

201024074A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

**早期発症型侵襲性歯周炎(遺伝性急性進行型
歯槽膿漏症候群)の診断基準の確立に関する研究**

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 23 (2011) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

**早期発症型侵襲性歯周炎(遺伝性急性進行型
歯槽膿漏症候群)の診断基準の確立に関する研究**

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

- 早期発症型侵襲性歯周炎（遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群）の診断基準の
確立に関する研究-----2
村上 伸也 （大阪大学・大学院歯学研究科 教授）

II. 分担研究報告

- 遺伝子プロファイリング解析に基づいた早期発症型侵襲性歯周炎患者の診断
技術の開発-----11
梅澤 明弘 （国立成育医療研究センター 部長）

- マルファン症候群と早期発症型侵襲性歯周炎の相関性の調査-----13
森崎 裕子 （国立循環器病研究センター 室長）

- マルファンモデル動物を用いた早期発症型侵襲性歯周炎病態の調査-----17
齋藤 正寛 （東京理科大学・基礎工学部 准教授）

III. 研究成果に関する刊行物一覧-----20

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----24

V. 参考資料

- 歯周病の診断と治療の指針 2007-----184
歯周病の検査・診断・治療計画の指針 2008-----230

[I] 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

早期発症型侵襲性歯周炎（遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群）の診断基準の
確立に関する研究

研究代表者 村上伸也
大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座 教授

研究要旨

早期発症型侵襲性歯周炎（いわゆる遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群）とは、通常中高年齢層で発症する歯周病が若年層で発症し、進行が早いために早期に歯を喪失してしまう難治性疾患である。現在のところ、歯周病患者数の0.1%である約5万人の患者数が同疾患に罹患していると考えられている。興味深いことに、大動脈瘤、肺気胸等を主症状にするマルファン症候群の患者が、この早期発症型侵襲性歯周炎のハイリスク集団である事が示唆されており、マルファン症候群患者における「口が支えるQOL」を著しく脅かしている。そこで本研究では、マルファン症候群における弾性線維成分の劣化が早期発症型侵襲性歯周炎の原因になり得ると考え、マルファン症候群を対象に歯周病罹患実態調査を実施することで「早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準の確立」に関するフィージビリティスタディーを行った。その結果、国立循環器病研究センターとの共同研究により、同病院に歯周病外来を新たに開設し、通院中のマルファン症候群患者の歯周組織検査を行った結果、高口蓋を伴う歯列不正や歯周組織の炎症などの口腔内所見が得られている。さらに、マルファン症候群のモデルマウスにおいて、歯周組織の再生能力が低下していることを見出しており、本研究の実効性が示された。

研究分担者
北村 正博
大阪大学・大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座 准教授

山田 聡
大阪大学・歯学部附属病院
講師

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性疾患の一つである早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準および技術の確立に関する研究をフィージビリティスタディーとして実施することにより、その実効性を明らかにすることを目的とする。具体的には、国立循環器病センターに通院しているマルファン症候群患者を対象にした歯周組織検査を行うこと

により、同症候群と早期発症型侵襲性歯周炎との関連性を解析する。また、マルファン症候群モデルマウスおよび細胞を用いた病態解析を行い、これらの成果をもとにして早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準および技術の確立の実効性を明らかとする。

歯周病は中高年齢層から罹患率の高まる「口」の生活習慣病であり、我が国における患者数は5000万人を超える国民病とも言える。そして、我が国の歯周病患者数の0.1%である約5万人が早期発症型侵襲性歯周炎を発症していると想定され、その中の約20%である約1万人がマルファン症候群の患者であると予測される。早期発症型侵襲性歯周炎の進行は非常に早く、30歳代で多くの歯を失ってしまうこともあるため、若くして「口が支えるQOL」が著しく低下してしまうケースに頻繁に遭遇する。特にマルファン症候群で早期発症型侵襲性歯周炎を発症した患者では全ての歯が抜去される。そのため同患者に対する早期発症型侵襲性歯周炎の予防法と診断基準ならびに技術の確立が切望されている。

