

Role of Copine 7 derived peptide in Dentin-Pulp Complex Regeneration Therapy

○Won-Jun Shon

*Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry and Dental Research Institute,
Seoul National University, Seoul, Korea.*

I. Object: The regeneration of the pulp-dentin complex has been reported in several animal studies using exogenous biological cues or stem/ progenitor cells. We first showed that CPNE7 and Cpne7-DP promote dentin regeneration in dentinal defects of various degrees and that the regenerated hard tissue demonstrates the characteristics of true dentin. Comprehensive evaluation further validated its potential as a bioactive therapeutic agent. This presentation introduce the potential roles of Cpne7-DP in vital pulp therapy (direct pulp capping, indirect pulp capping, hypersensitivity tx.) and regenerative endodontic procedure through animal study.

II. Materials & Methods: Cpne7-DP consists of a synthetic peptide corresponding to the 10 amino acid residue 344–353 fragment of the hCPNE7 protein. The peptides were synthesized using the Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl)-based solid-phase method and characterized by Lugen Sci. Co., Ltd (Bucheon, Korea).

1) Determine the optimal CPNE7-DP concentration

Dental pulp stem cells were cultured and treated Cpne7-DP with different concentration (1,5,10,50,100 µg/ml). Real-time PCR was performed to determine expression of odontoblastic markers (Dspp and DMP1) according to the concentration.

2) Ex vivo Mouse Subcutaneous Transplantation and Histological Analysis

Human DPCs (2×10^6) were mixed with hydroxy apatite/tricalcium phosphate (HA/TCP) ceramic powder (Zimmer, Warsaw, IN, USA) alone or with Cpne7-DP (10 µg) in an 0.5% fibrin gel and then transplanted subcutaneously into immunocompromised mice (NIH-bg-nu-xid; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, USA) for 6 or 12 weeks. See the Appendix for details.

3) Sample preparation and Histological analyses

Eighteen premolars of three beagles are prepared on cervical area until pin-point pulp exposure was generated. And the cavities were divided into 3 groups. Group 1 was received only GI cement filling as a control group. Group 2 was sealed with MTA (ProRoot MTA) mixed with saline before GI cement filling. Group 3 was sealed with MTA mixed with Cpne7-DP before GI cement filling. And histological analyses were done after 12 weeks.

III. Results: Cpne7-DP increased expression of DSPP and DMP1 compared to the control. Expression of DSPP and DMP1 was the highest at concentration of 10 µg/ml and decreased above 50 µg/ml. *Ex vivo* Cpne7-DP treatment group manifested the formation of dentin-pulp-like tissue with cells inserting long cellular processes into the tubule-like structure formed within the newly mineralized tissue. In histological analysis, compare to control group, newly formed tertiary dentin is shown under cavity sites in group 2 and 3. In group 2, irregular and atubular features of tertiary dentin were generated. On the other hand, the regenerated dentin in group 3 showed dentinal tubules which are typical characteristics of reactionary dentin.

IV. Conclusion: Cpne7-DP induces odontoblast-like differentiation *in vitro* and tubular dentin formation *in vivo*. Moreover, we first show that CPNE7 and Cpne7-DP promote dentin regeneration in dentinal defects of various degrees and that the regenerated hard tissue demonstrates the characteristics of true dentin. Comprehensive evaluation further validated its potential as a bioactive therapeutic agent.

Contact information of the authors

Won-Jun Shon, D.D.S, PhD

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Seoul 03080, Republic of Korea.

endoson@snu.ac.kr

Novel bio-active adhesive monomer CMET stimulates human dental pulp stem cells differentiation toward odontoblast phenotype: a comparative study

○Youjing Qiu, Takashi Saito

*Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, Japan*

I. Object: The present study aims to evaluate the in vitro effect of the novel adhesive monomer CMET, a calcium salt of 4-methacryloxyethyl trimellitate (4-MET), on the proliferation, mineralization and differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs), comparing with 4-MET, calcium hydroxide (CH), and mineral trioxide aggregate (MTA).

II. Materials & Methods: hDPSCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. Mineralization reagent including β-glycerophosphate (β-GP, 10 mM) and ascorbic acid (AA, 50 µg/mL) was incorporated upon confluence. The powder of four tested materials (CMET, 4-MET, CH and MTA) was first dissolved in distilled water (dH₂O) and then was diluted by DMEM to yield final concentrations. Solvent (dH₂O) was used as a control. For cytotoxicity assay, four materials were directly dissolved in DMEM. Cell viability was assessed using CCK-8 assay. Realtime RT-PCR was used to quantify the mRNA expression of odontogenic markers. Mineralization inducing capacity was evaluated by alkaline phosphatase (ALPase) activity and alizarin red S staining. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA and post hoc Tukey's HSD test, with the significance level at 1%.

III. Results: Cell viability was significantly greater in the CMET- and MTA-treated (10%, v/v) groups than that in other groups, higher concentrations of each material exhibited cytotoxicity to different extents ($P < 0.01$). CMET showed the lowest toxic effect on hDPSCs. CMET treatment augmented the mRNA expression levels of odontogenic markers ($P < 0.01$), while no great up-regulation was observed in other three material treated groups. The addition of CMET significantly increased the ALPase activity of hDPSCs on day 14 and 21, then decreased on day 28 ($P < 0.01$). The calcific deposition of hDPSCs was accelerated by the addition of CMET, CH, and MTA on day 30 and 32 ($P < 0.01$), but it was inhibited by 4-MET on both days.

IV. Conclusion: The present results indicated that the differentiation of hDPSCs was stimulated into odontoblast phenotype by the addition of CMET, while the addition of CH and MTA rather promoted hDPSCs calcific deposition than differentiation into odontoblast. The data were different from what we have obtained from rat odontoblast-like cells.¹ The present study has also revealed that hDPSCs are less sensitive to extracellular Ca²⁺ than differentiated odontoblast-like cells. The results provided evidence that CMET is a promising bio-active material in dentin regeneration.

¹ YJ Qiu, J Tang, T Saito (2020) A novel bio-active adhesive monomer induces odontoblast differentiation: a comparative study. *International Endodontic Journal* <https://doi.org/10.1111/iej.13365>.

Contact information of the authors

Youjing Qiu

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, Japan
qiuyoujing@gmail.com

Buckling resistance of various NiTi glide-path preparation instruments in dynamic or static mode

○Jung-Hong Ha¹, Sang Won Kwak², Antheunis Versluis³, Hyeon-Cheol Kim²

¹*Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea*

²*Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Dental Research Institute, Pusan National University,
Yangsan, Korea*

³*Department of Bioscience Research, College of Dentistry, University of Tennessee Health Science Center, TN, USA*

I. Object: The aim of this study was to compare the buckling resistance of NiTi instruments for glide-path preparation depending on test mode: static vs. dynamic.

