

機関番号：32650
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2010
課題番号：19592414
研究課題名（和文） 口腔エイジング解析によるリジュヴェネーション

研究課題名（英文） Rejuvenation with oral aging analysis

研究代表者
松坂 賢一（MATSUZAKA KENICHI）
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70266568

研究成果の概要（和文）：加齢に伴う遺伝的な組織の形態学的、機能的な変化は避けることのできない事象であるが、過度の変化を抑えるには環境因子も重要な役割を演じている。本研究の結果から、環境因子をコントロールすることによって過度の加齢変化を制御することが可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Although morphological and functional changes with age cannot be kept away, environment factors play an important role for controlling the excessive changes. This study revealed that excessive changes with age could be regulated using the controlling of environment factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学
キーワード：老年歯科学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における健康推進には、多角的・多面的な研究を集約し臨床応用へ展開することがきわめて重要である。世間では、この数年から十数年にわたって、暦年齢と骨年齢や肌年齢などといった機能的あるいは形態的な年齢との差が注目されている。生理的な老化は進行が穏やかであるが、その過程において病的な要素が加わると、老化が進む（病的な老化）といわれている。従来の医療は病的な老化を治療してきたのに対し、アンチエイジング医療は、この病的な老化を積極的に予防するプラス医療であり、究極の予防医学と考えられる。老化の原因は、ホルモン

低下、酸化ストレス、免疫力低下により、細胞機能が低下することである。従来老化への対応として、栄養指導、運動、ストレスケアなどが主体的予防法であったが、近年新たなアンチエイジングに対応する取り組みが始まっている。口腔機能はこれらのアンチエイジングに密接に関わるだけでなく、特有の防御機構と修復機構を発達させた特異な器官でもある。この機能は口腔のみならず全身へも多大な影響を与えることの知見も示されてきた。近年、アンチエイジングという言葉が流行しているが、「口腔のアンチエイジング」という新しい観点から健康推進に寄与できることを、基礎研究を通して具体的に証明

しEBMにつながる臨床応用への展開をはかることを目標とする。すなわち口腔内の細胞・組織の老化と機能低下のメカニズムを解明し、細胞機能が低下しないような予防措置、または低下している機能を活性化させることを考える。さらに、本研究は一度退行性の器質的変化がみられるような場合には、新しい組織に置き換えるという再生医療を実現させるなどの総合的なアンチエイジング治療を最終目標としている。生理的な状態のみでエイジングが起こっている場合には、ヒトの寿命はおおよそ120歳であるといわれている。アンチエイジングは病的な状態を排除し、質のある一生をおくることが望まれる。口腔組織の老化に伴う研究は、近年さまざまな分野で始められており、歯根膜組織の弾力性の変化を検索したものでは、歯根膜線維の緊張度の観点から定量的に検索し、加齢に伴って弾力がなくなることが報告されている。また、ヒトの唾液腺組織の加齢では、腺房の割合が経年的に減少し、線維性結合組織が増加していることを証明している。その他、歯肉表皮内の免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞のネットワークの変化を検討しているもの (Archives of Oral Biology,2006) も見られる。申請者においても、1994年にヒト下顎骨緻密骨の内部構造について加齢変化を定量的に検索 (Japanese J Oral biology,1994) してきた。以来、骨組織の治癒状態の変化 (Bull Tokyo Dental College, 1997)、骨芽細胞の基質上での動態 (Biomaterials,1999, Clin Oral Implant Res, 2000, J Biomed Mater Res,2003,2004)および、歯根膜組織の変化 (J Periodontal Res,1999, Biomaterials, 2005)について報告してきた。加齢変化に伴う形態学的、細胞学的な研究は近年始まったばかりで、本研究のように詳細、かつ緻密に検索するものはこれまでに存在しない。本研究では形態学的な検索のみならず、細胞分裂の回数券もしくは細胞の寿命を決定していると言われるテロメアについて、口腔諸細胞ごとの短縮状況を検討する。また、フリーラジカルがエイジングを促進しているということが、周知に事実となっているが、ヒト唾液中の抗菌物質の生体防御における重要性を明らかにし、抗菌物質の誘導によるフリーラジカルのコントロールと口腔細菌叢のコントロールを臨床応用可能なレベルに近づけ、歯周組織さらには全身のエイジングの予防を目指す。さらに、一度崩壊した組織を再生させるという再生医療が注目されてきて十数年が経つが、歯科領域でも顎骨や歯周組織、粘膜、唾液腺の再生など様々なものが試みられている。その中でも、組織工学や多分化能を有する細胞の応用も試みられており、特にSP細胞を分離して再生を行う研究が注目されている。SP細胞

を分離するFACSを本学において平成19年度に購入が決定している。全身のエイジングに関して、さまざまな分野で検討されてきており、口腔のエイジングについても近年注目されてきている。しかし、口腔エイジングに関しては、臨床的・疫学的な調査にとどまり、生体を構成している組織、細胞レベルでの検討がほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究は口腔組織・細胞のエイジングを解析することによって、口腔のアンチエイジング、さらには全身のアンチエイジングを実現することを目的とし、口腔の健康維持が全身の健康維持へとつながることを社会的に認識させる。

