しかし、現実には咀嚼が十分にできない、あるいは嚥下に困難が伴うなどの理由により経口の食事が適切に行われない高齢者は少なくない。そこで、摂食・咀嚼・嚥下機能を咀嚼能力だけでなく、咀嚼関連器官の働きを記録解析できるシステムの開発とその臨床応用から加齢制御の要因について明らかにする。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究進捗状況>

平成 27 年度以降、年度毎に主たる研究テーマを設定し、咀嚼機能の維持が加齢制御に及ぼす影響について検討するための摂食・咀嚼・嚥下機能記録解析システムの開発 (図 1) を行っている (論文 1, 2, 学会発表 1, その他 1)。平成 27～29 年度の研究計画に対して達成度は 70～80% である。

各年度の研究テーマは以下のとおりである。

平成 27 年度：咀嚼運動計測器 (試作機) の仕様と製作

平成 28 年度：咀嚼能力評価の定量的解析法の確立

平成 29 年度：咀嚼運動情報と歯列・顎顔面形態情報の統合と総合システムの検証

平成 30 年度：咀嚼機能評価と加齢制御に対する臨床的評価 (大規模データの収集)

平成 31 年度：総合的な咀嚼機能評価と加齢制御因子との関連性の検討 (大規模データの統計的解析による因子抽出と因果関係の解析)

<研究成果>

平成 27 年度：咀嚼運動計測器 (試作器) は、磁気ベクトル空間方式を採用し上下に小型 3 軸コイルを装着するだけで測定が可能であり、咀嚼運動計測器としては最適である。測定精度は、相対誤差 0.3% で 1 mm 移動時の最大誤差が 0.003 mm と高精度測定が実現できている (学会発表 2)。平成 27 年度以降も大学附属病院補綴科を受診する患者の顎機能評価に顎運動データを活用するため顎運動測定を実施し、治療計画の立案や治療顎位の評価など臨床応用を行っている (学会発表 3)。

平成 28 年度：咀嚼能力評価の定量的解析法については、GPS クロックを購入し時刻コード (IRIG-B) を用いて顎運動データと筋電図データの同期測定法を検討した。システム化には至っていないがデータ処理方法 (デコード処理) については完成した。

平成 29 年度：顎運動情報と CT やスキャナーから得られる歯列および顎顔面形態情報を精度良く統合する新しい方法を考案し、システム化に必須の顎運動測定技術 (顎運

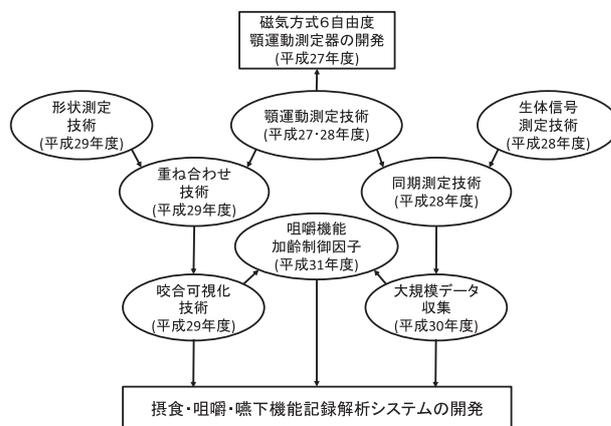


図 1 摂食・咀嚼・嚥下機能記録解析システムの開発と関連する研究

動測定器)と形態計測技術およびこれらの情報の重ね合わせ技術については完成できた(論文3,学会発表4)。顎運動座標系にスキャナーとCTの座標系を合わせることで仮想空間上に患者の形態と機能を再現している。この研究成果を診断や患者説明など実際の日常臨床に活用している。順調に成果を上げることができたため、平成30年度の研究内容を一部前倒しし、一般食品を用いた咀嚼能率解析に関して食塊粒度解析法を用いて咀嚼能率の測定を行い、咀嚼能率の基礎データとその解析手法について検討した(学会発表5)。また、咀嚼による補綴装置や残存歯への影響を検討するため、暫間修復や補綴装置に用いる材料との二体摩耗試験を行い、その摩耗特性を明らかとした(学会発表6)。

平成28年度の主な研究課題である咀嚼能力評価の定量的解析法については、顎運動、筋電図などの各種生体情報の同期記録・解析システムの構築には至っていないが、複数の異なる測定器で記録される情報を同一時間軸で解析するためにGPSクロックからの時刻コード(IRIG-B)を基準クロックとする方法を考案し、その解析法については完成しているため記録する生体情報記録装置(筋電図、咬合力計など)が設置できればシステム化の実現は問題ないと考えている。

<今後期待される研究成果>

顎運動測定器の開発研究は、専門業者(株式会社松風)と共同で実施しており、試作機の性能評価がほぼ終了している。現在は、専門業者が実用化に向けて医用機器の事前EMC試験を受け概ね良好な結果を受けEMC試験に向けた対策を施した商用器の試作を開始しているため早期の実用化が期待できる。