II. Materials & Methods: Conventional PathFile (PF) and heat-treated ProGlider (PG) and WaveOne Gold Glider (WG) were evaluated. The instrument tips were placed in a small dimple prepared in an aluminum cube in a customized device. The file was then pushed in axial direction at 1.0 mm/sec crosshead speed with rotation (dynamic mode) or without rotation (static mode). The dynamic mode of WG used its dedicated reciprocating rotation whereas the others were rotated continuously at the 300 revolutions per minute. The axial load and lateral buckling displacement were simultaneously measured. Data were analyzed statistically using two-way analysis of variance ($P=.05$).

III. Results: The buckling resistance in dynamic mode was higher than in static mode for PG and WG ($P < .05$), while PF was not influenced by test modes ($P > .05$). In dynamic mode, the PG required the highest buckling load and followed by PF and WG ($P < .05$). In static mode, the WG showed the lowest load ($P < .05$). Dynamic mode showed significantly more upper level lateral buckling displacement than in static mode ($P < .05$).

IV. Conclusion: When the glide-path preparation instruments moved in the dynamic mode as in clinical situations, the buckling resistance of the heat-treated NiTi glide-path instruments was higher than in static condition. The heat-treated instruments may have better buckling resistance than the conventional NiTi instrument in clinical situations.

Contact information of the authors

Jung-Hong Ha

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea
endoking@knu.ac.kr

Evaluation of Young's modulus and dentin bond strength of universal adhesives applied in different coatings

○Arefin Alam¹, Abu Faem Mohammad Almas Chowdhury^{1,2}, Monica Yamauti¹, Hidehiko Sano¹

¹*Department of Restorative Dentistry, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan*

²*Department of Conservative Dentistry and Endodontics, Sapporo Dental College, Dhaka, Bangladesh*

I. Object: This study evaluated Young's modulus (E) and microtensile bond strength (μ TBS) of universal adhesives to dentin and compared with a standard two-step self-etch adhesive when applied as single or double coats.

II. Materials & Methods: Thirty sound human maxillary premolars were cut to expose flat dentin surfaces, ground with regular-grit diamond burs (63 μ m), and randomly assigned to six groups (n = 5) based on adhesives - Scotchbond Universal Adhesive (SB; universal; 3M, Germany), G-Premio Bond (GP; universal; GC, Japan), and Clearfil Megabond 2 (MB; two-step self-etch; Kuraray Noritake, Japan; control); and application coats - single (according to manufacturers' instructions) and double (only the bond resin in case of MB). Adhesive application was followed by composite resin build-up and water storage (37°C; 24 h). One bonded dentin slab per tooth in each group (n = 1) was employed for the E test with ultramicrohardness tester. Three 1 mm² beams per tooth obtained from twenty-four bonded teeth (n = 4) were subjected to the μ TBS test. The thicknesses of the adhesives were measured from each pair of fractured beams under SEM ($\times 500$). E, μ TBS, and adhesive thickness data were analyzed by Dunnett's T3, One-way ANOVA (Tukey's post-hoc), and Welch's t-test.

III. Results: In general, the highest thickness and μ TBS values were obtained by MB and lowest by GP. Double coating increased thickness and μ TBS of all adhesives ($p < 0.05$). However, E showed an opposite trend compared to μ TBS. The highest mean E was obtained by the thinnest adhesive - GP, followed by relatively thicker SB and the thickest MB. Double coating resulted in significant decrease in E ($p < 0.05$), except for GP (7.8 ± 0.2 GPa) compared its single coat (7.8 ± 0.4 GPa).

IV. Conclusion: In this study, thicker adhesive layers resulted in lower E and higher μ TBS values. Additional coatings of universal adhesives could improve their bonding performance to dentin.

Contact information of the authors

Arefin Alam

Department of Restorative Dentistry, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan

arefin.kowshik@gmail.com

Micro-CT evaluation of interfacial gap formation of CAD/CAM inlays after thermomechanical loading

○Juhea Chang¹, Wonjoon Moon², Shin Hye Chung²

¹National Dental Care Center for Persons with Special Needs, Seoul National University Dental Hospital, Seoul, Korea

²Department of Dental Biomaterials Science, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

I. Object: The aim of this study was to evaluate the interfacial gaps of CAD/CAM lithium disilicate inlays before and after thermomechanical loading.

II. Materials & Methods: MOD cavities were prepared on extracted mandibular molars with deep proximal margins located beneath the cemento-enamel junction. One of both proximal margins was elevated with resin modified glass ionomer (RMGI) by 2-mm height. Lithium disilicate CAD inlays were fabricated and bonded with self-adhesive resin cement. An aging process was simulated on the specimens under mechanical loading and thermal alterations using a chewing simulator. Margins with and without elevation were analyzed under SEM using epoxy resin replicas before and after loading. Both proximal boxes were stained with silver nitrate solution and scanned using micro-CT. Volumetric gaps at the mesial and distal boxes were measured at the interfaces before and after loading. Statistical analyses were performed using ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$).

III. Results: SEM showed more marginal discontinuities at the margins without elevation that increased after thermomechanical loading. Micro-CT exhibited three-dimensional dye penetrating modes in the bonded interfaces at the gingival margins with and without elevation. Interfacial disintegration was more prominent at the margins without elevation. Thermomechanical loading increased gaps at both margins with and without elevation ($p < 0.05$).

IV. Conclusion: Thermomechanical loading induced interfacial disintegration at bonded lithium disilicate CAD inlays with deep margins. Margin elevation using RMGI reduced the extent of interfacial gap formation both before and after aging simulation.

Contact information of the authors

Juhea Chang

National Dental Care Center for Persons with Special Needs, Seoul National University Dental Hospital, Seoul, Korea
juhchang@snu.ac.kr

Bonding Performance of Experimental Self-adhesive Resin Cement to Bovine Teeth

○Akimasa Tsujimoto¹, Hiroshi Takamiya¹, Yuiko Arai¹, Yusuke Shimatani¹,
Yuko Nagura¹, Kie Nojiri¹, Toshiki Takamizawa¹, Masashi Miyazaki¹, Ko Hinoura²

¹Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

²Hinoura Dental Clinic

I. Object: An experimental self-adhesive resin cement (SU Glue, 3M Oral Care, St. Paul, MN, USA), has recently been developed. The purpose of this study was to examine the enamel and dentin bond strength of this material and compare it to commercial self-adhesive resin cements.

II. Materials & Methods: Four self-adhesive resin cements were used in this laboratory study: 1) Clearfil SA Luting Multi (CS, Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan), 2) G-Cem One (GO, GC, Tokyo, Japan), 3) RelyX Unicem 2 (RU, 3M Oral Care), and 4) SU Glue (SG, 2). Enamel, etched enamel and dentin surfaces were bonded to each of the four resin cements with (photo-cure) or without photo-curing (chemical-cure). Bonded specimens were randomly assigned to two groups: 1) 24 h water storage and 2) 5,000 thermal cycles. Shear bond strength testing was performed.

III. Results: The experimental self-adhesive resin cement (SG) consistently showed a shear bond strength of over 15MPa, but the bond strength was different depending on the substrates, and the bond strengths were much higher than those of other tested resin cements in the most groups.

