

令和元年5月30日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11142

研究課題名(和文) アメロゲニンと生体活性ガラスを併用した骨組織再生療法の開発

研究課題名(英文) The development of the hard tissue regeneration therapy which used amelogenin and bio active glass.

研究代表者

松本 典祥 (matsumoto, noriyoshi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80597948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アメロゲニン(AME)を再生促成因子として、また、生体活性ガラス(BAG)を足場として併用することにより、効果的な硬組織再生療法が開発できないか検討するため、動物実験を行った。ラットの頭蓋骨に骨欠損窩洞を形成してそこに試料を埋入し、経時的な硬組織形成の量と状態を評価した。定量解析の結果、AME単独、BAG単独の場合と比較して、AMEとBAGを併用することにより、多くの硬組織形成が認められる傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、組織学的にはAME+BAG群で、術後8週目において窩洞全域にわたって厚い線維性の硬組織像の形成が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生療法の場合においてAMEもBAGもその有用性が報告されており、いくつかの商品が歯科再生療法の現場でも使用されている。しかしながら、これらの材料の作用機序についてはいまだ不明な点も残っており、両者を併用した場合の効果についてもいまだ賛否両論あり、最終的な結論は出ていない。今回、骨誘導因子としてAMEとBAGを応用し、骨髄腔の存在しない頭蓋骨欠損部での実験結果を検討することで、その作用機序について詳しく解析するとともに、両者を併用することで、消失した硬組織のより効率的な再生法の確立を目指している。

研究成果の概要(英文)：Animal experiments were conducted to examine the development of an effective hard tissue regeneration therapy by using amelogenin (AME) as a regeneration promoting factor and bioactive glass (BAG) as a scaffold in combination. A bone defect cavity was formed in the rat skull and a sample was placed there to evaluate the amount and condition of hard tissue formation over time. As a result of quantitative analysis, compared to the AME group and the BAG group, the AME + BAG group tended to show more hard tissue formation, but no significant difference was recognized. Histologically, in the AME + BAG group, a thick fibrous hard tissues were observed throughout the cavity at 8 weeks after surgery.

研究分野：歯内療法学

キーワード：アメロゲニン 生体活性ガラス 骨再生 骨欠損窩洞

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療の分野において様々な分化成長因子やサイトカインの応用が注目されている。歯周組織再生療法においては、エナメルマトリックスタンパクを含有する Emdogain®gel (EMD) が頻用されており、骨吸収が根尖にまで及ぶデヒセンスやクレーター型の骨欠損形態においても良好な結果が報告されている。また、日常の臨床において、自家歯移植術や根尖切除術の際に EMD を応用するといった試みが報告されており、その有用性が示唆されている。また、我々は、ラット根尖性歯周炎モデルを用いた実験を行い、その結果、EMD 貼薬後 14 日目にはセメント質および骨組織の著しい形成が認められ、その際に EMD の応用によって誘導された根尖病変部の治癒においては、TGF- 1 を発現する抗炎症性マクロファージの一時的な増加と持続的 BMP-2 を発現する修復性マクロファージの増加が、根尖部歯周組織創傷治癒のトリガーとなる可能性が推察されると報告した。

アメロゲニン (AME) は EMD の最も豊富な構成物質で、約 90%以上を占め、様々な分子量のタンパク質が会合して存在している。また、最近の研究により、AME はエナメル質の形成のみならず、歯周組織においても生理活性を有していることが明らかとなってきている。

生体活性ガラス (BAG) はハイドロキシアパタイトと同様にリン酸カルシウム系材料の一つである。BAG に関してはすでに生体親和性と硬組織形成促進能が報告されており、歯科領域においても実際にいくつかの製品が市場に出ている。この BAG を骨組織が再生するための足場 (scaffold) として利用し、骨誘導因子である AME と併用することで、より高い骨形成能が得られるものと推察される。

2. 研究の目的

骨再生医療用生の足場材として生体活性ガラスと硬組織再生促進因子としてヒトリコンビナントアメロゲニンを応用した併用療法の効果について検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