また、顎運動情報を歯列や頭蓋骨などの形態情報と座標系をあわせることで患者個々の顎口腔系の形態と機能を再現できるバーチャル咬合器が実現できる。顎運動情報と形態情報の統合技術は、咀嚼の機能評価だけでなく歯科用CAD/CAMシステムへの応用が期待できる(その他1,2,3)。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Shigeta, Y., Ogawa, T., Nakamura, Y., Ando, E., Hirabayashi, R. and Ikawa, T.: Structural equation modeling for alteration of occlusal plane inclination. J. Prosthodont. Res. 59 : 185 ~ 193, 2015.
 - 2) 重本修伺:咬合・顎運動研究から Digital dentistry へ, 鶴見歯学, 42 : 21 ~ 29, 2016.
 - 3) Katsumura, S., Sato, K., Ikawa, T., Yamamura, K., Ando, E., Shigeta, Y. and Ogawa, T.: High-precision, reconstructed 3D model" of skull scanned by conebeam CT: Reproducibility verified using CAD/CAM data. Legal Medicin. 18 : 37 ~ 43, 2016.
- <代表学会発表>
- 1) 福永温句, 重本修伺, 大本勝弘, 田島登誉子, 宮本裕司, 皆木省吾, 松香芳三:咀嚼能力の総合的な解析に向けた生体信号と食塊粒度の同期記録法の検討, 日本補綴歯科学会125回学術大会, 石川, 2016年7月.
 - 2) 重本修伺, 伊藤崇弘, 伊藤光彦, 木原琢也, 井川知子, 平林里大, 重田優子, 森山 毅, 坂東永一, 松香芳三, 小川 匠:顎口腔機能情報を活用する次世代歯科用CAD/CAMシステムの構築—顎運動測定器の開発と応用—, 日本顎口腔機能学会第60回学術大会, 横浜, 2018年4月.
 - 3) 伊藤崇弘, 重本修伺, 井川知子, 伊藤光彦, 小川 匠, 松香芳三:下顎運動情報を用いた運動論的基準軸の空間的特徴の検討, 日本顎口腔機能学会第57回学術大会, 宮城, 2016年10月.
 - 4) 伊藤崇弘, 重本修伺, 平井真也, 平林里大, 井川知子, 重田優子, 小川 匠:術前および術中の顎運動情報による顎機能評価を行っているオーラルリハビリテーション症例, 第30回日本顎関節学会学術大会, 横浜, 2017年7月.
 - 5) 木原琢也, 井川知子, 重本修伺, 重田優子, 伊藤光彦, 伊藤崇弘, 二川浩樹, 小川 匠:食塊粒度解析による咀嚼能力の定量的評価, 一般社団法人日本歯科人間ドック学会第20回学術大会, 横浜, 2017年12月.
 - 6) 木原琢也, 井川知子, 伊原啓祐, 佐々木圭太, 平井健太郎, 伊藤光彦, 伊藤崇弘, 重本修伺, 重田優子, 小川 匠:易摩耗性スプリントにおける耐摩耗性の検討—暫間修復用レジンとの比較—, 日本デジタル歯科学会第9回学術大会, 盛岡, 2018年4月.
- <その他の研究成果>
- 1) 小川 匠, 井川知子:次世代CAD/CAMシステムの構築に向けて—咬合の可視化から咬合設計— 第1回診査・診断, 咬合治療から補綴治療へ, デンタルエコー, 188 : 2 ~ 11, 2017.
 - 2) 小川 匠, 重本修伺:次世代CAD/CAMシステムの構築に向けて—咬合の可視化から咬合設計— 第2回デジタル技術を用いた咬合治療, デンタルエコー, 189 : 12 ~ 27, 2017.
 - 3) 小川 匠, 木原琢也:次世代CAD/CAMシステムの構築に向けて—咬合の可視化から咬合設計— 第3回CAD/CAM技術による補綴装置の製作, デンタルエコー, 190 : 46 ~ 59, 2017.

疾患の非侵襲的対処法

—疾患の形態・機能改善が生体に及ぼす影響の解析—

濱田良樹 山田浩之 中岡一敏
園山智生 熊谷賢一 重松宏昭

鶴見大学歯学部口腔顎顔面外科学講座

1. 研究プロジェクトの目的・意義

高齢者の口腔機能低下軽減のための臨床技術開発を遂行するにあたり、口腔機能や精神的変化を適切に評価することは必須である。「顎骨再建術が生活の質に与える影響に関する検討」、「顎矯正手術患者に対する評価法の確立」の臨床研究を通して、口腔顎顔面の機能と形態改善が生活の質や精神状態に及ぼす影響について検討するとともに、その評価項目の確立を目指す。また、「口腔粘膜疾患に対する栄養機能食品の有用性に関する研究」から、高齢者に見られる口腔粘膜機能低下に対する栄養機能食品の可能性について模索する。

2. 研究進捗状況と研究成果

＜進捗状況＞

「顎骨再建術が生活の質に与える影響に関する検討」を通して、顎骨再建を施行した患者の満足度が高いことが確認され、論文等にて報告した。現在も、各種データを蓄積中であり、精神状態やQOLに及ぼす影響を検討している。また「顎矯正手術患者に対する評価法の確立」においては、口腔顎顔面機能と形態改善が精神状態に及ぼす影響について調べた結果、いくつかの評価項目の有用性が示唆され、学会報告を行った。

＜研究成果＞

高齢者の口腔機能低下に対する治療を想定し、顎骨再建患者や顎変形症患者の治療を通して口腔機能や精神的変化を適切に評価する方法について検討を進めてきた。その結果、治療による患者の口腔機能改善や精神的改善が確認され、いくつかの評価項目の有用性が示唆された。一方、高齢者の口腔粘膜機能低下を想定した口腔粘膜疾患に対する栄養機能食品の有用性については明らかにはできなかった。