Material		CS	GO	RU	SG
Enamel	Photo-cure	24.6 (2.6)	16.5 (4.2)	16.2 (1.6)	20.2 (2.0)
	Chemical-cure	23.8 (4.3)	11.5 (1.1)	18.0 (2.6)	24.3 (5.5)
Etched Enamel	Photo-cure	41.4 (2.6)	46.1 (13.7)	36.6 (8.7)	53.3 (2.8)
	Chemical-cure	36.0 (2.9)	33.8 (8.9)	35.5 (6.4)	52.8 (6.4)
Dentin	Photo-cure	14.8 (1.5)	9.0 (1.8)	19.2 (2.0)	21.9 (3.2)
	Chemical-cure	10.6(1.1)	10.1 (1.6)	9.7 (3.0)	27.8 (4.1)

Material		CS	GO	RU	SG
Enamel	Photo-cure	26.1 (4.2)	8.3 (4.0)	12.7 (3.7)	16.4 (3.4)
	Chemical-cure	28.0 (1.4)	6.7 (4.4)	15.4 (1.8)	24.5 (4.4)
Etched Enamel	Photo-cure	47.7 (6.4)	48.4 (5.0)	43.3 (3.6)	37.5 (8.0)
	Chemical-cure	34.5 (3.2)	34.0 (4.8)	44.0 (4.6)	43.6 (5.9)
Dentin	Photo-cure	11.9 (2.3)	9.4 (2.6)	16.8 (1.0)	16.6 (2.3)
	Chemical-cure	13.1 (3.2)	9.3 (1.5)	12.2 (5.3)	22.4 (3.7)

IV. Conclusion: The experimental self-adhesive resin cement (SG) has a consistently high bond strength regardless of substrate and curing mode, compared to other commercial self-adhesive resin cements.

Contact information of the authors

Akimasa Tsujimoto

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

tsujimoto.akimasa@nihon-u.ac.jp

バルクフィルコンポジットレジンとの重合収縮応力に関する研究

大阪歯科大学 歯科保存学講座

○岩崎和恵, 保尾謙三, 小正玲子, 竹内摂, 岩田有弘, 吉川一志, 山本一世

Study on polymerization contraction stress of bulk-fill resin composites

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

○IWASAKI Kazue, YASUO Kenzo, KOMASA Reiko, TAKEUCHI Osamu, IWATA Naohiro, YOSHIKAWA Kazushi, YAMAMOTO Kazuyo

【目的】光硬化型コンポジットレジン（以下 CR）修復では重合収縮応力や照射深度の問題から、深い窩洞に対しては積層充填が推奨されているが、近年、大型窩洞に対して一括で充填できるバルクフィルコンポジットレジン（以下 BCR）が開発され臨床応用されている。しかし、C-factor の大きな窩洞における BCR の重合収縮応力の影響についての報告は少ないのが現状である。今回、多結晶化ガラスブロックを用いた視覚的評価ならびに、せん断接着試験を行い、C-factor の大きな窩洞における BCR の重合収縮応力の影響について検討を行った。

【材料と方法】BCR としてバルクベースハード（サンメディカル、BH）とビューティフルバルク（松風、以下 BB）を、対照として従来型 CR のグレースフィルフロー（GC、以下 GF）を、接着システムとしてクリアフィルメガボンド 2（クラレノリタケデンタル、以下 MB）とクリアフィルユニバーサルボンド Quick ER（クラレノリタケデンタル、以下 ER）を用いた。また、多結晶化ガラスブロックとしてリン酸カルシウム系結晶化ガラスブロック（バイオラム M、日本電気硝子）を使用した。MB で接着処理後、各 CR を充填した群を MGF 群、MBH 群、MBB 群とし、ER で接着処理後、各 CR を充填した群を EGF 群、EBH 群、EBB 群とした。

バイオラム M を耐水研磨紙にて #600 まで研磨し、平坦面を作製後、直径 4.5 mm 深さ 4.0 mm の円柱状の窩洞形成を行った。業者指定の通りに接着処理と CR 充填を行い、24 時間水中浸漬。縦断面を形状測定レーザーマイクロスコープ（GLSM）にて観察し、ギャップおよびクラックの発生状態を Fig.1 に示す通りにスコアリングを行い、Mann-Whitney 法により有意差を検討した ($p < 0.05$)。また抜去ウシ歯の象牙質に平坦面を作製し、耐水研磨紙 #600 まで研磨し被着面とし、接着面積を規定（内径 2.5mm）して、接着処理と CR 充填を行い、万能試験機 AUTOGRAPH AGS-J（SHIMADZU）を用いて CHS=1.0 mm/min にて接着直後のせん断引張強さを測定した。統計処理は、一元配置分散分析および Tukey の検定を行った ($p < 0.05$)。本実験は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号 第 20-04009 号）。

【結果】視覚的評価の結果を Table1 に示す。MGF 群は MBH・MBB 群と、EGF 群は EBH・EBB 群と比べて、ギャップやクラックの発生状態に有意差が認められた。MGF・EGF 群では窩底部にギャップが認められた。また MBB 群の接着強さは MGF・MBH 群より有意に高かったが、MGF 群と MBH 群間では有意差は認められなかった。また、EGF 群と EBB 群の接着強さは EBH 群と比べて有意に高かったが、EBF 群と EBB 群間では有意差は認められなかった。

【考察】GF は窩底部でギャップが認められたことから、光照射が窩底部まで十分に届かず重合収縮の影響を受けたと考えられる。また、BH と BB では窩底部でクラックが認められたことやせん断接着強さの結果から、光照射が窩底部まで十分に届き、重合収縮の影響が生じる前に窩底部で接着したと考えられる。以上より、BCR を用いた一括充填は深い窩洞における接着には有効であるが、C-factor の大きな窩洞においては重合収縮応力による不快事項が完全には解消せず、充填操作に留意する必要があることが示唆された。

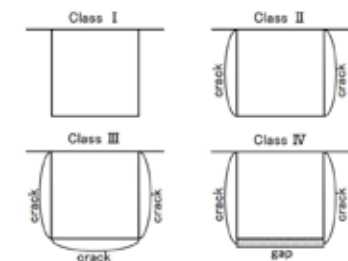


Fig.1 Classification of gap and crack formation

	Class I	Class II	Class III	Class IV
GF			3* ²	10* ¹ 7* ²
BH			10* ¹ 10* ²	
BB		1* ²	9* ¹ 8* ²	1* ¹ 1* ²

Table 1 Distribution of crack and gap formation (MB*¹ ER*²)

□ : Significant difference ($p < 0.05$)

SS-OCT を用いた咬耗の 3D 画像診断

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野 ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科保存修復学分野 ³Department of Restorative Dentistry, University of Washington School of Dentistry
⁴国立長寿医療研究センター

○ 柏 美砂¹、島田 康史^{1,2}、Sadr Alireza^{1,3}、吉山 昌宏²、角 保徳⁴、田上 順次¹

3D diagnosis of occlusal tooth wear using swept-source optical coherence tomography

¹Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan ²Department of Operative Dentistry, Okayama University, Okayama, Japan ³Department of Restorative Dentistry, University of Washington School of Dentistry, Seattle, USA ⁴National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Japan