3. 研究の方法

(1) 口腔組織の年齢差による形態学的検討

歯肉、舌、口蓋粘膜の疾患にて切除された検体における正常部を用いて、免疫組織化学的に検索する。

(2) 口腔内組織における細胞の形態的、機能的年齢差の検討

寿命が2年程度の小動物 (ラット等) を用い、月齢毎のあらゆる口腔内組織の細胞を培養系に移し、エイジングに伴う細胞の性格を把握する。口腔内組織として、口腔粘膜上皮細胞 (歯肉、舌、口蓋、口腔庭) 及び唾液腺房細胞 (耳下腺、顎下腺、舌下腺)、歯根膜細胞、歯髓細胞とする。

加齢に関連する遺伝子をマイクロアレイにより解析する。口腔内細胞のテロメアの加齢に伴う機能変化をパッチクランプおよびFRETイメージングにより解析する。

(3) 口腔内細胞の三次元培養と幹細胞の生体応用

口腔諸組織に順応する材料、ナノあるいはマイクロ構造を決定した組織工学のためのscaffoldを開発する。組織工学による口腔諸組織の再生療法の臨床応用への足がかりを付ける。口腔組織幹細胞による口腔諸組織の再生療法の臨床応用への足がかりを付ける。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔粘膜上皮における抗細菌性タンパクであるβディフェンシン2 (HBD2) の発現について検索した。若齢者からの検体と高齢者からの検体を比較した結果、若齢者の大部分では、口腔粘膜上皮の角質層でのみにHBD2の発現が認められた (図1)。しかし、高齢者の上皮では角質層のみならず棘細胞層内にも発現が観察された。高齢者での口腔粘膜上皮には棘細胞層内での細胞内角化がしばしば認められることから、分化異常によ

り発現に違いが認められ他物と考えられた。この結果から、広義の自然免疫である被覆上皮においても加齢によってその機能が変化することが考えられた。つまり、歯周病治療や歯科インプラント治療を年齢相応の対応が必要であることが示唆された。

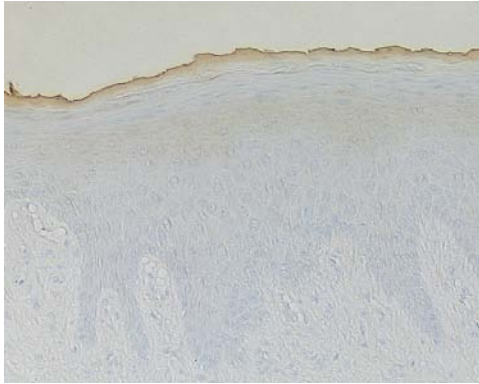


図1 若齢者のβディフェンシン2発現部位

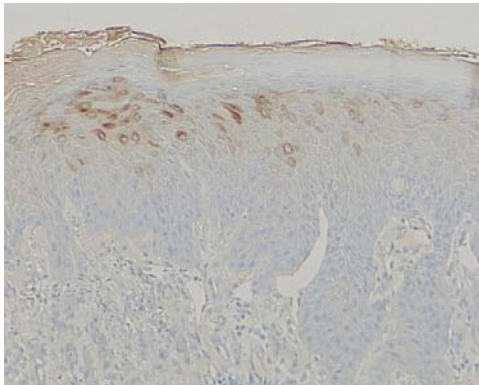


図2 高齢者のβディフェンシン2発現部位

(2)実験動物を使った基礎的な実験によって早期荷重負荷および連結がどのように作用するかを病理組織学・形態計測学的にインプラントの骨接触率を検討した。その結果、早期荷重負荷がオッセオインテグレーションに有効に働くことが明らかとなった。この基礎データにより、エビデンスに基づく咬合の機能回復を可能とすることに意義が見出された。さらに、加齢に伴って顎骨の吸収が著しくなった場合に、遮蔽膜により骨が形成されるスペースを作り、骨形成を有利に進めるGBR法が臨床で用いられている。GBR法で行われたスペース内には免疫組織化学的にCBFA-1陽性細胞、osteocalcin陽性細胞、VEGF陽性細胞に満たされていた。この結果から、GBR法は骨形成が有利に行われることを実験的に証明された。

ラット歯髄細胞を培養し、経時的な変化をRT-PCR法にて検索した。その結果、若いラットの歯髄は老齢ラットの歯髄に比較して、CBFA-1およびDSPmRNAの発現が高く、VEGFおよびHSP-27mRNAの発現は低い値を示した。

これは、障害性刺激に対する防御反応として、若齢者の歯髄は石灰化による防御反応が主体で、高齢になると血管内皮細胞の増殖因子を発現することによって環境を改善およびHSP-27の発現により細胞自ら防御するように働くことが示された。本研究により、歯牙の寿命を延長させるために歯髄保存療法への年齢により考慮する必要があると思われた。