早期発症型侵襲性歯周炎は通常の歯周炎と異なり、その発症と進行に遺伝的要因が関与する比率が高い歯周炎と考えられている。そこで本研究では歯周組織の強度を調整する弾性線維の機能低下が遺伝的に引き起こされるマルファン症候群に着目し、国立循環器病センターに通院している近畿地区に在住するマルファン症候群

の患者を対象に、早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準・技術の開発を特徴としている。このようなマルファン症候群における早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準・技術の確立を目指した研究計画は全世界的に前例が無く、極めて独創的なアイデアであると自負している。これらの研究成果を応用することにより、将来的には早期発症型侵襲性歯周病の原因究明がはかられ、その成果は「口が支えるQOL」の維持・増進に大いに寄与すると考えられる。

B. 研究方法

マルファン症候群患者における早期発症型侵襲性歯周炎に関する実態調査

国立循環器病研究センターとの共同研究により、同病院専門外来に歯周病外来を開設し、通院中のマルファン症候群患者を対象に、歯周病の罹患実態を調査した。マルファン症候群の歯周組織検査（口腔内写真撮影、歯周ポケット深さ測定、歯の動揺度の検査、プラークスコアの評価、パノラマレントゲン検査）を行い、歯周病の罹患実態について調査した。

（倫理面への配慮）

研究の開始に先立って、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会および国立循環器病研究センター倫理委員会へ審査申請を行い、両委員会の承認を得ている。研究の実施に際しては、担当医師は、患者本人に口頭および説明書により、試験の内容と意義、予想される有害事象、さらには同意がいつで

も撤回でき、それによっていかなる不利益を受けないことを十分に説明した上で参加の同意を得ている。同意取得と同意の撤回は文書書式を用いており、患者本人の署名を持って同意を確認している。個人情報の守秘には最大の努力が払っており、試験の結果として得られたデータは機密扱いとし、研究結果を公表するときは、必ず個々の被験者を特定できないようにしている。

マルファン患者に関する個人情報は国立循環器病研究センターにおいて匿名化し、匿名化後の検査データは国立循環器病研究センターおよび大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座において厳重に管理している。

C. 研究結果

国立循環器病研究センター病院歯周病外来において3月31日現在で44名のマルファン症候群患者の歯周組織検査を実施している。

被験者の平均年齢は37.4歳、男女比は1対1、13.6%に喫煙歴があった。歯周検査の結果、現在歯数：27本、PCR：23.8%、平均BOP率：9.2%、平均ポケット深さ：2.6mmであった。高口蓋は75%、前歯部叢生を特徴とする歯列不正は、54.5%に認められた。このことから、遺伝的要因に加えて歯列不正等による局所的なプラーク停滞因子が起因する歯周炎の可能性が示唆された。

以下に代表症例の口腔内写真およ

びパノラマレントゲンを示す(図1)。

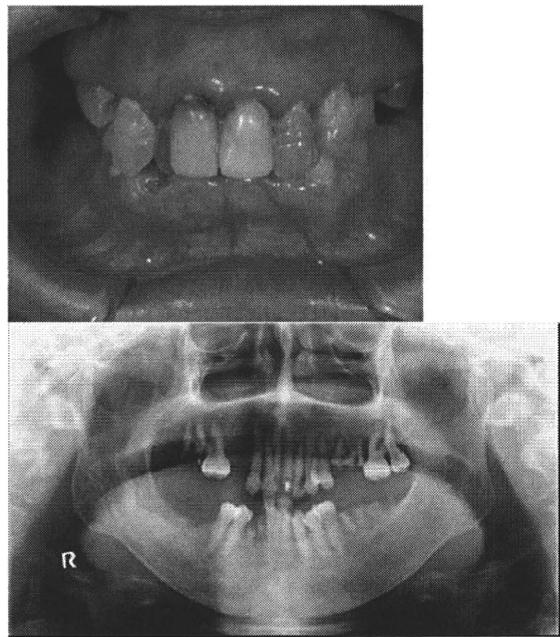


図1 マルファン症候群患者の口腔内所見：辺縁歯肉の発赤と腫脹、歯槽骨の吸収、歯冠部を喪失した多数の残根が認められる。

D. 考察

マルファン症候群患者の歯周組織検査の結果から、マルファン症候群と歯周炎との関連性が示唆された。若年者で発症する早期発症型侵襲性歯周炎との関連性は、さらに検査する症例数を増やし、特に若年者のマルファン症候群患者を解析することにより、統計学的な検討を加える必要性が求められる。