○ Misa Kashiwa¹, Yasushi Shimada^{1,2}, Alireza Sadr^{1,3}, Masahiro Yoshiyama², Yasunori Sumi⁴, Junji Tagami¹

【目的】

咬耗は全ての世代に一般的にみられる臨床所見である。しかしながら酸蝕症などの加速因子によって急激に進行することがあり、病的な段階まで放置すると歯髄症状や咬合異常など、多くの合併症を発生する可能性が高くなる。咬耗の有病率は年々増加しており、高齢化社会において口腔内の健康を長期的に維持する上で歯の咬耗の進行を測定する客観的な方法が必要である。波長走査型光干渉断層計 (SS-OCT) は、生体構造の断面画像をリアルタイムで作成することができる非侵襲的な診断方法である。本研究の目的は、in vitro での咬合面の咬耗に対する SS-OCT の診断精度を評価することである。

【方法】

東京医科歯科大学倫理審査委員会承認 (D2013-022) の下、視診にて咬合面に象牙質の露出がみられない 48 本のヒト抜去臼歯を収集し、実験に使用した。抜去歯の咬合面からデジタルカメラ画像を撮影し、その後、頬側から口腔内デジタル X 線写真 (Dentnavi Hands XD35, 吉田製作所) を撮影した。次に SS-OCT (Yoshida Dental OCT, 吉田製作所) を用いて咬合面からスキャンし、SS-OCT の 3D 画像を取得した。SS-OCT3D 画像を撮影した後、抜去歯を歯軸方向に半切し、実際の咬合面における歯の損耗状態を、走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。

口腔内デジタル X 線写真および SS-OCT3D 画像を用い、歯の摩耗の程度を 8 名の歯科医が評価し、以下の 3 段階に分類した。

スコア 1: 軽度のエナメル質摩耗 残存エナメル質の厚さ 1/2 以上

スコア 2: 著しいエナメル質摩耗 残存エナメル質の厚さ 1/2 未満

スコア 3: 象牙質の露出を伴うエナメル質摩耗 (Fig.1)

歯の半切面の CLSM 観察結果を基準とし、著しいエナメル質摩耗 (スコア 2) および象牙質の露出 (スコア 3) について、SS-OCT 画像および口腔内デジタル X 線写真の感度、特異度、および CLSM 観察結果との一致率 (カッパ係数) を計算し、Wilcoxon rank sum test を用いて有意水準 $p = 0.05$ にて統計的に分析した。

【結果】

スコア 2、スコア 3 の感度は SS-OCT にて 0.74、0.86、デジタル口腔内 X 線にて 0.49、0.61 であった。CLSM との一致率は SS-OCT では 0.74、デジタル口腔内 X 線では 0.50 であった。SS-OCT はデジタル口腔内 X 線よりも有意に高い感度および一致率を示した ($p < 0.05$)。SS-OCT と口腔内デジタル X 線の特異度は、それぞれ 0.89 と 0.92 であり、SS-OCT とデジタル口腔内 X 線の間に有意差はみられなかった ($p < 0.05$)。

【考察】

SS-OCT は歯の構造の断面を画像化して、残存エナメル質の厚さを示すことができた。SS-OCT 画像ではエナメル質と象牙質の識別が可能であり、象牙質の露出に対しても高い感度と特異度を示した。したがって、SS-OCT は咬合面の咬耗について進行程度を正確に診断し、臨床でのモニタリングに使用できると思われる。

【結論】

SS-OCT は咬合面の咬耗の程度を非侵襲的に断層画像で視覚化し、高い診断精度で推定する可能性が示唆された。

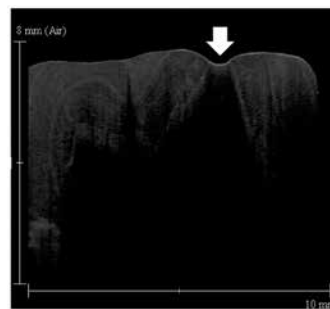


Fig.1 SS-OCT Cross-sectional image for score 3

バイオフィームから根面象牙質を保護する S-PRG 含有バーニッシュの最適フィラー比率

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯制御学分野

○ ムルトゥザ サイドアリ、マティン カイルール、平石 典子、田上 順次

Optimal S-PRG Ratio in a Dental-varnish to Protect Root-dentin from Biofilm-challenge

Department of Cariology and Operative Dentistry, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

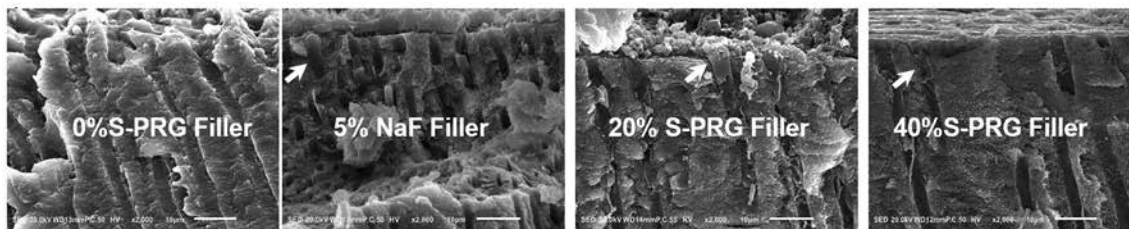
○ Syed Ali MURTUZA, Khairul MATIN, Noriko HIRAISHI, Junji TAGAMI

Objective: This study was designed to evaluate a new dental-varnish (DV) introduced with Surface Pre Reacted Glass Particles (S-PRG) fillers in order to determine the optimal filler ratio effective for protecting root dentin from cariogenic biofilm challenge and plugging dentinal tubules (DTs).

Materials and Methods: Bovine root dentin was cut to prepare block samples of 4.0 mm × 4.0 mm dimension. After exposing the dentin the root surfaces were flattened with silicon carbide grinding paper (SiC) #1000, #1200, #1500 and #2000 sequentially. Sonicated with 0.5M ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) solution for 5 minutes followed by washing with autoclaved deionized water (Milli-Q water) for 5 minutes. The samples were divided into Control group (no material) and Experimental groups; containing 0%, 10%, 20% and 40% S-PRG fillers and 5%-NaF (Shofu, Kyoto Japan). The materials were applied onto the root dentin surface just before setting the samples for biofilm challenge according to manufacturer's instructions. For the formation of Biofilm, *Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*) was used and it was carried out inside an oral biofilm reactor (OBR) supplemented with heart infusion broth containing 1% sucrose (HI+Suc) for 24 hours at 37°C. After the biofilm formation, it was further incubated in a suspension of HI+Suc for 7 days inside an incubator at 37°C changing with fresh HI+Suc at every 48 hours. After removing the biofilms by 0.5M NaOH solution and lightly scrubbing with tiny sponge the conditions of the sample surfaces were inspected with a confocal laser scanning microscope (CLSM) and analyzed using Keyence VKX150/X160 software. Average distance between 5 highest peaks and 5 lowest valleys (SzJIS; μm) of 10 representative DTs were plotted in graph which showed that the penetration of laser representing depth of un-plugged or reopened DTs due to bacterial acid attack for each group of sample. In addition, top surfaces and cross-sections of the samples were observed with SEM. All the numerical data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey's HSD ($p < 0.05$).

