

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17092

研究課題名(和文)重度歯周病治療のための線維芽細胞増殖因子担持担体の歯周組織再生のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of periodontal tissue regeneration of fibroblast growth factor carriers for the treatment of severe periodontal disease.

研究代表者

小林 信博 (Kobayashi, Nobuhiro)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90803338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回、ヘパリンを用いて多孔質 TCP上に線維芽細胞成長因子(bFGF)を固定化することに成功し、このbFGF担体骨によるイヌ下顎骨欠損モデルの回復初期(術後2週間)の形成・リモデリング誘導能を評価した。ヘパリンを用いてポーラス TCP上にbFGFを固定化し、このbFGFキャリアが歯周再生に及ぼす影響をイヌの2壁性歯周欠損モデルで評価することを目指した。その結果、固定化 TCPの移植により、歯槽骨と歯根膜の治癒が強く促進されることが示された。さらに、固定化 TCP足場は、アンキローシスや歯根吸収などの異常な治癒過程を一貫して抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本複合材はティッシュエンジニアリングの3要素のうち足場とシグナル因子の2要素に加え、そのシグナル因子を担持する生体機能性を兼ね備えているため自家骨移植や細胞移植に代わる骨の再生医療材料となりうる。本材料が実用化すれば、ヘパリンはbFGFだけでなく他のサイトカインとも親和性が高いことが知られており、サイトカインを用いた歯周組織再生治療の発展にも大きな貢献が期待できる。本研究の遂行により、迅速な治療や優れた骨増生が可能となれば、インプラント治療の適応範囲が大幅に広がり高齢化社会の質的向上に対し極めて大きな貢献が出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we successfully immobilized bFGF on porous TCP using heparin and evaluated the ability of this bFGF carrier bone to induce formation and remodeling in the early stages of recovery (2 weeks after surgery) in a canine mandibular bone defect model. Then we aimed to immobilize bFGF on porous TCP using heparin and evaluated the effect of this bFGF carrier on periodontal regeneration in a canine model of 2-wall periodontal defect. The results showed that healing of the alveolar bone and periodontal attachment was strongly promoted by modified TCP implantation. In addition, the modified TCP scaffold consistently suppressed aberrant healing processes such as ankylosis and root resorption. One important factor to note is that we used a surgically created model of periodontal defect, which might show higher healing potential than a clinically encountered defect.

研究分野：再生歯学

キーワード：ティッシュエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎え現在我が国における歯周病患者は 9000 万人と推定され、その中でも重症歯周病患者は約 800 万人ともいわれている(厚生労働省医政局歯科保険課:平成 17 年度歯科疾患実態調査)。しかし、重症患者に対しては治療を断念し、抜歯することも多い。また、エムドゲインや GBR 治療も行なわれるが決定的な方法とは言い難い。画期的な骨再生材料を開発し、迅速かつ確実な歯槽骨再生を可能にすれば、高齢社会の質的向上へ大きく寄与できる。

線維芽細胞成長因子(bFGF)は我が国で褥瘡・皮膚潰瘍治療剤(フィブラストスプレー)としてすでに臨床応用がされている細胞増殖因子である。この bFGF は血管新生作用および線維芽細胞増殖促進作用を有し、新生血管に富んだ良性肉芽を形成するため、創傷治癒を促進させると同時に骨再生を促進する効果がある。一方、生体において肝臓で生成される生体内物質のヘパリンは bFGF との親和性に優れ、その存在下で bFGF の生理活性化を促進することが知られている。

一方で、成長因子のみでは、スペースメイキングの効果が無く、足場材料との組合せが有効だと考える。リン酸三カルシウム(TCP)は生体親和性の高い合成アパタイトセラミックスで、ハイドロキシアパタイト(HA)と同様に優れた骨伝導能を有するため我が国では整形外科領域で 10 年以上前から臨床応用が行われてきた。また、ハイドロキシアパタイトに比較して生体吸収性が高く、骨へと置換することが明らかとなっている。申請者は、TCP 多孔質体に化学的に bFGF を結合させ、イヌ下顎骨骨欠損モデルに移植したところ早期に骨再生が促進されたことを報告している。さらに、最近、歯根膜細胞や新生セメント質の再生にも有効であることがわかってきた。本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、薬物担持担体である bFGF/TCP 多孔質体が、どのようなメカニズムでリモデリングし、歯槽骨を含めた歯周組織再生を促進するかである。同時に非吸収性の HA 多孔質体を対照群としてその挙動の違いについても解明したい。

2. 研究の目的

本複合材はティッシュエンジニアリングの 3 要素のうち足場とシグナル因子の 2 要素に加え、そのシグナル因子を担持する生体機能性を兼ね備えているため自家骨移植や細胞移植に代わる骨の再生医療材料となりうる。本材料が実用化すれば、ヘパリンは bFGF だけでなく他のサイトカインとも親和性が高いことが知られており、サイトカインを用いた歯周組織再生治療の発展にも大きな貢献が期待できる。本研究の遂行により、迅速な治療や優れた骨増生が可能となれば、インプラント治療の適応範囲が大幅に広がり高齢化社会の質的向上に対し極めて大きな貢献が出来ると考えられる。