E. 結論

マルファン症候群をモデルとして、未だその発症原因が不明な早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準および技術を開発するという研究の実効性が示され、更なる研究推進の必要性が明

らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, Murakami S. Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16: 345-350, 2010

Komoda H, Okura H, C.M. Lee, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, and Matsuyama A. Reduction of N-glycolylneuraminic acid xeno antigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies. *Tissue Eng Part A*, 16: 1143-1155, 2010

Fujihara C, Yamada S, Ozaki N, Takeshita N, Kawaki H, Takano-Yamamoto T, Murakami S. Role of Mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules in cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *J Biol Chem* 285:28286-28297, 2010

Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Irooi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*, 90: 35-40, 2010

Murakami S Periodontal Tissue Regeneration by signalling molecule(s)- Does FGF-2innovate on the periodontal therapy? - *Periodontology* 2000, 56: 188-208, 2011

Yanagita M, Kojima Y, Kawahara T, Kajikawa T, Oohara H, Takedachi M, Yamada S, Murakami S. Suppressive effects of nicotine on the cytodifferentiation of murine periodontal ligament cells. *Oral Dis*, 16: 812-817, 2010.

Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, Maeda K, Nakamura T, Sawada K, Kobashi M, Awata T, Oohara H, Kawahara T, Iwayama T, Hashikawa T, Yanagita M, Yamada S, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of

periodontal ligament cells via PI3/Akt signaling and CD44/hyaluronan interaction. *J. Cell. Physiol.* 226: 809-821, 2010

2. 学会発表

村上伸也 第8回歯科骨粗鬆症研究会 2010年4月4日 東京
FGF-2による歯周組織再生 -現状と将来展望-

村上伸也 2010年韓国歯周病学会春季学術大会 2010年5月29日 ソウル(韓国) シンポジウム What role does FGF-2 have in periodontal regeneration?

村上伸也 第28回日本臨床歯周病学会年次大会 2010年6月27日 東京 Interdisciplinary session FGF-2は歯周組織再生療法に革新をもたらすか

Murakami S, Joint Symposium of University Leeds and Osaka University 2010年7月5日 リーズ(英国) Periodontal regeneration by FGF-2

村上伸也 第12回台湾歯周病学会 2010年10月16日 高雄(台湾) 特別講演 Periodontal tissue regeneration by basic fibroblast growth factor (FGF-2)

村上伸也 第62回近畿北陸地区歯科医学大会 2010年11月7日 大

阪 特別講演 歯周治療の近未来 -その理論と臨床-

村上伸也 日本歯周病学会 第4回近畿地区臨床研修会 2010年12月5日 大津 特別講演 全身と歯周病の関連を再考する-科学的根拠は何を示すか-

Hashikawa T, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, Kitamura M, Matsuyama A, Lee C, Sawa Y and Murakami S: Possible application of human adipose tissue derived stem cells for periodontal regeneration. ISSCR 8th Annual Meeting, June 17, 2010, San Francisco

Oohara H, Takedachi M, Iyama M and Murakami S: The roles of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in osteoblast differentiation, 88th International Association of Dental Research. July 14, 2010, Barcelona, Spain.

Iwayama T, Hashikawa T, Shimabukuro Y, Ozasa M, Lee C, Matsuyama A, Sawa Y, Murakami S: Adipose tissue-derived stem cells for periodontal regenerative cell therapy. 88th International Association of Dental Research. July 15, 2010, Barcelona, Spain.