＜問題点とその克服方法＞

臨床研究のため、臨床データの蓄積に労力と時間がかかり研究遂行が遅れている。本年度の臨床研究も含め、同時進行でデータ蓄積を継続していくが、今後もデータ採取に欠落が出ないように、十分に注意を払い研究を遂行する。

口腔機能や精神的変化の適切な評価方法については、さらなる臨床データの蓄積により評価方法がある程度確立することが可能と思われる。また栄養機能食品による口腔粘膜機能改善には、食品の改善により効果が期待できると考えている。

＜今後期待される研究成果＞

顎骨再建患者、顎変形症患者を対象とした臨床研究については、今後も継続して各種データの採取と蓄積を継続し検討を加えることで、口腔顎顔面機能と形態改善が精神状態に及ぼす影響について調べていく。また、口腔粘膜疾患に対する栄養機能食品の有用性については、食品サンプルの濃度調整などを行い、引き続き口腔粘膜疾患に対し投与し、臨床所見や血液、唾液によるデータ解析を進めて行く予定である。

口腔顎顔面機能と形態改善が、生活の質や精神状態に及ぼす影響について調べていくことで、具体的な評価項目、検査項目が明白となると考えられる。

また、口腔粘膜疾患に対する栄養機能食品の効果が明らかになれば、高齢者口腔機能低下の軽減につながる臨床技術開発につながる可能性がある。

3. 研究発表の状況

＜代表論文＞

- 1) Yamada, H., Nakaoka, K., Sonoyama, T., Kumagai, K., Ikawa, T., Shigeta, Y., Harada, N., Kawamura, N., Ogawa, T. and Hamada, Y.: Clinical Usefulness of Mandibular Reconstruction Using Custom-Made

Titanium Mesh Tray and Autogenous Particulate Cancellous Bone and Marrow Harvested from Tibia and/or Iliac. *J. Craniofac. Surg.* 27 : 586 ~ 592, 2016.

- 2) 井川知子, 重田優子, 平井真也, 小川 匠, 中岡一敏, 濱田良樹, 原田 直彦, 河村 昇: チーム医療による顎骨欠損症例の顎骨再建と咬合再建, *鶴見歯学*, 43 : 40 ~ 48, 2017.
- 3) 熊谷賢一, 山田浩之, 長谷部充彦, 佐藤光一郎, 馬杉亮彦, 園山智生, 濱田良樹: 自家腸骨海綿骨細片移植による即時顎堤再建後にインプラント治療を施行した歯原性線維腫の1例, *日本口腔診断学会雑誌*, 28 : 221 ~ 225, 2015.

<代表学会発表>

- 1) 重松宏昭, 中岡一敏, 園山智生, 君塚幸子, 小笠原邦茂, 山田秀典, 秋谷勇介, 仲宗根康成, 山田浩之, 濱田良樹: 顎矯正手術が及ぼす精神的影響に関する客観的評価の試み, 第27回日本顎変形症学会総会・学術大会, 東京, 2017年6月.
- 2) 雨宮剛志, 山田秀典, 重松宏昭, 長谷部充彦, 吉澤泰昌, 中岡一敏: 腺性歯原性嚢胞術後の骨欠損に対しインプラント治療を行った1症例, *日本口腔インプラント学会第37回関東・甲信越支部学術大会*, 横浜, 2018年2月.
- 3) 井川知子, 重田優子, 平井真也, 小川 匠, 中岡一敏, 濱田良樹, 原田直彦, 河村 昇: チーム医療による顎骨欠損症例の顎骨再建と咬合再建 *鶴見歯学*, 横浜, 2017年1月.
- 4) Nakaoka, K., Yamada, H., Ogasawara, K., Saida, N., Kawaguchi, K., Ikawa, T., Ogawa, T. and Hamada, Y.: Dental implant treatment for the reconstructed mandible using a custom-made titanium mesh tray and PCBM: 4-Case Report, *AAMOS 98th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, Las Vegas, September 2016.*
- 5) 八木正聡, 中岡一敏, 重松宏昭, 斎田尚貴, 濱田良樹: 11歳女兒に発生した下顎骨骨形成線維腫に対して区域切除と即時再建を施行した長期経過観察例, 第28回日本小児口腔外科学会 総会・学術大会, 広島, 2016年10月.

歯科心身症の解析

豊 福 明

東京医科歯科大学大学院歯科心身医学分野

1. 研究プロジェクトの目的・意義

加齢に伴う口腔機能の障害には、咀嚼などの運動機能のみならず、味覚や触覚あるいは痛覚など感覚異常の問題も大きい。中高年以降に多発する原因不明の口腔領域の慢性疼痛や不快感は「歯科心身症」と呼ばれるが、その病態や治療法が未確立なままで、いまだに多くの患者が生活の質を落としている。

本研究プロジェクトでは、加齢制御に関連した歯科心身症の集学的研究拠点の形成を目指して、①口腔セネストパチーの疫学的研究、②病態や治療経過を反映する簡易な生物学的指標の探索、③歯科心身症の脳機能画像研究、④歯科心身症の脳形態の経時的変化の観察、⑤歯科心身症の動物実験モデルの構築、などを計画した。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