10 週例の Wistar 系ラットの頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損窩洞を作製した。その後、ラットを 4 群に分け、窩洞に何も入れないコントロール群、BAG だけを埋入した BAG 群、AME だけを埋入した AME 群、BAG と AME を混入した BAG+AME 群をそれぞれ製作した。術直後、術後 2 週、4 週、8 週でそれぞれの群のラットをマイクロ CT にて撮影し、エックス線学的に検討すると共に、骨欠損窩洞における水平面での硬組織の割合を定量的に解析した。また、通法に従ってパラフィン包埋薄切標本を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソントリクローム染色を行い、組織学的に観察を行った (n 数 = 4)。

4. 研究成果

(1) 定量解析の結果

定量解析の結果、コントロール群では実験期間を通して硬組織形成量の増加は認められなかった。AME 群は経時的に増加傾向を示したが、ほかの群に対して有意差は認められなかった。BAG 群は実験期間を通してコントロール群に対して有意に高い値を示した。また、AME + BAG 群は術後週目と 8 週目に、コントロール群に対して有意に高い値を示した。しかしながら、実験期間を通じて、AME 群、BAG 群、AME+BAG 群間に有意差は見られなかった (図 1)。

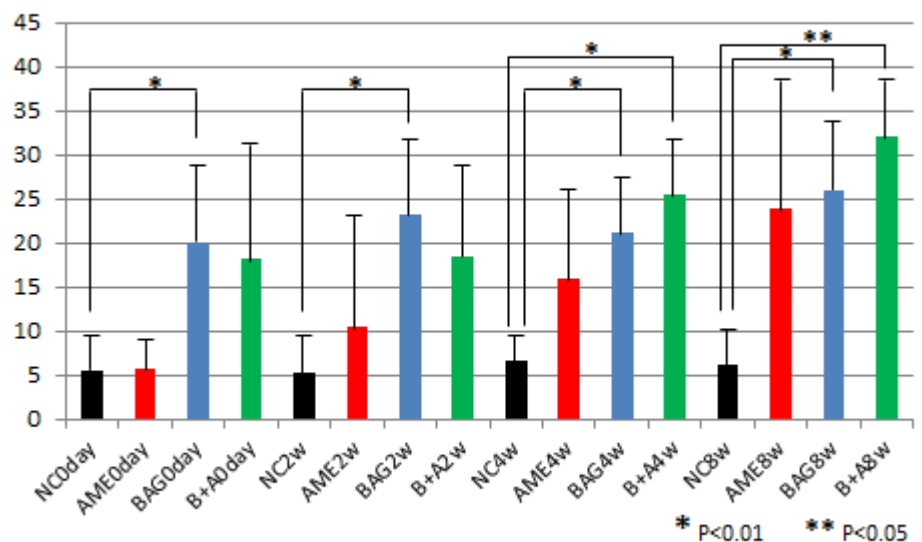


図 1 骨欠損窩洞における硬組織の割合

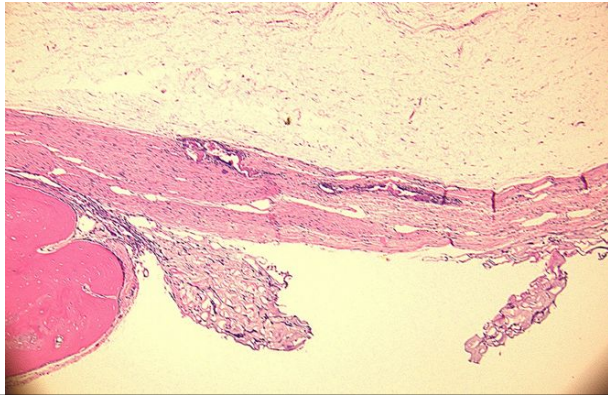


図2 術後8週目コントロール群、HE染色 ×50



図3 術後8週目BAG群、HE染色 ×50

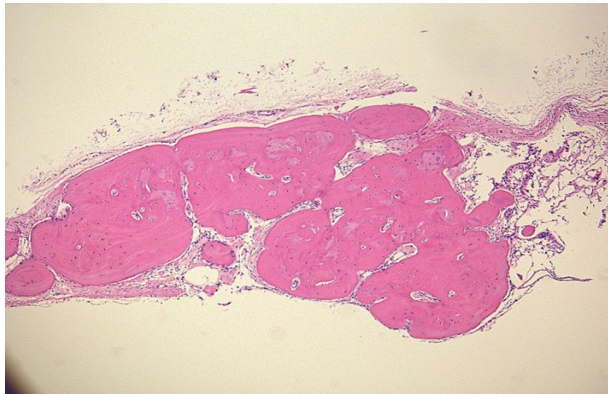


図4 術後8週目AME群、HE染色 ×50

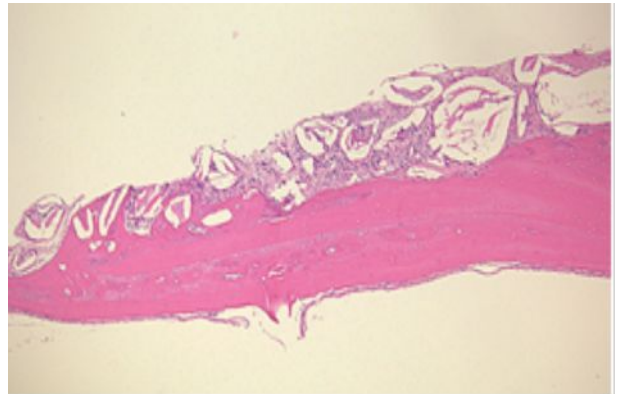


図5 術後8週目BAG+AME群、HE染色 ×50

(2) 組織学的解析

コントロール群は実験期間を通じて、骨欠損窩洞内に硬組織の形成は観察されなかった(図2)。

BAG群では術後4週目からBAG粒子周囲に新生骨と思われる硬組織の形成が観察され、8週目には骨欠損窩洞内に、BAG粒子を取り込んだ硬組織の形成が島状に観察された(図3)。

AME群では術後4週目から骨欠損窩洞内に新生骨と思われる硬組織の形成が観察され、8週目には厚い層板状の硬組織で骨窩洞が満たされた所見も観察された(図4)。

BAG+AME群では同じく術後4週目からBAG粒子周辺に新生骨と思われる硬組織の形成が観察され、8週目にはまだBAG粒子の残存が認められるものの、厚い線維性の硬組織の形成が観察された(図5)。