Kajikawa T, Yamada S, Ozawa Y, Fujihara C, Tauchi T, Ozaki N, Murakami S: Gene polymorphism in PLAP-1/asporin regulates mineralization of periodontal ligament cells 88th International Association of Dental Research, July 16, 2010, Barcelona.

Yanagita M and Murakami S : Effects of nicotine on immunological functions of human monocyte-derived dendritic cells. The 14th International Congress of Immunology (ICI 2010), August 25 2010 Kobe, Japan.

Kawahara T, Yamashita M, Kajikawa T, Hashimoto Y, Yamada S, Kitamura M, Murakami S : TGF- β signaling regulates mineralization of periodontal ligament cells, The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, October 30-November 2, 2010, Honolulu, Hawaii

Hashikawa T, Ozasa M, Iwayama T, Anzai J, Shimabukuro Y, Murakami S: Periodontal regeneration by transplantation of human adipose tissue derived stem cells. The 96th Annual

Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010, Honolulu

Yamada S: Mechanical stress-induced glutamate signaling-associated molecules regulate the cytodifferentiation of periodontal ligament cells. 韓国歯周病学会 50周年記念大会、2010年11月28日、ソウル (韓国)

橋川智子、小笹匡雄、岩山智明、北村正博、島袋善夫、松山晃文、菰田弘、李 千萬、澤 芳樹、村上伸也 : 脂肪組織由来幹細胞移植による歯周組織再生誘導の解析、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月18日、広島

岩山 智明、橋川 智子、北村 正博、島袋 善夫、村上 伸也 : 歯肉線維芽細胞におけるアディポネクチン受容体1を介した炎症制御、第53回日本歯周病学会春季学術大会、2010年5月14日、盛岡

梶川哲宏、山田 聡、小澤康宏、藤原千春、田内拓史、尾崎亘弘、村上伸也 : ヒト PLAP-1 アスパラギン酸連続配列が歯根膜細胞の石灰化に及ぼす影響について 第53回日本歯周病学会春季学術大会、2010年5月14日、盛岡

大原廣之、竹立匡秀、伊山舜吉、村上伸也：CD73 (ecto-5'-nucleotidase)による骨代謝制御機構 第53回日本歯周病学会春季学術大会、2010年5月14日、盛岡

田内拓史、山田 聡、前田憲一郎、藤原千春、梶川哲宏、尾崎亘弘、村上伸也：新規歯根膜特異的Periostinアイソフォーム TypeII の機能解析 第53回日本歯周病学会春季学術大会、2010年5月14日、盛岡

梶川哲宏、山田 聡、小澤康宏、藤原千春、田内拓史、尾崎亘弘、村上伸也：マウス歯周組織発生過程におけるPLAP-1タンパクの発現解析 第132回日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、2010年6月4日、熊本

河原貴展、山下元三、橋本悠平、梶川哲宏、前田憲一郎、北垣次郎太、山田 聡、北村正博、村上伸也：FGF-2はMAPK依存性にBMPによるSmad1リン酸化を抑制する 第132回日本歯科保存学会2010年度春季学術大会、2010年6月4日、熊本

竹立匡秀、大原廣之、豊澤悟、村上伸也：CD73分子に介して産生されたアデノシンによる骨芽細胞分化制御 第28回日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21日、東京

伊山舜吉、竹立匡秀、大原廣之、村上伸也：CD73 (ecto-5'-nucleotidase)による骨芽細胞分化制御機構の解析 第31回日本炎症・再生医学会、2010年8月5日、東京

河原 貴展、山下 元三、橋本 悠平、梶川 哲宏、中村 友美、前田 憲一郎、山田 聡、北村 正博、村上 伸也：歯根膜細胞においてFGF-2はMAPK依存性にBMPシグナルを抑制する 第53回日本歯周病学会秋季学術大会、2010年9月19日、高松

柳田学、児嶋由子、森健太、小林良平、村上伸也：ニコチンはPPARgammaを介して樹状細胞の分化・免疫応答を制御する 第53回日本歯周病学会秋季学術大会、2010年9月19日、高松