①口腔異常感症（口腔セネストパチー）の疫学的研究

我が国の超高齢化社会の到来を反映して、当科を受診する歯科心身症患者は年々高齢化の一途をたどっている（図1）。特に舌痛症や口腔異常感症において高齢化が著しい（学会発表1）。

高齢者の「口の中がネバネバ、ベタベタする」などの口腔内の乾燥感や異物感には、相応する器質的異常が見出せずに、どこまでが加齢によるものか、他科領域の疾患や常用薬剤の影響なのか、それとも他の要因なのかの判断や対応に苦慮することがしばしば経験される。

特に痛みを伴わない口腔異常感症（口腔セネストパチー）患者は、やや奇異な訴えに反して精神科を受診することは稀で、ほとんどが歯科を受診してくる。本症の疫学的データは皆無で、疾患の特性や実態、あるいは病態の本質などは不明な点が多いままである。

我々は、2010年から2015年までの当科初診患者の中から本症患者606例の臨床データを抽出し、その臨床病像、

精神科疾患の合併率、経過、転帰などを検討した（論文1）。特に、うつ病の精神症状が悪い時期に歯科治療が行なわれると口腔異常感症の発症リスクが高まるという新知見には歯科医療従事者に広く注意喚起が必要と思われる。

②病態や治療経過を反映する簡易な生物学的指標の探索

ドライマウスは高齢者の口腔症状として比較的多く、その中で舌の灼熱痛を伴うものも少なくない。一方で舌痛症の63%で口腔乾燥感の訴えがあると報告されている。さらに舌痛症で頻用される抗うつ薬は副作用として唾液分泌を阻害し、病態に修飾をかける。このようなドライマウス・舌痛・薬剤の副作用の関連を明らかにするために、抗うつ薬で治療を受ける舌痛症患者の唾液分泌量と口腔乾燥感そして痛みの変化を初診時、1か月後、3か月後、6か月後と経時的に測定した。その結果、抗うつ薬による治療過程において、舌痛症患者の口腔乾燥感や唾液分泌量に有意な変化は認められず、薬剤性の因子だけでは患者の口腔乾燥感を説明できないことが明らかとなった（学会発表2）。

また本研究の過程で、投与初期の唾液分泌量の増減で抗うつ薬の反応性を予測されることが示唆された（論文2）。

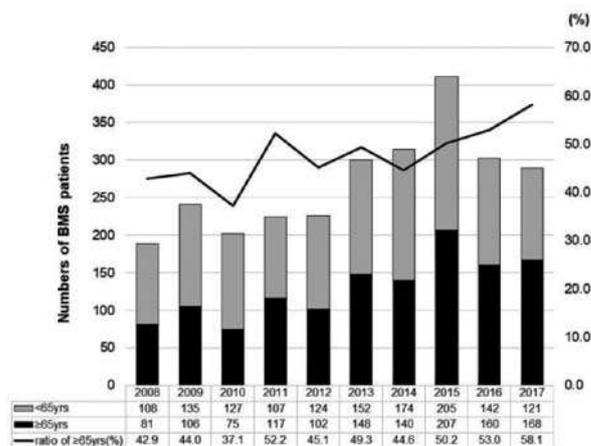


図1 舌痛症患者の高齢者率の年次別推移
当科初診の舌痛症の高齢者率は増加傾向にある。

さらに処方前後の心電図の変化を比較し、低用量の三環系抗うつ薬では、致死性の不整脈を起こすようなQT間隔の延長は起きないこと、むしろ安全な程度のQT間隔の延長がある患者では症状の改善が見られる傾向があることを明らかにした(論文3)。

このような高齢者に優しく(低侵襲で)、かつ客観性の担保を両立する薬物療法の新しい予後予測因子として、唾液分泌量や心電図などの生物学的指標が副次的に示唆された。

③ 歯科心身症の脳機能画像研究

ドライマウスや唾液分泌の異常感などを主訴とする口腔異常感症(口腔セネストパチー)は主に中高年に多発し、若年者にはごく稀なことから何らかの加齢的变化が本症の病態に関与していることが伺われる。

我々は脳機能画像検査である脳血流SPECTを行い、本症患者特有の脳血流パターンが認められることを報告した(論文4)。これらの結果を踏まえて、治療前後の脳血流パターン変化(論文5)や舌痛症との類似点や相違点を検討した。舌痛症では脳画像の個人差が大きく、両群比較ではまだ満足な解析結果は得られていないが、治療前後の脳画像データの蓄積を続けている(図2)。

④ 歯科心身症の脳形態の経時的変化の観察

歯の咬み合わせの異常感を訴えるphantom bite syndromeは、歯科で最も対応に苦慮する病態の一つである。我々は臨床的研究から、本症の精神科的併存症や薬剤反応性を明らかにしてきた。これらの知見をもとに脳機能画像研究を進め、本症特有の脳機能回路の解明に取り組んでいる(学会発表3)。

その過程で、本症患者の病悩期間の違いによる難治度の変化が示唆された(未発表)。長期の罹患者の難治性には、機能不全の持続による脳の構造的変化が推測される。そこで脳機能画像に加え、頭部MRI画像を拡散テンソル画像法などの手法を用いて脳形態の経時的変化を追い、難治化の要因を明らかにしていく基盤作りを進めている。