(3) 考察及び結論

最近の研究により、AMEはエナメル質の形成のみならず、歯小囊の細胞やセメント芽細胞などの歯根/歯周領域の間葉系細胞においても生理活性を有していることが明らかになってきている¹⁾。しかしながら、その作用機序には不明な点も多い。

BAGはハイドロキシアパタイトと同様にリン酸カルシウム系材料の一つである²⁾。これまでBAGに関しては骨補填剤³⁾や人工歯根のコーティング材⁴⁾としての臨床応用の検討がなされており、歯科領域においても実際にいくつかの製品が市場に出ている。このBAGを骨組織が再生するための足場(scaffold)として利用し、骨誘導因子であるAMEと併用することで、より高い骨形成能が得られるのではないかと考え、実験を行った。

定量解析の結果、BAG群は術直後から実験期間を通してコントロール群に対して有意に高い値を示した。BAG粒子は骨と同じ不透過像としてエックス線やマイクロCTに映るため、これが解析結果に反映されたものと考えられる。これに対してAME群はコントロール群と比較して経時的な増加傾向を示したものの、コントロール群に対して有意差は認められなかった。AME群では術後2週目、4週目、8週目ともに計測結果の値にばらつきが大きく、これが統計学的な有意差が得られなかった原因と考えられる。今回は各群の母数が4匹と少ないことに加えて、今回の実験ではAMEを液状で用いたため、窩洞内に試料を長期間留置することが困難であったためと考えられる。

組織像ではAME群、BAG群、BAG+AME群ともに術後4週目で硬組織の形成が認められ、術後8週目においては各群ともに活発な硬組織の形成が観察された。AME群では骨欠損窩洞内に多量の層板状の硬組織の形成が認められ、BAG群ではBAG粒子を取り込んだ島状の硬組織が観察された。しかしながらこれらの硬組織は、その構造から物理的な脆弱性が心配される。これに対

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

して、BAG+AME 群では、まだ BAG 粒子の残存は認められるものの、基底膜に沿って厚い線維性の硬組織の形成が認められた。

一方、骨補填剤と骨誘導因子を併用した再生療法の有用性については現在までに多くの報告がなされている^{5,6)}。このような併用療法に懐疑的な報告⁷⁾もあるが、肯定的な報告もあり、結論は出されていない。歯周組織再生療法の場合には AME をその主成分とするエナメルマトリックスデリバティブ(EMD)が広く用いられているが、この EMD と BAG を併用することで BAG 周囲の粒子周囲の石灰化を促進するだけでなく、歯根膜と結合した新生セメント質の形成をもたらしたとする報告もある⁸⁾。