柳田学、児嶋由子、森健太、山田 聡、村上伸也：ローヤルゼリーは歯根膜細胞の石灰化ノジュール形成を促進し、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生を抑制する、第132回日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、2010年10月28-29、岐阜

児嶋由子、柳田学、森健太、山田 聡、北村正博、村上伸也：FGF-2刺激によるマウス歯根膜細胞からのVEGFの誘導、第132回日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会、

2010年10月28-29、岐阜

伊山舜吉、竹立匡秀、大原廣之、小橋茉莉子、豊澤悟、村上伸也：CD73分子による骨芽細胞分化制御とDNAメチル化の関与 第111回例会 大阪大学歯学会 2010年11月11日、大阪

野崎剛徳、山羽聡子、栗原暁子、小林良平、山田 聡、北村正博、村上伸也：FGF-2を用いた歯周組織再生療法の臨床治験症例、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、滋賀

三木康史、北村正博、宮里幸祐、栗原暁子、木田賀子、島美和子、松井美樹、岩山智明、大原廣之、梶川哲宏、山羽聡子、山口泰司、田内拓史、市川朋生、山下元三、柳田 学、橋川智子、佐保輝之、野崎剛徳、山田 聡、島袋善夫、村上伸也：抜歯の診断基準の明確化と歯周炎罹患歯の保存可能期間の推定、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、滋賀

市川朋生、野崎剛徳、山田 聡、北村正博、村上伸也：インプラント治療予定患者に対して徹底した病変除去を目的に歯周外科処置を実施した症例、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、滋賀

大沼洋子、野崎剛徳、山田 聡、北村正博、村上伸也：辺縁部歯肉に強い炎症所見が認められた慢性歯周炎症例、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、滋賀

黒田智子、野崎剛徳、山田 聡、北村正博、村上伸也：犬歯誘導の付与による咬合性外傷の回避が、病状の安定化をもたらした広汎性中等度慢性歯周炎症例、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、滋賀

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「象牙質・歯髄複合体再生治療剤 (Therapeutic agent for dentine-pulp complex regeneration)」村上伸也 12/083,734 (米国) 2010年11月19日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

〔Ⅱ〕 分担研究報告

遺伝子プロファイリング解析に基づいた 早期発症型侵襲性歯周炎患者の診断技術の開発

分担研究者 梅澤明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター 部長

研究要旨

早期発症型侵襲性歯周炎とは、通常中高年齢層で発症する歯周病が若年層で発症し、進行が早いために早期に歯を喪失してしまう難治性疾患である。現在、歯周病患者数の0.1%である約5万人の患者数が同疾患に罹患していると考えられている。中でも、マルファン症候群の患者（大動脈瘤、肺気胸等が主症状）が、同疾患のハイリスク集団であると示唆されており、「口が支えるQOL」を著しく脅かしている。本研究事業では、マルファン症候群の発症原因とは異なる弾性線維成分の劣化が早期発症型侵襲性歯周炎の原因になりうると考え、同症候群の患者を対象に歯周組織検査を実施することによりマルファン症候群患者における早期発症型侵襲性歯周炎の実態調査を行う。

分担課題として、我々は、遺伝子プロファイリング解析に基づいた早期発症型侵襲性歯周炎患者の診断技術の開発を行う。本年度は、様々な幹細胞を用いて検証した結果、従来法に加え「糖鎖プロファイリング」という切り口を導入することで、系統的な有効性評価の指標の一つとなる可能性を見出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性疾患の一つである早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準および技術を確立することを目的とする。具体的には、国立循環器病センターに通院しているマルファン症候群患者を対象にした歯周組織検査、さらにマルファン症候群ではない一般の早期発症型侵襲性歯周炎患者の歯周組織検査を行うことにより、同症候群と早期発症型侵襲性歯周炎との関連性を解析する。また、マルファン症候群モデルマウスを用いた病態解析・マルファン症候群患者由来の細胞を用いたin vitro解析を行い、これらの成果をもとにして早期発症型侵襲性歯周炎の診断基準および技術の確立を目指す。