Results and Discussions: After 7 days of biofilm attack presence of the DV could be observed in S-PRG containing groups – mainly in 20% to 40% S-PRG groups. CLSM data indicated that the laser penetration depth was considerably less in S-PRG incorporated groups compared to the Control and 5%-NaF groups. In 20% and 40% groups SzJIS was significantly low ($p < 0.05$) than the Control, might be due to the presence of DV material with S-PRG filler particles that remained inside the DTs without getting washed-out even after 7 days of biofilm attack. On SEM observation, wide open DTs could easily be detected in Control samples. Some open tubules are visible in experimental material groups – were more in 40% than in 20%. In high magnifications we can appreciate the small quantity of fillers which appeared to have fused with the base. Images of cross-sectioned root dentin show DTs are visible in all groups showing presence of the control materials (0% S-PRG and 5% NaF). Vertically exposed DTs are visible in images showing presence of the 20% and 40% S-PRG containing DV (arrows in the Figures), 20% S-PRG appears to have remained plugged better in the DTs. In high magnifications fillers appeared to be separating from the base of the material and larger sized fillers in 40% were not able to enter into the DTs. More DTs appeared to have remained occluded in 20% S-PRG filler sample than in 40% in places. At this stage of the study it was understood that the new DV containing 20% S-PRG might be the optimal ratio for protecting exposed root dentin by plugging open DTs.

Figure: Representative SEM images showing cross-sections of the samples after 7-day biofilm challenge



新規構造発色フロアブルレジン (OCF-001) のヒト歯牙との色調調和性

東京医科歯科大学 大学院 歯医学総合研究科 う蝕制御学分野
○古澤 聖佳、小林 駿、保坂啓一、中島 正俊、田上 順次

Color matching of newly-developed flowable composite (OCF-001) with structural coloration restored in various-shade human teeth

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan

○KIYOKA FURUSAWA, SHUN KOBAYASHI, KEIICHI HOSAKA, MASATOSHI NAKAJIMA, JUNJI TAGAMI

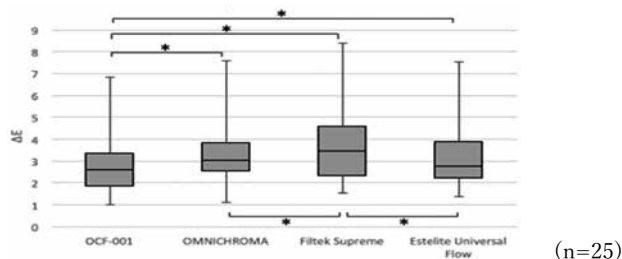
【諸言】

近年、光重合型コンポジットレジンは、優れた接着性、審美性、耐久性及びコストパフォーマンスにより、審美修復材料として、前歯部から臼歯部まで幅広く用いられている。しかしながら、歯の色調は部位や年齢によって様々であり、限られたシェードのコンポジットレジンで周囲歯質と正確に色調適合させることは容易ではない。トクヤマデンタルにより開発されたOMNICHROMA (260 nm SiO₂-ZrO₂: 79%配合)は、顔料を添加することなく、同一サイズの球状フィラーを均一に配合して構造発色させることで、単一のコンポジットレジンであらゆる色調の歯に対し高い色調調和性を持つことが報告されている。本研究では、操作性向上を目指し、フロワブル化した試作コンポジットレジンOCF-001 (260 nm SiO₂-ZrO₂: 71%配合、トクヤマデンタル社製)の色調調和・再現性を、様々な色調のヒト抜去歯に充填することにより評価・検討を行った。

【材料及び方法】

実験には、新規フロワブルレジン OCF-001、Filtek Supreme Ultra Flow(シェード A2、3M 社製)、Estelite Universal Flow(シェード A2、トクヤマデンタル社製)およびユニバーサルレジン OMNICHROMA の 4 種類のコンポジットレジンをを用いた。健全ヒト抜去上顎中切歯 25 本を集め、クリスタルアイ (OLYMPUS) にて歯牙シェード分布の確認を行った (A2—4、B2—4、C 1—4、D 4 の 12 種類)。抜去歯牙を視覚全色域カメラ (二次元色彩計 RC500; PaPaLaB Co.) にて撮影・測色を行なった後、歯頸部に長軸方向に 4 mm、近遠心方向に 3mm、深さ 2 mm の窩洞形成を行った、ボンドマーライトレス (トクヤマデンタル) を用いて業者指示通りにボンディング操作を行った後 4 種のコンポジットレジンのうち 1 つを無作為に選択して充填、20 秒光照射後、形態修正・研磨を行った。37°C 水中に 24 時間保管後、D65 光源下、黒色板背景、湿潤下にて、修復歯の撮影・測色を行なった。測色後、コンポジットレジンを窩洞から慎重に除去し、他種のコンポジットレジンを同様に充填し、撮影・測色し、これを繰り返した。得られた CIE XYZ データから、充填したコンポジットレジンの中央部を通る切縁から根尖までの CIE L*a*b*値を連続的に算出し、コンポジットレジン充填部と窩洞形成前の歯牙同部の色差 ΔE_{00} を 1 ピクセル (0.044x0.044 mm) ごとに算出した。その後、充填中央部幅約 1 mm (横 22 ピクセル x 縦 86 ピクセル) における ΔE_{00} の平均値を求め、修復歯それぞれのデータとした。得られたデータは Wilcoxon signed rank test を用いて有意水準 5% で統計学的分析を行った。(倫理審査委員会承認番号: D2013-022-02)

【結果】 Figure (The ΔE_{00} values of the four composite resins)



【結論】

本研究で用いた窩洞サイズにおいては、OCF-001 の方が、OMNICHROMA、Filtek Supreme Ultra Flow、Estelite Universal Flow に比べて ΔE_{00} が有意に低い値を示し ($p < 0.05$)、より元の歯の色調調和・再現性が高いということが示唆された。

細胞シート工学を用いたヒト歯髄細胞シートの評価

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

○小柳 圭史、前田 宗宏、五十嵐 勝

Evaluation of human dental pulp cell sheets using Tissue-Engineered Cell Sheets

Department of Endodontics, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo

○Katofumi KOYANAGI, Munehiro MAEDA, Masaru IGARASHI

【緒言】

細胞培養の中には、細胞を立体的な形で培養する三次元培養があり、二次元的な単層培養と比較し、より生体に近い高次構造が確立できるといわれており、薬剤等の試験において単層培養と比較し、生体に近い結果が得られるなどの報告もある。しかしながら、三次元培養においては、足場となるスキャフォールドの使用による細胞との相互作用の考慮、また細胞スフェロイド等における、低酸素化や低栄養によるアポトーシス誘導など様々なメリット・デメリットが認められる。そこで、今回われわれは、単層培養された細胞シートをトリプシン等の酵素を用いず、細胞間の結合および、細胞外マトリックスが保持された細胞シートを回収することを可能にする温度応答性培養皿である UpCell を使い、スキャフォールドフリーな細胞シートを得られることに着目し、得られた細胞シートをゼラチンスタンプ (CellStamp for UpCell) により、複数層に積層した場合の、三次元多層構造細胞シートの石灰化に対する反応を解析することとした。