⑤ 歯科心身症の動物実験モデルの構築

口腔内に訴えに相応する所見が認められないと安易に「心身症」などと即断されがちである。しかし、我々は、三叉神経領域にまだまだ未解明の異所性疼痛の発症機序があることも動物実験で明らかにしてきた。

歯科心身症には歯科処置後に発症する慢性疼痛が多いことから、舌に機械・熱痛覚過敏を発症する舌神経損傷ラットを用い、三叉神経節における神経細胞体と衛星細胞の機能変化、および両者の機能連関を検討した。その結果、三叉神経節におけるCGRP(calcitonin gene related peptide)陽性神経細胞の増加と表現型変化、放出されたCGRPによるERK(phosphorylated extracellular signal

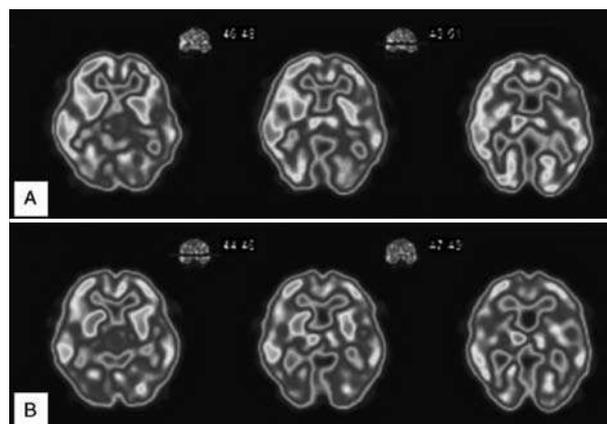


図2 口腔異常感症(セネストパチー)の治療前後のSPECT(論文5より引用)

治療前(A)で見られた前頭葉や側頭葉の血流の左右差が治療後(B)では改善している。

regulated kinase) のリン酸化を介した衛星細胞の活性化による三叉神経節内の神経細胞-衛星細胞機能連関の亢進が、舌神経損傷による舌痛を増悪する可能性が示された(学会発表4, 論文6)。

<今後期待される研究成果>

加齢による三叉神経領域の機能変化については未解明な点が多い。現在、口腔領域の慢性疼痛の病態解明や口腔セネストパチーとPhantom bite syndromeの脳機能画像上の検討が進みつつある。臨床と基礎研究の両面から痛みや咬み合わせといった歯科特有の感覚異常を中枢から見つめ直すことで、中枢から見た新しい歯科医学体系の構築に寄与することが期待され、ひいては加齢制御によるそれらの克服に貢献すると期待される。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Umezaki, Y., Miura, A., Shinohara, Y., Mikuzuki, L., Sugawara, S., Kawasaki, K., Tu, T.T., Watanabe, T., Suga, T., Watanabe, M., Takenoshita, M., Yoshikawa, T., Uezato, A., Nishikawa, T., Hoshiko, K., Naito, T., Motomura, H. and Toyofuku, A.: Clinical characteristics and course of oral somatic delusions: a retrospective chart review of 606 cases in 5 years. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 14 : 2057 ~ 2065, 2018.
- 2) Kawasaki, K., Nagamine, T., Watanabe, T., Suga, T., Tu, T.T.H., Sugawara, S., Mikuzuki, L., Miura, A., Shinohara, Y., Yoshikawa, T., Takenoshita, M. and Toyofuku, A.: An increase in salivary flow with amitriptyline may indicate treatment resistance in burning mouth syndrome. *Asia Pac. Psychiatry*. 2018. Article DOI: 10.1111/appy.12315
- 3) Watanabe, T., Nagamine, T., Mikuzuki, L., Aota, Y.,

- Suga, T., Tu, T.T.H., Takenoshita, M. and Toyofuku, A.: An increase in corrected QT interval may indicate a good clinical response to amitriptyline in female patients with burning mouth syndrome. *Neurology and Neurobiology*. 1 : 1 ~ 3, 2018.
- 4) Watanabe, M., Umezaki, Y., Miura, A., Shinohara, Y., Yoshikawa, T., Sakuma, T., Shitano, C., Katagiri, A., Takenoshita, M., Torihara, A., Uezato, A., Nishikawa, T., Motomura, H. and Toyofuku, A.: Comparison of cerebral blood flow in oral somatic delusion in patients with and without a history of depression: a comparative case series. *BMC Psychiatry*. 15 : 42, 2015.
 - 5) Umezaki, Y., Uezato, A., Torihara, A., Nishikawa, T. and Toyofuku, A.: Two Cases of Oral Somatic Delusions Ameliorated With Brain Perfusion Asymmetry: A Case Report. *Clin Neuropharmacol*. 40 : 97 ~ 99, 2017.
 - 6) Mikuzuki, L., Saito, H., Katagiri, A., Okada, S., Sugawara, S., Kubo, A., Ohara, K., Lee, J., Toyofuku, A. and Iwata, K.: Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*. 46 : 2190 ~ 2202, 2017.
- <代表図書>
- 1) 豊福 明: ドライマウスと歯科心身症, 齋藤一郎編著, 超高齢社会におけるドライマウスへの対応, ヒョーロンパブリッシャーズ, 東京, 29 ~ 36, 2017.
- <代表学会発表>
- 1) Suga, T., Watanabe, T., Tu, T.T.H., Aota, Y., Kawasaki, K., Sugawara, S., Mikuzuki, L., Shinohara, Y., Takenoshita, M. and Toyofuku, A.: Efficacy and safety of low-dose amitriptyline for elderly patients with Burning mouth syndrome, ACPM 2018, Korea, 25 August 2018.
 - 2) 鈴木スピカ, 渡邊素子, 三浦杏奈, 梅崎陽二郎, 竹之下美穂, 豊福 明: 舌痛症の抗うつ薬治療における口腔乾燥感と唾液分泌量の経時的変化, 第126回日本心身医学会関東地方会, 東邦大学医療センター 大森病院, 東京, 2015年2月21日.
 - 3) 篠原優貴子, 三浦杏奈, 美久月瑠宇, 川崎カオル, 菅原詩織, Tu Thi Hyen Trang, 須賀隆行, 渡邊 毅, 梅崎陽二郎, 渡邊素子, 吉川達也, 竹之下美穂, 豊福明: Phantom bite syndrome の脳画像研究, 第32回日本歯科心身医学会総会・学術大会, 日本歯科大学, 東京, 2017年7月8日.
 - 4) 美久月瑠宇, 菅原詩織, 片桐綾乃, 豊福 明: 舌神経損傷後の痛覚過敏に対する三叉神経節 CGRP 陽性細胞の表現型変化および神経-グリア機能連関の関与, 第32回日本歯科心身医学会総会・学術大会, 日本歯科大学, 東京, 2017年7月8日.