その中でも、我々は、遺伝子プロファイリング解析に基づいた早期発症型侵襲性歯周炎患者の診断技術を開発することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、細胞を品質評価する上で、従来の手法に加え「糖鎖プロファイリング」という切り口を導入することで、系統的な有効性評価を行う。各種幹細胞の取得、調製を行うとともに、広範な幹細胞群の有効性評価を行った。

・間葉系細胞に対する糖鎖プロファイリングの有効性の検証

細胞：間葉系細胞、幹細胞、軟骨細胞分化、骨細胞分化、脂肪細胞分化

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センター

国立成育医療研究センターにおいては、対象となるヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター、受付

番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238 平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 350、平成 21 年 12 月承認、受付番号 403、平成 22 年 7 月承認）。

（<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>）

それぞれの組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想されるため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

各細胞群を、レクチンマイクロアレイにより、階層的クラスタリング法を用いて判別することができた。結果、解析に用いた細胞の特性に基づき、簡便かつ高感度な細胞選別技術を開発することができた。

D. 考察

糖鎖は細胞の種類、分化度、癌化により大きく変化することが知られていることから「細胞の顔」と

も称される。これら細胞を検証する上で、従来の手法に加え「糖鎖プロファイリング」は、系統的な有効性が評価できると期待されている。本年度、我々は、細胞群の品質を評価する上で、糖鎖プロファイリングの有効性を確認することができた。次年度以降は、その有効性の確認を様々な組織から樹立したヒト由来細胞を用いて検証し、本対象疾患である歯周組織から分離した細胞への応用が可能かどうかを検証する。

E. 結論

各細胞群を、レクチンマイクロアレイにより、階層的クラスタリング法を用いて簡便かつ高感度に判別することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells*. 16(1): 1-11, 2011.
2. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One.*, 5(9): e13017, 2010.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

早期発症型侵襲性歯周炎（遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群）の
診断基準の確立に関する研究

分担研究課題：マルファン症候群と早期発症型侵襲性歯周炎の
相関性の調査

分担研究者 森崎 裕子
国立循環器病研究センター
研究所 分子生物学部

研究要旨：マルファン症候群および類縁のロイスディーツ症候群等の遺伝性結合織疾患の患者では、しばしば、比較的若年期より歯周炎や齲蝕などの歯科的合併症が問題となる。これには、マルファン症候群で高頻度に認められる歯列異常や咬合異常に起因して二次的に発症すると一般的に考えられているが、一方で歯周組織の強度を調整する弾性線維の機能低下が発症あるいは重症化に関わっている可能性も考えられる。そこで、マルファン症候群および類縁の結合織病疾患の診断あるいは疑いで当院結合織病外来を受診した患者のうち、遺伝学的に診断が確定された患者44例について、研究同意を得たうえで、大阪大学の村上伸也教授の協力を得て、当院歯周病外来にて調査のためのデータ収集を行った。得られた臨床データについては、現在、村上教授の研究室により分析中である。

A. 研究目的

早期発症型侵襲性歯周炎のリスク調査を目的とし、国立循環器病研究センター結合織病外来を受診しているマルファン症候群および類縁の結合織病疾患に罹患していることが疑われる患者について、遺伝子検査を含めた遺伝学的診断を行うことにより診断を確定し、当院歯周病外来にて実態調査のためのデータ収集を行う。

B. 研究方法

1) 遺伝子解析

2010年4月より2010年3月の間に国立循環器病研究センター病院に結合織病外来を受診、あるいは手術目的で当院に入院したマルファン症候群および類縁のロイスディーツ症候群が疑われた患者のうち、家族歴や臨床所見より診断が確定している患者を除いた症例について、診断を確定するためにまず遺伝子検査を行った。解析は、末梢血リンパ球より抽出したゲノムDNAを用い、*FBN1*、*TGFBR1*、*TGFBR2*の各遺伝子については全翻訳領域のエクソン領域、*FBN2*遺伝子については第22-36エクソン領域に