【材料と方法】

使用した細胞株は、日本歯科大学附属病院の患者で矯正治療のため便宜抜去した智歯からヒト歯髄細胞を採取し、実験に供した (日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会承認番号:NDU-T2018-04)。

3~6 継代の細胞を本研究にて使い、ヒト歯髄細胞を 24well UpCell に播種を行った。4~5 日後、コンフルエントになったのを確認し、ゼラチンスタンプを使い、単層培養上に細胞シートの積層を行い、3 層の細胞シートの作製を行った。その後、細胞シートを凍結切片とし、HE 染色を行い、3、7、14 日時点における MTT アッセイによる細胞増殖率を計測した。また、石灰化誘導培地にて単層培養及び、上記の細胞シートを培養し、3、7 日後に real-time PCR で *ALP*, *COL1A1*, *OC*, *DSPP* の遺伝子発現量の解析および、21 日後にアリザリンレッド染色を行った。

【結果】

凍結切片から得た、3 層細胞シートでは約 25 μm の厚みを有する細胞シートであり、MTT アッセイの結果からすべての時点において細胞増殖率の抑制は、起きていなかった。また、real-time PCR の結果から細胞シートにおいて、単層培養と比較し、1 週後の *ALP*, *COL1A1*, *OC*, *DSPP* の発現量の増加を認めた。アリザリンレッド染色においては、単層培養及び、細胞シートにて石灰化を認め、細胞シート上では、結節上の石灰化物を認めた。

【考察及び結論】

ヒト歯髄細胞シートは、単層培養と比較し、細胞シートを積層することにより、石灰化誘導を促進することが示唆され、長期的な培養における細胞活性の維持が認められた。また、積層に際してゼラチンスタンプを用いることにより、容易に細胞シートの積層が行えることが可能であった。今後、細胞シートにより生体に近い高次機能を有する三次元的な環境下において、薬剤および、材料の比較検討が行える可能性が示唆された。

Er:YAG レーザー照射により生じる根管内気泡の挙動解析

東北大学大学院 歯学研究科 エコロジー歯学講座 歯科保存学分野

¹神奈川歯科大学大学院 歯学研究科 口腔科学講座 口腔生化学分野

○長橋泰次、半田慶介¹、兼平正史、八幡祥生、田中利典、齋藤正寛

Operative Dentistry, Department of Ecological Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

¹Oral Biochemistry, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

Observation of bubbles inside root canal induced by Er:YAG laser

○Taiji NAGASHI, Keisuke HANDA¹, Masafumi KANEHIRA, Yoshio YAHATA,
Toshinori TANAKA, Masahiro SAITO

【目的】根尖性歯周炎の治療に根管内の無菌化が根尖部歯周組織の治療を導くために必要な目標とされている。これまでファイルなどによる機械的清掃のみでは、3 次元的に複雑な構造を有する根管系に生息する病原体を除去するのは困難である事が報告されてきた。そのため近年では、超音波、可聴域振動装置による洗浄液の攪拌、または、Er:YAG レーザーを使用して根管内の洗浄液にエネルギーを与えて機械的に洗浄する Cavitation 技術が注目されている。筆者らは第 152 回日本歯科保存学会春季学術大会において、in vivo 根管バイオフィームモデルを用いた研究により、Er:YAG レーザーを用いた 2 つの洗浄方法、すなわち根管内にファイバーチップを挿入し照射する Laser Activated Irrigation (LAI) と歯冠部にファイバーチップを定位させ照射する Photon-induced Photoacoustic Streaming (PIPS) を模した方法が、同等の根バイオフィーム除去効果を示すことを報告した。そこで本研究は、Er:YAG レーザー照射によって生じる Cavitation 機構を解明するため、根管内で発生する気泡の挙動を明らかにすることとした。

【材料および方法】

(1) 根管模型

単根管模型には、根尖相当部を 80 号、長さ 15mm、02 テーパーを有するエポキシレジン製根管模型を作製し試験に供した。複根管模型は、既製の上顎小臼歯模型 (TrueTooth#5-002, Dental Engineering Laboratories, 米国) を使用し、髓室開拓、根管上部形成、および根管形成まで行った。根管形成にはソフトレシブロック (茂久田商会) の R50 を使用した。

(2) 照射条件

Er:YAG レーザー (アーウィンアドベール Evo、モリタ) に先端が円錐形でコア径 300 μm のファイバーチップ (R300T、モリタ) を装着し、実験に供した。出力条件は 30mJ、20pps、水およびエアの供給は無とした。模型内部は照射前に水で満たした。ファイバーチップは単根管模型では根尖相当部から歯冠側 12mm、複根管模型では PIPS を模し、髓室中央に定位させた。複根管模型ではレーザー照射に伴い、髓室内の水が飛散し減少することから適宜シリンジにて水を追加した。

(3) 撮影条件

ファイバーチップ近傍および根管内の気泡の観察には、高速度ビデオカメラ (FASTCAM Mini AX200、フォトロン) を使用した。単根管模型は、録画速度 40,000fps、録画時間 217ms で主にシングルパルスによる気泡の発生と崩壊を、複根管模型では、録画速度 750fps、録画時間 29s で、経時的な気泡の挙動変化の観察を行った。

【結果】単根管模型において、シングルパルスのレーザーが照射された時刻を $t=0\text{ms}$ とすると、 $t=0$ から 0.6ms にかけてファイバーチップを取り囲むように気泡が発生、発達した後には崩壊した。またファイバーチップ先端の気泡崩壊直後から $t=1.0\text{ms}$ 以内に複数回、根中央部から根尖部にかけて複数の小さな気泡の発生と消失が確認された。複根管模型では経時的に気泡の大きさが発達すること、またそれに伴い根尖方向へ気泡が到達することが観察された。

【考察および結論】本研究の結果より、Er:YAG レーザー照射後、チップ周囲の気泡の崩壊に伴い、根管内の広い範囲で小さな気泡の発生を確認したことから、これらは圧力波によって生じる Cavitation による気泡 (Cavitation bubble) であると推察された。前報のバイオフィーム除去効果を評価した結果と合わせると、この Cavitation bubble の崩壊時に生じる衝撃圧や、経時的にレーザーを照射することにより増加する気泡の移動による機械的外力は、根管内バイオフィームの除去に効果的と推察される。PIPS を模し、髓室内にファイバーチップを定位させて Er:YAG レーザーを照射した場合、複根管を同時に根管洗浄することが可能であり、Cavitation bubble による気泡の移動が洗浄効果を高めていることが示唆された。

PLAP-1 による低酸素誘導因子 HIF の活性制御

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)

○川崎公輔、竹立匡秀、山本智美、森本千晶、平井麻絵、
下村純平、村田真里、河上和馬、沢田啓吾、村上伸也

Regulation of HIF activity by PLAP-1

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Kohsuke Kawasaki, Masahide Takedachi, Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Asae Hirai