難治性唾液腺傷害の解析

—口腔乾燥症（特にシェーグレン症候群）患者の唾液を用いた新しい診断方法の確立—

中 村 誠 司

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野

1. 研究プロジェクトの目的・意義

近年、口腔乾燥症（ドライマウス）の社会的関心の高まりとともに、的確な診断と治療が求められている。しかし現在のところ、ドライマウスには明確な診断基準がないため、その診断にはシェーグレン症候群（SS）の検査法が用いられている。SSの検査項目には、口唇腺生検や耳下腺造影といった煩雑で侵襲性のものであり、SS以外のドライマウスの診断には、より簡便で非侵襲性の検査方法の確立が望まれる。そこで本研究では第一に、ドライマウス患者（SS、放射線性口腔乾燥症（RD）、薬物性・神経性口腔乾燥症（DDN））の臨床的特徴を把握するために、ドライマウス患者の臨床所見、病悩期間、吐唾法による安静時唾液分泌量（UWS）測定、サクソテストによる刺激時唾液分泌量（SWS）測定、visual analog scale（VAS）法による自覚症状について健常者と比較検討を行った。また、近年の検査技術の進歩によって、唾液を用いた癌やAIDSのスクリーニング検査の有用性が報告されている。そこで第二に、非侵襲的で簡便かつ繰り返し採取可能な唾液を検体とし、その成分解析を行うことでドライマウスの新しい診断方法と病態把握に繋がるかを検討した。

2. 研究進捗状況と研究成果

<研究成果>

SS患者90例、RD患者30例、DDN患者22例、健常者36例を対象とした。まず各患者群間の臨床所見を比較したところ、VAS法による自覚症状の評価では、口腔乾燥感はいずれの患者群とも健常者と比較して有意に高値であったが、眼乾燥感SS患者のみ有意に高値であった。平均唾液分泌量検査では、SS患者はUWSとSWSともに基準値より減少しており、DDN患者ではUWSのみ減少、RD患者ではUWS、SWSともに基準値以上であったが、

健常者と比較するとすべての患者群はUWS、SWSともに有意に減少していた。

われわれは従来、SSの唾液腺における免疫学的研究を行い、免疫担当細胞であるヘルパーT（Th）細胞が産生するサイトカインがSSの発症や病態進展に重要な役割を果たすことを見いだしてきた（図1）。

また近年、ドライマウス患者の血清中にストレス関連物質が検出されることが報告されていることから、これらの可溶性タンパクは唾液にも溶出されることが推察される。そこで、ドライマウスの新しい診断方法の確立のために、唾液中のサイトカインおよびストレス関連物質について検索を行った。唾液中のサイトカインの解析にはサイトメトリックビーズアレイを用いたフローサイトメトリー法を、唾液中ストレス関連物質である分泌型IgA（SIgA）およびクロモグラニンA（CgA）の解析には、酵素標識免疫吸着法（ELISA）を用いた。その結果、SS患者の唾液中のサイトカイン濃度は、Th1、Th2タイプほぼ全てのサイトカインが健常者および他の患者群と比較して有意に高かった。一方、DDN患者ではIL-10が有意に低かった。およびRD患者では、いずれのサイトカインも健常者と比

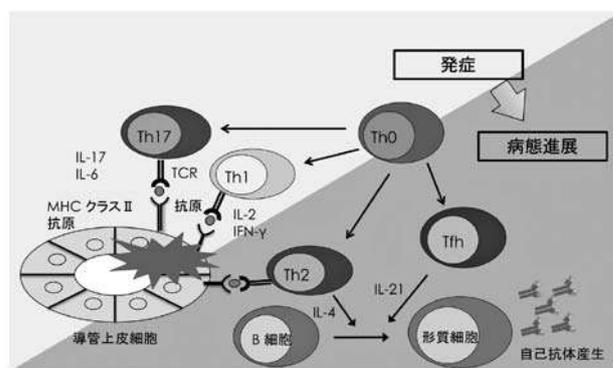


図1 SSの病態モデル（サイトカインネットワーク）

較して有意な差はなかった。次に、SSの病態解析に唾液の検索が有用かを検討するために、SS患者を口唇腺生検組織でのリンパ球浸潤程度(石川・小守の分類)で軽度(±~+)と重度(++~+++)の2群に分類し、唾液中サイトカインの比較を行った。その結果、炎症性・Th1タイプのサイトカインであるIL-1βとIL-12が軽度症例で、Th2タイプのサイトカインであるIL-4とIL-5が重度症例で有意に高値を示した。さらに、唾液中のストレス関連物質(SIgA, CgA)については検索を行うと、いずれの患者群もSIgAは健常者と比較して有意な差がなかったが、CgAはDDN患者で有意に高値を示した。