(3)抜歯した際に生体材料であるアテロコラーゲンを填入することによって、顎堤の吸収を抑制できることを形態学および遺伝子学的に証明することができた。この研究によって抜歯後のインプラント治療や補綴治療に有用であることが示唆された。生体の若返りに対して、現在の医療においては生体材料が切っても切り離せないものであることは言うまでもない。生体材料自体の生体細胞への影響を検索はこれまで多数なされているが、材料表面の微細構造における生体細胞制御が可能となれば、より有効な scaffold となる。本研究では骨芽細胞との関係を検索することによって吸収した顎骨の再生に用いる生体材料表面の有効な微細構造の大きさを解明することを目的とした。この結果、3 μm程度の roughness を有する生体材料上での骨芽細胞の機能的に有意な発現がみられた。また、歯の再生が注目されているなか、発育期の歯の萌出メカニズムを解明することによって、将来ヒトの歯の再生が現実化した際に、その応用が過度の発現あるいは腫瘍化しないための基礎的な情報を得ることが可能である。この研究によって歯の発生段階での周囲骨組織の吸収には炎症性サイトカインの影響よりも RANK-RANKL 機序による骨吸収が惹起されていることが解明された。これらの研究から、加齢に伴う顎骨の変化に対応して制御できる可能性が示唆され、発育期の歯槽骨の変化を解明することによって、将来的な再生医療の基礎を築いたと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Matsuzaka, K., Nakajima, .T, Soejima, Y., Kido, H., Matsuura, M., Inoue, T. Effect on the amount of bone-implant contact when splinting immediate-loaded dental implants, *Implant Dentistry*, 査読あり, 16,(3), 309-316, 2007
- ② Tanaka, S., Matsuzaka, K., Sato, D., Inoue, T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration; Analysis of Cbfa-1, osteocalcin, and VEGF expression, *J*

- Oral Implantology, 査読あり, 33(6): 321-326, 2007.
- ③ Matsuzaka, K., Muramatsu, T., Katakukra, A., Ishihara, K., Hashimoto, S., Yoshinari, M., Endo, T., Tazaki, M., Shintani, M., Sato, Y., Inoue, T. Changes in the homeostatic mechanism of dental pulp with age: Expression of CBFA-1, dentin sialoprotein, VEGF and HSP-27 mRNAs, J Endodontics, 査読あり, 34(7): 818-821, 2008
- ④ Nakagawa, E., Matsuzaka, K., Naruse, S., Naito, K., Inoue, T. Effects of nicotine on Malassez' epithelial rest cells in early primary culture: cell proliferation and mRNA expression of heat shock protein 70 and vascular endothelial growth factor. Oral Med Pathol 査読あり, 13, 41-45, 2009
- ⑤ Naito, K., Matsuzaka, K., Ishigami, K., Inoue, T. Mechanical force promotes proliferation and early differentiation of bone marrow derived osteoblast-like cells in vitro. Oral Med Pathol 査読あり, 13, 151-157, 2009
- ⑥ Soumiya, H., Matsuzaka, K., Shibahara, T., Inoue, T. Molecular and morphological analyses of the osteogenic activity of rat cultured periosteum cells in vivo and in vivo, Oral Med Pathol, 査読あり, 14, 19-28, 2009.
- ⑦ Yamawaki, K., Matsuzaka, K., Kokubu, E., Inoue, T. Effects of epidermal growth factor and/or nerve growth factor on Malassez's epithelial rest cells in vitro: mRNA expression of osteopontin, BMP-2 and VEGF, J Periodont Res, 査読あり, 45, 421-427, 2010
- ⑧ Senzui, S., Matsuzaka, K., Fukuhara, F., Shintani, S., Inoue, T. Responses of immature dental pulp under hypoxic conditions in vitro, Oral Med Pathol, 査読あり, 14: 107-111, 2010
- ⑨ Matsuzaka, K., Kokubu, E., Ito, F., Ishida, S., Endoh, T., Katakura, A., Yoshinari, M., Inoue, T. Age-related differences in the expression of heat shock protein 27 by rat periodontal ligament cells in culture, Oral Med Pathol, 査読あり, 14 : 131-134 2010.
- ⑩ Sato, D., Matsuzaka, K., Kokubu, E., Inoue, T. Effect of mechanical loading on cultured osteogenic cells derived from different stages of bone wound healing in rats: experimental models for immediate or early loading implant

models, Oral Med Pathol, 査読あり, 14 : 143-151 2010.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松坂 賢一 (MATSUZAKA KENICHI)
 東京歯科大学・歯学部・准教授
 研究者番号 : 70266568

(2) 研究分担者

吉成 正雄 (YOSHINARI MASAO)
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号 : 10085839
 石原 和幸 (ISHIHARA KAZUYUKI)
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号 : 00212910
 井上 孝 (INOUE TAKASHI)
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号 : 20125008