Junpei Shimomura, Mari Murata, Kazuma Kawakami, Keigo Sawada, Shinya Murakami

【研究目的】

PLAP-1(Periodontal Ligament Associated Protein-1)は歯根膜に高発現する SLRP (small leucine-rich repeat proteoglycan) の一つであり、BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2)、FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)、TGF- β (Transforming Growth Factor- β 1) の機能を制御することで歯根膜の恒常性維持に寄与している。我々は低酸素環境下で歯根膜細胞 (HPDL) を培養することにより、PLAP-1 の発現が上昇することを見出した。そこで本研究では、低酸素誘導性 PLAP-1 の発現における低酸素誘導因子 HIF (Hypoxia Inducible Factor) の関与を明らかにすることに加え、低酸素誘導性 PLAP-1 が HPDL の低酸素応答に及ぼす影響について検討するため、PLAP-1 が HIF の転写活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1.低酸素誘導性 PLAP-1 の発現における HIF の因子に関する検討

HPDL を HIF1- α 、HIF-2 α 各選択的阻害剤存在下にて、酸素分圧調整が可能な O₂-CO₂ インキュベーターを用いて低酸素環境下 (1%O₂) にて 12 時間培養し、PLAP-1 の mRNA の発現を real-time PCR 法で検討した。

2.PLAP-1 が HIF の転写活性に与える影響の解析

HIF の転写活性を検出するために、HRE (Hypoxia Responsive Element) レポーターアッセイを行った。すなわち、HEK293 細胞に HRE-Luciferase プラスミドを導入し、薬剤耐性による選択培養により、安定発現株 (HEK293 HRE-Luc 細胞) を樹立した。マウス recombinant PLAP-1 の存在、非存在下にて HEK293 HRE-Luc 細胞を低酸素環境下 (1% O₂) で 3 時間培養した後の Luciferase 活性を測定した。一方で、HEK293 HRE-Luc 細胞にヒト PLAP-1 発現ベクターを transient に導入し、同様に低酸素環境下での培養後の Luciferase 活性を測定した。なお、コントロールには EGFP 発現ベクターを導入した。

【結果】

HPDL に低酸素環境下にて 12 時間培養することにより、PLAP-1 mRNA 発現が上昇することが確認され、同上昇は HIF-2 α の選択的阻害剤存在下で有意に抑制された。

また、HEK293 HRE-Luc 細胞を低酸素環境にて培養することにより上昇した Luciferase 活性は、recombinant PLAP-1 存在下にて濃度依存的に抑制された。一方で EGFP 導入と比較し、ヒト PLAP-1 遺伝子の導入により HRE レポーター活性は有意に低下した。

【考察】

HPDL を低酸素環境下で培養した際に、PLAP-1 は HIF-2 依存的にその発現が誘導される一方で、HIF の転写活性を抑制したことから、歯根膜細胞の低酸素応答においてネガティブフィードバック機構を担う分子として役割を担うことが示唆された。

口腔の臨床指標と口腔内細菌叢の関連性評価

¹ 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔統合医療学講座歯周病学分野

² 株式会社サイキンソー

○谷口健太郎¹, 青山典生¹, 藤井利哉¹, 小澤麻理子¹, 竹田 綾², 三辺正人¹

Evaluation of the relationship between oral clinical index and oral microbiota

¹Division of Periodontology, Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University. ²Cykinso, Inc.

○Kentaro Taniguchi¹, Norio Aoyama¹, Toshiya Fujii¹, Mariko Ozawa¹, Aya K. Takeda², Masato Minabe¹

【背景】歯周炎をはじめとする口腔疾患は細菌感染に由来する。近年、細菌検査手法が発達し、詳細な細菌叢の検査が可能となってきた。口腔内細菌叢や腸内細菌叢についても研究が進められており、全身疾患と口腔・腸相関の関連性が着目されている。Periodontal inflamed surface area (PISA) は、炎症のある歯周ポケット面積の総和であり、全身疾患との関連性を示す有用な歯周病指標として有用性が示されている。

【目的】本研究の目的は、PISAをはじめとする口腔の臨床指標と口腔内細菌叢の関連性を評価することである。

【方法】2018年から2020年まで、神奈川歯科大学附属病院・医科歯科連携センターで本研究の被験者を募集した。すべての被験者からは自由意志に基づく書面での同意を取得した。本研究は神奈川歯科大学倫理審査委員会の承認を受けて実施した (No. 553)。口腔臨床検査として歯数の計測などを行い、臨床歯周病指標として PISA を評価した。口腔内細菌叢は、滅菌生理食塩水を 10 秒間含嗽させたものをサンプルとし、次世代シーケンサーをもちいた 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析で評価した。口腔の臨床指標と口腔内細菌叢との関連について分析した。

【結果】合計 155 名の被験者を本研究の対象とした。口腔サンプルの細菌叢の多様性を評価したところ、年齢が上がると多様性の低下が認められ、歯数が多いほど多様性が高いことが明らかになった。歯周病およびう蝕と関連する細菌の多寡別に PISA の比較を行ったところ、う蝕と関連する細菌の有無と PISA との関連は認められなかったのに対し、歯周病と関連する細菌が多い被験者では PISA が高いことが示された。

【考察】本研究で口腔の臨床指標と口腔内細菌叢との関連性評価を行ったところ、予想通り歯周病指標の悪化と歯周病関連細菌との関係が認められた。細菌の多様性は歯数と相関があったが、これは年齢による影響の可能性も考えられる。今後、関連する因子を考慮した解析が必要である。口腔内細菌叢や口腔の臨床指標と腸内細菌叢や全身の臨床指標との関連比較については、今後の検討課題である。また、ある特定の被験者集団に特徴的な口腔あるいは腸内細菌叢の関連性についても調査を進めていきたいと考えている。

歯肉幹細胞 GMSC 由来エクソソームによる CD73 を介した免疫制御機構

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

○渡邊ゆかり、福田隆男、中尾雄紀、林千華子、川上賢太郎、豊田真顕、四本かれん、大和寛明、
讃井彰一、西村英紀

CD73 plays critical role in anti-inflammatory effect by exosomes from human gingiva-derived MSCs

Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Yukari Watanabe, Takao Fukuda, Yuki Nakao, Chikako Hayashi, Kentarou Kawakami, Masaaki Toyoda,
Karen Yotsumoto, Hiroaki Yamato, Terukazu Sanui, Fusanori Nishimura

【目的】

歯肉幹細胞 (GMSCs) は採取が容易であり、優れた免疫制御能を示すことから細胞治療のソースとして有用なうえに、エクソソーム分泌量が多いという特性をもつ。MSC は疾病由来の刺激に応じて、その治療効果が増幅することが報告されている。演者らは GMSCs を TNF- α 刺激することでエクソソームの抗炎症効果が増強されることを確認した。CD73 は幹細胞マーカーであると同時に、炎症を誘導する ATP から抗炎症性のアデノシンへの転換を触媒することで、抗炎症性の M2 マクロファージを誘導する。近年、エクソソームにおける CD73 の発現が報告されつつあるが、GMSCs 由来エクソソームにおいても CD73 の発現を確認した。本研究では、GMSCs への炎症刺激によるエクソソームを介したネガティブフィードバック機構を明らかにするため、CD73 発現誘導およびエクソソーム分泌経路に注目して解析を行った。GMSCs は IFN- α 刺激によっても CD73 発現を誘導したため、TNF- α /IFN- α とともに誘導される転写因子 HIF-1 α に着目した。さらに GMSCs の各刺激由来エクソソームによる M2 マクロファージ誘導能を比較することで、生体における抗炎症効果への影響を検証した。