しかし、炎症性・Th1タイプのサイトカインは炎症性唾液腺疾患(閉塞性唾液腺炎、放射線性唾液腺炎など)でも亢進することが推察されるため、よりSSの病態に特異的な分子を同定し、診断能を向上させる必要がある。近年、代謝産物などの内因性リガンドと病原体センサーであるToll様受容体(TLR)の相互作用が自己免疫疾患の発症に関与していることが示唆されている。そこで本研究では、病態形成に関わる新たなTLR関連分子の同定を目的として、SSの口唇腺を用いた網羅的遺伝子解析を行い、発現変動したTLR関連遺伝子を抽出し、機能解析および口唇腺におけるバリデーションを行った。

機能解析では、SSではT細胞活性化、B細胞活性化、ケモタキシスなどの免疫反応に関連する遺伝子群の発現亢進が認められた。発現亢進を認めたTLR関連分子はTLR1, TLR7, TLR8, TLR9, MyD88, およびIRF7が有意な発現亢進を認めた(図2)。

以上の結果より、SSの病態形成にはTh細胞などの獲得免疫だけではなく、TLRを介した自然免疫も関与していることが推察される。また、臨床所見(VAS法、唾液分泌量)および唾液中の可溶性分子(サイトカイン、CgA, sTLR)の検索は、ドライマウス、特にSSの診断と鑑別に有用であることが示唆された。

<今後期待される研究成果>

本研究により、唾液中サイトカインおよびストレス関連物質を測定することは、ドライマウスの鑑別に有用であり、また、経時的に採取することでSSの病態把握にも利用できる可能性が示唆された。唾液採取は簡便で非侵襲的であり何よりも繰り返し行える検査法であることから、繰り返し行うことが困難な口唇腺生検の代わりとして応用できる。今回使用したCBA system[®]はごく少量の検体で複数の分子を同時にかつ短時間に測定することが可能であるが、測定する分子が商品として決まっているのが欠点であった。しかし、最近開発された改良型のCBA Flex system[®]は、オーダーメイドでビーズに抗体を結合させる

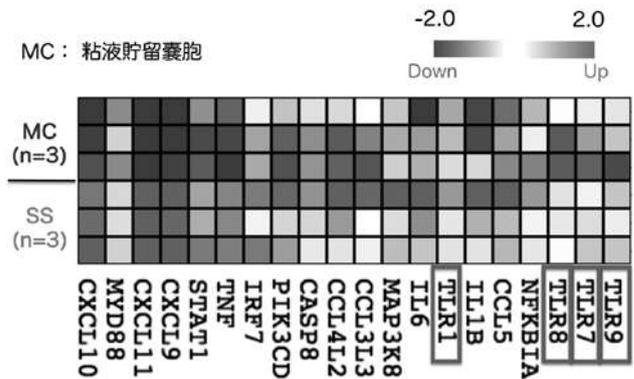


図2 SSと健常者の唾液腺におけるTLR関連分子のヒートマップ(DNAマイクロアレイ)

ことが可能なので、今後は解析方法をフローサイトメトリーに1本化させる予定であり、従来難しかったドライマウスの鑑別および病態把握に繋がることが期待される。

3. 研究発表の状況

<代表論文>

- 1) Furusho, K., Shibata, T., Sato, R., Fukui, R., Motoi, Y., Zhang, Y., Saitoh, S., Ichinohe, T., Moriyama, M., Nakamura, S. and Miyake, K.: Cytidine deaminase enables Toll-like receptor 8 activation by cytidine or its analogs. *Int. Immunol.* 2018. in press.
- 2) Maehara, T., Moriyama, M. and Nakamura, S.: Pathogenesis of IgG4-related disease: a critical review. *Odontology.* 2018. in press.
- 3) Maehara, T., Mattoo, H., Mahajan, V.S., Murphy, S.J.H., Yuen, G.J., Ishiguro, N., Ohta, M., Moriyama, M., Saeki, T., Yamamoto, H., Yamauchi, M., Daccache, J., Kiyoshima, T., Nakamura, S., Stone, J.H. and Pillai, S.: The expansion in lymphoid organs of IL-4⁺ BATF⁺ T follicular helper cells is linked to IgG4 class switching in vivo. *Life Science Alliance.* 2018. in press.
- 4) Sumida, T., Azuma, N., Moriyama, M., Hagiwara, S., Takahashi, H., Asashima, H., Honda, F., Abe, S., Ono, Y., Hirota, T., Hirata, S., Tanaka, Y., Shimizu, T., Nakamura, H., Kawakami, A., Sano, H., Ogawa, Y., Tsubota, K., Ryo, K., Saito, I., Tanaka, A., Nakamura, S., Takamura, E., Tanaka, M., Suzuki, K., Takeuchi, T., Yamakawa, N., Ohta, A., Mimori, T., Nishiyama, S., Yoshihara, T., Suzuki, Y., Kawano, M., Tomiita, M. and Tsuboi, H.: Clinical practice guideline for Sjögren's syndrome 2017. *Mod. Rheumatol.* 28 : 383 ~ 408, 2018.
- 5) Shirakashi, M., Yoshifuji, H., Kodama, Y., Chiba, T., Yamamoto, M., Takahashi, H., Uchida, K., Okazaki, K., Ito, T., Kawa, S., Yamada, K., Kawano, M., Hirata, S., Tanaka, Y., Moriyama, M., Nakamura, S., Kamisawa, T., Matsui, S., Tsuboi, H., Sumida, T., Shibata, M.,