3. 研究の方法

ヘパリンを海洋性ペプチドによって TCP 多孔質体に化学的に結合した薬物徐放担体の作製

βTCP 多孔質体を用いた。接着性ペプチドは、Fmoc 固相合成法により作成した。海洋性接着タンパク質の活性配列である Ala-Lys-Pro-Thr-Tyr-Lys を選択し、末端にはシステイン残基を導入する。一方、分子量の異なるヘパリンに対して、カルボニルジイミダゾール活性化を施し、マレイミド残基を導入した。得られたマレイミド化ヘパリンと、海洋性ペプチドとを結合させることで、固相反応性ヘパリン誘導体を合成した。これらのヘパリン誘導体を用いて、所定濃度にて TCP 多孔質体と反応させ、ヘパリン固定化薬物徐放性骨再生材料を作製する。その後、所定濃度所定量の bFGF とインキュベートすることで、薬物担持性骨再生材料への bFGF の固定化を行った。

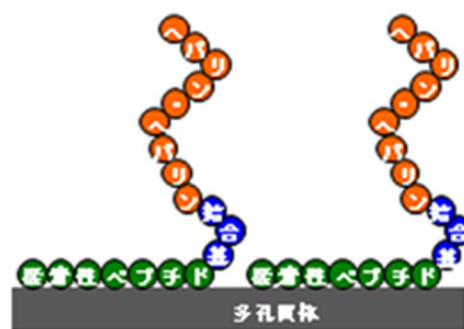


図. ヘパリン結合薬物担持担体

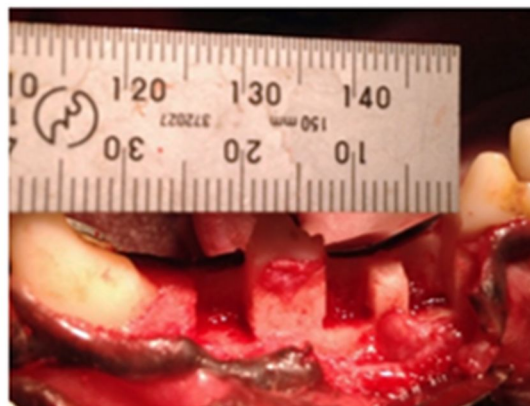
ヒト歯根膜細胞(hPDL)を用いた bFGF 薬物徐放担体の分子生物学的評価

細胞適合性の測定には、歯周組織に存在するヒト歯根膜細胞とヒト間葉系幹細胞を用いる。hPDL ならびに hMSC を細胞培養プレートに播種し bFGF/薬物担持性骨再生材料群および bFGF/TCP 多孔質体のみ群とともに骨分化誘導培地中で一定期間培養する。骨芽細胞分化の評価としてリアルタイム PCR 法を用いて型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2 の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行った。

イヌ顎骨欠損モデルおよび歯周病モデルの確立と移植実験

本申請内容である根治療法としての歯周組織再生療法を目的として移植実験としてのイヌを

用いた動物実験のモデルを確立し、移植実験を行なった。国立循環器病センターで作製された修飾多孔質体を評価するための、イヌ顎骨欠損モデルならびにイヌ歯周疾患モデルの構築を進めた。まず、イヌ顎骨欠損モデルにおいては、ビーグル犬（雌、2歳）を用いて、麻酔奏効後に下顎小白歯を抜去し、8週の治癒を経過後、インプラントドリルを用いて骨窩洞（直径4.5 mm、深さ6 mm）を3ヶ所形成する。実験群には β -TCP/ヘパリン/FGF-2複合体、対照群には-TCP /ヘパリン複合体を骨窩洞に填入し閉鎖創とする。術後4, 8週に各2匹を安楽死させ、10%中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行い下顎骨を摘出。実験部位をマイクロCTで撮影し骨のパラメーター解析を行なった。



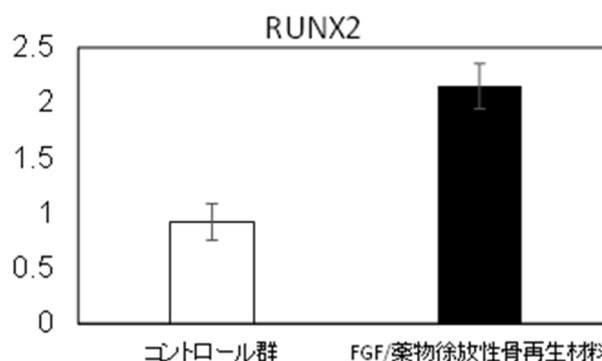
図・イヌ歯周疾患モデル

4. 研究成果

ヘパリンを海洋性ペプチドによってTCP多孔質体に化学的に結合した薬物徐放担体の作製
 β TCP多孔質体のヘパリン処理が達成されているかを評価するため、X線光電子分光(ESCA)により処理後の多孔質体表面の元素組成評価を行った。ペプチド処理に伴うN1sの増加、ヘパリン処理に伴うS2sの増加が確認され、適切な処理が達成されていることがわかった。