【材料・方法】

ヒト GMSCs を単離し、同細胞の培養上清から精製したエクソソームを用いて以下の検討を行った。

- ① GMSCs の幹細胞マーカーの発現状況の確認
- ② GMSCs 由来エクソソームの性状評価
- ③ TNF- α /IFN- α 刺激による GMSCs 中の HIF-1 α 発現状況の確認
- ④ TNF- α /IFN- α 刺激による GMSCs 由来エクソソームにおける CD73 発現状況の比較
- ⑤ GMSCs への HIF-1 α 過剰発現 Plasmid および siRNA の導入による CD73 発現変動の確認
- ⑥ GMSCs への TNF- α /IFN- α 刺激によるエクソソーム分泌関連蛋白 (Rab27a/b) 発現状況の確認
- ⑦ PMA 分化マクロファージ様 THP-1 細胞への、各種 GMSCs エクソソーム刺激による炎症性 (M1) / 抗炎症性 (M2) マクロファージマーカー発現状況の比較

【結果及び考察】

GMSCs を TNF- α および IFN- α で刺激すると、CD73 遺伝子発現が有意に亢進した。また GMSCs 由来エクソソーム上の CD73 発現量もこれらのサイトカイン刺激で有意に増強した。ヒトマクロファージ様細胞株 THP-1 に歯肉幹細胞由来エクソソームを作用させると、表現型が M1 マクロファージから M2 マクロファージへ転換した。GMSCs における CD73 誘導の分子機構について検証した結果、TNF- α および IFN- α 刺激で低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の発現誘導を伴う核移行が確認され、HIF-1 α が転写因子として CD73 の発現を制御する可能性が示唆された。そこで、HIF-1 α 過剰発現 plasmid を GMSCs に導入して検討した結果、HIF-1 α の誘導量と比例して CD73 の発現亢進が確認された。一方で、HIF-1 α を siRNA でノックダウンすることで CD73 誘導効果は減弱した。さらに、TNF- α および IFN- α 刺激により、エクソソーム分泌に関わる Rab27a, 27b の発現が亢進するとともに、エクソソーム分泌が促進されることが示された。

以上から、GMSCs 由来エクソソームの抗炎症作用には CD73 が重要であり、転写因子である HIF-1 α の誘導を介してその発現が制御されていることが示された。さらに用いたサイトカイン刺激によりエクソソームの分泌も促進されたことから、治療効果の増強に寄与する可能性が示唆された。

(九州大学医系地区倫理審査委員会承認済：承認番号観察研究：2019-37)

日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子 *Paraoxonase-1* の機能解析

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○ 榎本梨沙、藤原千春、松本昌大、山本優、北垣次郎太、北村正博、村上伸也

Functional Analysis of *Paraoxonase-1*, a genetic risk factor of Japanese Aggressive Periodontitis

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○ Risa Masumoto, Chiharu Fujihara, Masahiro Matsumoto, Yu Yamamoto, Jirouta Kitagaki,
Masahiro Kitamura, Shinya Murakami

【研究目的】

侵襲性歯周炎の特徴の 1 つとして、家族内集積が挙げられることから、その発症や進行には遺伝的因子の関与が示唆されている。我々はこれまでに、日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子 *Paraoxonase-1* (*PON-1*) SNP rs854560 を同定した (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629-2)。また、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) の硬組織形成細胞への分化過程において、*PON-1* の発現量が上昇することを報告した。しかしながら、*PON-1* の歯根膜細胞における機能および、SNP と侵襲性歯周炎の関連については未だ解明に至っていない。そこで我々は、*PON-1* および SNP rs854560 の HPDL における *in vitro* 機能解析を行った。

【材料および方法】

PON-1 特異的阻害剤 2-ヒドロキシキノリン (2-HQ) を、 β -グリセロリン酸 (5 mM) とアスコルビン酸 (50 μ g/ml) を含む石灰化誘導培地に添加し、HPDL を 17 日間培養した。培養 4、12、16 日後にトリパンプルー染色を行い、2-HQ の濃度 (0-100 μ M) が HPDL の生存率に与える影響を確認した。培養 4、12、16 日後に細胞を粉砕回収し、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定を行った。培養 4 日後に RNA を回収し、リアルタイム PCR にて石灰化関連因子の発現解析を行った。また培養 17 日後にアリザリン染色を行い、アリザリン陽性の石灰化ノジュールを定量測定した。次に HPDL に、野生型 *PON-1* 発現ベクター、変異型 *PON-1* (SNP rs854560) 発現ベクター、コントロールベクターをそれぞれ遺伝子導入した後、石灰化誘導培地にて 4 日間培養を行った。培養 2 日後に RNA およびタンパクを回収し、リアルタイム PCR およびウェスタンブロットにて *PON-1* の mRNA 発現およびタンパク発現を確認した。培養 4 日後に細胞を粉砕回収し、ALP 活性を測定した。また同日に RNA を回収し、リアルタイム PCR にて石灰化関連因子の発現解析を行った。

【結果】

トリパンプルー染色の結果、0-100 μ M の 2-HQ は HPDL の生存率に影響を及ぼさなかった。ALP 活性測定の結果、2-HQ は濃度依存的に HPDL の ALP 活性を減少させた。リアルタイム PCR の結果、2-HQ は *ALP* および 1 型コラーゲン (*COL-1*) の mRNA 発現を濃度依存的に減少させた。また、アリザリン染色の結果、2-HQ は HPDL の石灰化ノジュールの形成を濃度依存的に減少させた。リアルタイム PCR およびウェスタンブロットの結果より、野生型 *PON-1* 発現ベクター導入群 (WT) および変異型 *PON-1* 発現ベクター導入群 (mut) において、コントロールベクター導入群 (Ev) と比較して、*PON-1* mRNA 発現およびタンパク発現の上昇を認めた。ALP 活性測定の結果より、Ev と比較し、WT と mut において ALP 活性の上昇を認めた。興味深いことに、mut は WT と比較して ALP 活性のさらなる上昇傾向を認めた。リアルタイム PCR の結果より、Ev と比較し、WT と mut において *ALP* および *COL-1* の mRNA 発現の上昇を認めた。さらに、mut は WT と比較し、*ALP* の発現において上昇傾向を、*COL-1* の有意な発現増加を認めた。

【考察】

PON-1 は HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進することで、歯周組織の恒常性を担うことが明らかとなった。一方、*PON-1* SNP rs854560 は HPDL の過剰な石灰化を誘導することにより、歯周組織の恒常性を破綻させ、侵襲性歯周炎の病態形成に関与する可能性が示唆された。