また、我々は同様の実験系を用いて、細胞膜リン脂質であるホスファチジルセリンを含有する PS リポソーム (PSL) を再生促成因子として用い、BAG を足場として用いた実験を行った。その結果、PSL と BAG を併用することにより骨欠損窩洞の骨形成が促進される可能性が示唆されたことを報告した⁹⁾。

以上の点と今回の実験結果より、AME は骨髄腔の少ない頭蓋骨においても骨再生能がある可能性が示唆された。また、足場として BAG を併用した治療法が有効である可能性が示唆された。今後は各種骨形成促進因子の発現に焦点を当てて AME と BAG の併用による骨組織形成能についての評価を進めるとともに、AME の受容体の一つとしてリソソーム関連膜タンパク質-1 (LAMP-1) の発現に注目してその作用機序について解析を続けていく予定である。

<引用文献>

1) Kotaro Tanimoto, Ryo Kunimatsu, Yuki Tanne, Yu-Ching Huang, Masahiko Michida, Yuki Yoshimi, Mutsumi Miyauchi, Takashi Takata, Kazuo Tanne, Differential Effects of Amelogenin on Mineralization of Cementoblasts and Periodontal Ligament Cells. J Periodontol, 83, 2012, 672 - 679.

2) Hench, L. L., Splinter, R. J., et al, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res Symp, 2(1), 1971, 117-141.

3) 水沼 一昭、清水 義信、古澤 利武、高橋 常男、高橋 和人、骨補填材料としての吸収性生体活性ガラスの有効性について、日本口腔インプラント学会誌、12 巻、1999、213 - 219。

4) 山野目 聡之、山森 徹雄、塩山 司、細川 貢、笹嶋 泉、島崎 伸子、工藤 淳一、梶村 幸市、小笠原 綾子、阿部 修作、堀井 義晴、石橋 寛二、生体活性ガラスを用いたインプラント周囲骨の経時的観察、日本補綴歯科学会雑誌、37 巻、1993、635 - 640。

5) McClain PK, Schallhorn RG, The use of combined periodontal regenerative techniques. J Periodontol, 70, 1999, 102-104.

6) Boyan BD, Weesner TC, Lohmann CH, et al, Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. J Periodontol, 71, 2000, 1278-86.

7) Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, et al, Effects of enamel matrix derivative on bioactive glass in rat calvarium defects. J Oral Implantol 36, 2010, 195-204.

8) Sculean A, Windisch P, Keglevich T, et al, Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. Int J Periodontal Restorative Dent, 25, 2005, 139-147.

9) 松本 典祥、中山 英明、二階堂 美咲、畠山 純子、水上 正彦、松崎 英津子、泉 利雄、阿南 壽、PS リポソームと生体活性ガラスの併用がラット頭蓋骨欠損部に及ぼす骨形成促進効果の解明、日本外傷歯学会雑誌、査読有、第 11 巻、2015、55 - 60。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松本 典祥、中山 英明、二階堂 美咲、畠山 純子、水上 正彦、松崎 英津子、泉 利雄、阿南 壽、PS リポソームと生体活性ガラスの併用がラット頭蓋骨欠損部に及ぼす骨形成促進効果の解明、日本外傷歯学会雑誌、査読有、第 11 巻、2015、55 - 60。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

〔学会発表〕(計 2件)

松本 典祥、畠山 純子、中山 英明、二階堂 美咲、水上 正彦、松崎 英津子、泉 利雄、阿南 壽、ラット頭蓋骨欠損における生体活性ガラスとPSリボソームの影響、日本外傷歯学会、2016。

松本典祥、阿南 壽、畠山純子、二階堂美咲、中山英明、牛尾悟志、水上正彦、松崎英津子、泉 利雄、生体活性ガラスとPSリボソームの併用による骨再生療法の開発、日本歯内療法学会、2018。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：畠山 純子

ローマ字氏名：Hatakeyama Junko

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：医員

研究者番号(8桁)：50374947

研究分担者氏名：阿南 壽

ローマ字氏名：Anan Hisashi

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80158732

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。