ヒト歯根膜細胞(hPDL)を用いたbFGF薬物徐放担体の分子生物学的評価

骨芽細胞分化の評価とアルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの定量を行ったところ間葉系幹細胞の2週間の培養後、bFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群に比較して有意に高い値を示した。また、リアルタイムPCR法を用いて型コラーゲン、オステオカルシン、RUNX2の発現を評価し、両群の骨芽細胞分化マーカー発現の定量比較を行なった。3日間の培養後、RUNX2の発現がFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群に比較して有意に高い値を示した。歯根膜細胞についてはセメント質分化マーカーとしてペリオスチン等の発現について両群を定量比較したところ、3, 7, 14日後のいずれもbFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群に比較して有意に高い値を示した。



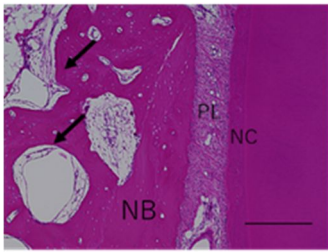
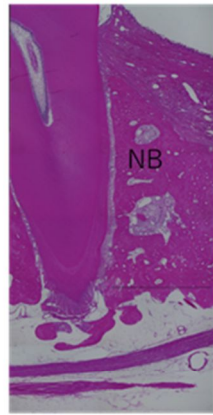
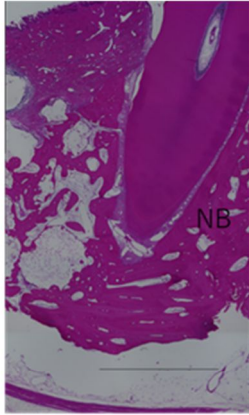
図・間葉系幹細胞のrunx2発現比較

間葉系幹細胞の骨芽細胞発現マーカーならびに歯根膜細胞のセメント質分化マーカーの発現がbFGF/薬物徐放性骨再生材料群でコントロール群に比較して高い発現を示した。このことは、bFGF/薬物徐放性骨再生材料群でbFGFがヘパリンと複合体を形成することによって生理活性の高い構造が保持されていたことから、骨芽細胞分化や歯根膜細胞分化を促進したと考えられる。

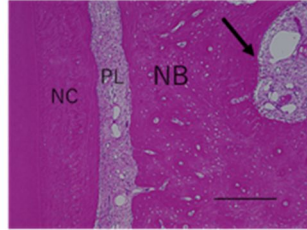
イヌ顎骨欠損モデルおよび歯周病モデルの確立と移植実験

ビーグル犬の下顎骨に二壁性骨欠損を形成し、実験群は β -TCP/ヘパリン/FGF-2複合体、対照群には-TCP /ヘパリン複合体を填入した。術後8週に安楽死させ、HE染色による組織学的評価を行った。対照群では周囲の新生骨、新生セメント質の形成が認められた。しかし、-TCPは残存し、シャープリー線維を伴った歯根膜はわずかに認められただけであった。これは、bFGFを搭載したヘパリン化TCP多孔質体に比較して歯周組織再生は劣るという結果になった。一方で、実験群は、-TCPの残存は認められたものの大部分が吸収し、ハバース構造を含む新生骨が認められた。また、新生セメント質とシャープリー線維を含む歯根膜の形成も認められた。このことは、イヌ下顎骨二壁性骨欠損モデルにおいて、bFGFを搭載しないヘパリン化-TCP多孔質体は歯周組織再生を促すことが示唆された。成長因子を用いないことで、生物学的危険性が低くなり、実用化へ向けた可能性が高まった。

現在、物理的強度を有しながら多孔性構造を有する骨補填材の原材料をバイオミミックリーの観点から検索し、サンゴ外骨格に注目した。海水温上昇により世界的なサンゴの死滅が危惧される自然環境への配慮から、陸上で完全養殖された自然界のサンゴが死滅する高い海水温の環境下でさえ生育できる、新種の耐熱性サンゴの外骨格を入手し、骨補填材の開発を進めている。



α TCP



β TCP

図 移植 8 週後の HE 染色による組織学的評価 (左) 対照群 (右) 実験群。矢印; 残存 α -TCP、 β -TCP、NB; 新生骨、NC; 新生セメント質、PL; 歯根膜細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matuda Yoshifumi, Okamura Tomoharu, Tabata Hazime, Yasui Kenichiro, Tatsumura Masayasu, Kobayashi Nobuhiro, Nishikawa Tetsunari, Hashimoto Yoshiya	4. 巻 28
2. 論文標題 Periodontal Regeneration Using Cultured Coral Scaffolds in Class II Furcation Defects in Dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.28.329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------