ついて PCR 法で増幅したのち直接シーケンス法にて塩基配列を決定し遺伝子変異の解析を行った。当院にて手術を施行された患者については、術中摘出組織より抽出した RNA およびこれより作成した初代血管組織培養細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析も併用した。

なお、これらの遺伝子解析については、国立循環器病研究センター倫理委員会による研究承認のもとに、患者より書面による同意を得て行った。

2) 臨床情報の収集

2010年9月より2010年3月の間に国立循環器病研究センター結合織病外来を受診した患者のうち、すでに診断の確定している患者および新たに1)により診断の確定した患者 計44名について、当院歯周病外来を受診してもらい、阪大歯学部村上伸也教授の研究室の医師による診察を受けるように取りはからった。

なお、この研究についても、国立循環器病研究センター倫理委員会による研究承認のもとに、患者より書面による同意を得て行った。

3) 患者組織由来細胞の収集

国立循環器病研究センター病院血管外科にて、マルファン症候群および類縁のロイスディーツ症候群の疑いで大動脈人工血管置換手術を施行された患者29症例について、術中摘出組織を中膜および外膜に鈍的に分離し、それぞれ、DMEM (10%FBS 加)、

5% CO₂、37°Cの条件下で組織培養を行い、そこより単離された初代血管組織培養細胞(平滑筋細胞、血管線維芽細胞)について、P1~P2の継代条件のものをTCプロテクターに懸濁して凍結し、-133°Cの条件下で凍結保存を行った。

C. 研究結果

1) 遺伝子解析

2010年4月より2010年3月の間に国立循環器病研究センター病院に結合織病外来を受診、あるいは手術目的で当院に入院したマルファン症候群および類縁のロイスディーツ症候群が疑われた患者で、これまでに遺伝子解析が施行されていなかった53例について解析を行った。

その結果、25例で *FBN1* 遺伝子変異、2例で *FBN2* 遺伝子変異、3例で *TGFBR1* 遺伝子変異を同定した。また、手術例については、術中摘出組織より抽出した RNA およびこれより作成した初代血管組織培養細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析により、ゲノムにおける変異が実際に血管組織における mRNA でも認められることを確認した。

2) 臨床情報の収集

当院歯周病外来を紹介受診した44例については、阪大歯学部村上伸也教授の研究室により臨床情報の収集がなされ、現在、結果を分析中である。

3) 患者組織由来細胞の収集

2010年4月より2010年3月の間に国立循環器病研究センター病院血管外科にて、マルファン症候群および類縁のロイスディーツ症候群の疑いで大動脈人工血管置換手術を施行された患者29症例について、術中摘出組織より初代血管組織培養細胞(平滑筋細胞、血管線維芽細胞)の細胞ストックを作成した。

D. 考察

マルファン症候群では、高口蓋、そう歯などとともに、歯列異常や咬合異常などの歯科的異常を認めるものが多いことはよく知られている。また、血管合併症の手術に際して歯周囲炎などの歯科的合併症を認めたために、術後合併症の予防の目的で、術前にやむを得ず抜歯に至るといった例が少なくないことも従前より問題になっていた。こうした高頻度の歯周囲炎の合併は、単に上記の歯列異常や咬合異常に起因するものではないかと一般的には考えられているが、それについての統計的な検討はこれまでになされてはいない。

当研究班の斉藤らにおける最近の研究では、マルファン症候群等の遺伝性結合織疾患ではもともと歯周組織の強度を調整する弾性線維の機能が低下により、歯とその支持組織との結合力の低下が歯周炎の発症あるいは重症化に関わっている可能性が示されている。一方、慢性の歯周炎そのもの

のが、一般的な心血管系のイベントリスクを増加させる、ということも多く、研究者により報告されている。マルファン症候群等の遺伝性結合織疾患において心血管系合併症のリスクは80%以上とされているが、これらの要因が複雑に絡み合ってさらに心血管系合併症のリスクを高めている可能性も考えられる。