- Goto, H., Sato, Y., Yoshino, T. and Mimori, T.: Factors in glucocorticoid regimens associated with treatment response and relapses of IgG4-related disease: a multicentre study. *Sci. Rep.* 8 : 10262, 2018.
- 6) Furukawa, S., Moriyama, M., Miyake, K., Nakashima, H., Tanaka, A., Maehara, T., Iizuka-Koga, M., Tsuboi, H., Hayashida, J.N., Ishiguro, N., Yamauchi, M., Sumida, T. and Nakamura, S.: Interleukin-33 produced by M2 macrophages and other immune cells contributes to Th2 immune reaction of IgG4-related disease. *Sci. Rep.* 7 : 42413, 2017.
 - 7) Takahashi, H., Tsuboi, H., Asashima, H., Hirota, T., Kondo, Y., Moriyama, M., Matsumoto, I., Nakamura, S. and Sumida, T.: cDNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 190 : 96 ~ 109, 2017.
 - 8) Tsuboi, H., Hagiwara, S., Asashima, H., Takahashi, H., Hirota, T., Noma, H., Umehara, H., Kawakami, A., Nakamura, H., Sano, H., Tsubota, K., Ogawa, Y., Takamura, E., Saito, I., Inoue, H., Nakamura, S., Moriyama, M., Takeuchi, T., Tanaka, Y., Hirata, S., Mimori, T., Matsumoto, I. and Sumida, T.: Comparison of performance of the 2016 ACR-EULAR classification criteria for primary Sjögren's syndrome with other sets of criteria in Japanese patients. *Ann. Rheum. Dis.* 76 : 1980 ~ 1985, 2017.
 - 9) Moriyama, M. and Nakamura, S.: Th1/Th2 immune balance and other T helper subsets in IgG4-Related Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 401 : 75 ~ 83, 2017.
 - 10) Maehara, T., Mattoo, H., Ohta, M., Mahajan, V.S., Moriyama, M., Yamauchi, M., Drijvers, J., Nakamura, S., Stone, J.H. and Pillai, S.S.: Lesional CD4+ IFN- γ + cytotoxic T lymphocytes in IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis. *Ann. Rheum. Dis.* 76 : 377 ~ 385, 2017.
→ Highlighted in *Nat. Rev. Rheumatol.* 12 : 500, 2016.
 - 11) Shimizu, M., Okamura, K., Kise, Y., Takeshita, Y., Furuhashi, H., Weerawanich, W., Moriyama, M., Ohyama, Y., Furukawa, S., Nakamura, S. and Yoshiura, K.: Effectiveness of imaging modalities for screening IgG4-related dacryoadenitis and sialadenitis (Mikulicz's disease) and for differentiating it from Sjögren's syndrome (SS), with an emphasis on sonography. *Arthritis Res. Ther.* 17 : 223, 2015.
- <代表図書>
- 1) 森山雅文, 中村誠司: 第3章 診断手技・手法 1. 唾液分泌量の測定, 第4章 臨床症状 5. IgG4関連疾患 (2) 病態, 第5章 対応と治療 2. 口腔乾燥症の対応と治療, シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版, 診断と治療社, 44 ~ 47, 187 ~ 191, 214 ~ 218, 2018.
 - 2) 中村誠司: シェーグレン症候群, ドライシンドロームの基礎と臨床, メディカルビュー社, 171 ~ 180, 2016.
 - 3) 中村誠司: 口腔乾燥, 治療を支える, がん患者の口腔ケア (第4章, 4・1), 医学書院, 53 ~ 61, 2017.
- <代表学会発表>
- 1) Sakamoto, M., Moriyama, M. and Nakamura, S.: CD68⁺ monocyte/macrophage via TLR8/TNF- α signaling contributes to the pathogenesis of Sjögren's syndrome. Japanese Association for Dental Research, November 2018.
→ 「IADR Uniliver Hatton Divisional Award」を受賞
 - 2) Sakamoto, M., Moriyama, M., Ohyama, K. and Tanaka, A.: Involvement of innate immune responses in the pathogenesis of Sjögren's syndrome via Toll like receptor 8, The Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Korea, April 2018.
→ 「Best award for oral presentation on international youth session」を受賞
 - 3) 坂本瑞樹, 森山雅文, 大山恵子, 田中昭彦: シェーグレン症候群の病態形成における Toll 様受容体を介した自然免疫の関与, 第72回日本口腔科学会学術集会, 名古屋, 2018年5月.
→ 「優秀発表賞」を受賞