今回の研究で対象とした患者には、予想されたとおり、高口蓋、そう歯などとともに歯列異常や咬合異常を認めるものが多く、将来、歯周病を合併する可能性は一般人より高いと考えられた。今後は、さらに患者数を増やして、これらの患者において、歯周囲状態の検討や、心血管系合併症と歯周炎との相関を検討することが重要であると考えられた。

また、これらの疾患を基礎に有する患者に対して、普段より歯周囲状態を把握し歯周病をきちんとコントロールしておくように生活指導をすすめていくことが、将来の心血管系合併症に対する手術合併症の予防にむけても重要であると考えられた。

E. 結論

今回の検討を手がかりに、遺伝性結合織疾患とくに心血管系病変を伴う患者の歯周囲疾患の有無や進展状況について現状把握が進み、病態解明への道筋が開けると期待される

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

マルファンモデル動物を用いた早期発症型侵襲性歯周炎病態の調査

分担研究者 齋藤 正寛

東京理科大学

基礎工学部 生物工学科・准教授

研究要旨 「早期発症型侵襲性歯周炎（遺伝性急性進行型歯槽膿漏症候群）の診断基準の確立に関する研究」を開発するために、マルファン病と早期発症型歯周病との関連性を遺伝学的手法での解析を試みた。そのためマルファン症候群の主な症状である肺疾患、大動脈瘤を引き起こすマルファンモデル動物の歯周組織を解析したところ、歯根膜のマイクロフィブリルは野生型と比較して顕著に断裂化していることが判明した。またマルファンモデル動物の歯根膜内の血管は肥厚化に伴い、歯根膜組織の脆弱化が引き起こされていた。次にマルファンモデル動物の歯根膜の創傷治癒能力を解析した結果、野生型と比較してマルファンモデル動物の歯根膜は創傷治癒不全を引き起こしていた。組織解析の結果、マルファンモデル動物の歯根膜ではTGF-betaシグナルの病的な活性化が観察され、その結果として創傷治癒不全が引き起こしていることが判明した。これらの結果より、マルファン症候群は歯根膜の機能不全を発症することにより、早期発症型歯周病を引き起こしている可能性が示された。

A. 研究目的

歯周病は通常中高年以上で発症する慢性炎症性疾患であるが、歯周病患者数の0.1%である5万人の患者が若年層で発症し、早期に歯を喪失してしまう早期発症型歯周病を発症している。これまで、大動脈瘤、肺気胸を引き起こすマルファン症候群で重度の歯周病を引き起こすことが報告されており、同疾患が早期発症型歯周病の原因になり得ることが示唆されている。そこで本研究課題では、マルファン症候群と歯周病との関連性を解析するために、マルファンモデル動物を用い、歯周病の標的組織である歯根膜に及ぼす影響を解析した。特に本年度は、歯根膜機能を解析する評価系が存在しないため、歯根膜損傷モデルを確立して、創傷治癒能力を指標に解析を行った。

B. 研究方法

(1) マルファンモデル動物の歯根膜の組織学的評価

生後1ヶ月のマルファンモデル動物の下顎を取りだし、CMCコンパウンドで凍結包埋した。川本テープ法で10 μ mの凍結切片を作製した後に、ヘマトキシリンエオジン染色にて解析した。次にマイクロフィブリルを観察する目的に、抗fibrillin-1抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で評価した。

(2) 歯根膜損傷モデルを用いた創傷治癒能力の判定試験

マルファンモデル動物の歯根膜の損傷治癒効果を判定するために、歯根膜の損傷モデルを用いて判定した。生後1ヶ月の下顎の歯根膜を脱臼による損傷を与え、整復した後に1週間、3週間後に顎を摘出し創傷治癒過程を組織学的に評価した。組織評価は、(1)と同様の手法で解析した。

(3) TGF-beta シグナルの評価

歯根膜損傷モデルによる創傷治癒効果を調べる目的に、TGF-betaシグナルに及ぼす