

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17152

研究課題名（和文）多機能性を持ったGBRメンブレンの実験的研究

研究課題名（英文）Development of multi-functionalized GBR membrane

研究代表者

篠原 綾乃（SHINOHARA, Ayano）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：10749394

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）：インプラント治療では、欠損部における歯槽骨の高さや幅の不足は、インプラント適応の可否のみならず、インプラントの予後や審美性の回復を損ねる要因となる。そこで本研究では骨増生に用いるメンブレンに骨再生促進、軟組織治癒促進、抗菌性を付与することを目的とした。ラクトフェリンおよび亜鉛イオンを添加することで、歯肉線維芽細胞増殖およびコラーゲン遺伝子発現の向上が示された。さらに、酸化ストレスからの回復やアポトーシスの抑制も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟組織治癒促進が認められた。以前より報告のある骨形成促進、抗菌性ととも、GBRメンブレンに多機能性をもたらす可能性が示された。ラクトフェリンは牛乳や母乳、唾液や涙にも含まれているものであり、またサプリメントとしても市販されているものである。実際に臨床応用を検討する際には、薬剤やFGF等の成長因子と比較して、安全性や経済性についても優位であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to development a GBR membrane for enhancing the bone formation and wound repair. We confirmed that the combinational use of lactoferrin and zinc ion enhances the proliferation and collagen gene expression on human gingival fibroblast, and recovers from the H2O2-induced oxidative damage and reduces apoptosis.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：ラクトフェリン アポトーシス 酸化ストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

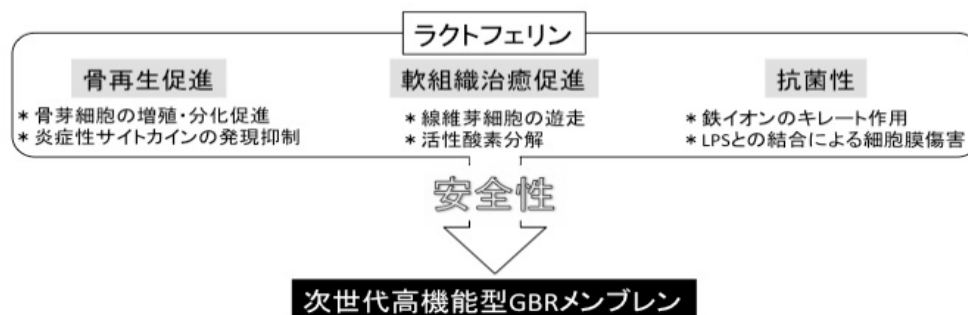
近年、歯牙欠損部に対して、咀嚼機能および審美性の回復のために、インプラント治療は有効な歯牙欠損補綴の一手段となっている。しかしながら、欠損部における歯槽骨の高さや幅の不足は、インプラント適応の可否のみならず、インプラントの予後、審美性の回復を損ねる要因となる。このような背景から、歯槽骨の再生はインプラント治療の適応拡大において重要な意義を有する。

GBR 法は 1982 年に Nyman らによって発表された、バリアメンブレンを用いて歯周組織の回復を図る GTR (Guided Tissue Regeneration) 法がもととなり、その後骨組織の再生へと応用された。本法の基本的概念としては結合組織を排除し骨再生スペースを確保することにある。現在、臨床にて使用されているメンブレンには非吸収性のポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、吸収性のコラーゲンメンブレン、生体分解性ポリマー (PLA, PLGA) などが挙げられる。ブロック骨移植と比較して侵襲が小さくインプラント埋入と同時に使用できるという利点がある一方で、循環の遮断や細胞接着性の悪さから、哆開し感染を起こすことがある。通常、膜の形態維持のために粉砕した自家骨もしくは骨補填材を併用することが多く、感染は哆開部分にとどまらず処置部位全体に波及する。さらに骨新生までの待時間期間は長く自家骨を併用した場合で 4~6 ヶ月、人工骨補填材を併用した場合にはそれ以上の治療期間が必要である。

ラクトフェリン (LF) はアミノ酸分子量 83,000 残基からなる鉄結合性のタンパクであり (Kanyshkova *et al.* Biochemistry 2001)、強力な抗菌活性を持つことが知られている。さらに、骨芽細胞の増殖や分化を促進するとともに (Cornish J. *et al.* Biometals. 2004)、炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) の発現抑制により (Yamano *et al.* Laboratory Investigation. 2010) 破骨細胞の分化・誘導を抑制すること、また線維芽細胞の遊走を促進し、コラーゲンの産生を促進することもわかってきた。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに GBR 法を行う上で問題点とされてきた、長い待機期間、その間に起こる軟組織の哆開と感染という 3 点を一度に解決する、機能性を携えた次世代の GBR メンブレンを創製し、その有効性を検討しようとするものである。



3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞増殖率の測定

96well プレート上に試料を設置し、5000 個のヒト歯肉線維芽細胞 (hGF, ACTT) を播種した (n=5)。LF および Zn²⁺ を段階的に培地に添加し、24、48、72 時間後の細胞数を MTS アッセイ (CellTiter96 One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) にて測定し比較した。

(2) 酸化ストレスモデルの作成

H2O2 による酸化ストレスを段階的に hGF に作用させ (30 分間)、細胞生存率を測定し、酸化ストレスモデルを作製した。

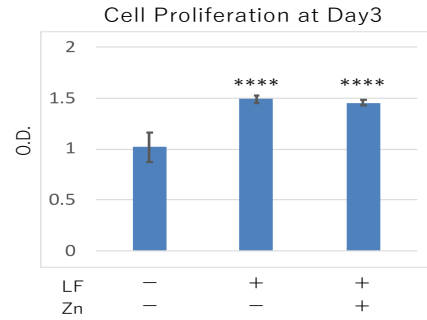
(3) 線維芽細胞の遺伝子発現の比較

細胞播種後、1、3、7、14 日後にコラーゲンおよび抗酸化の遺伝子発現およびアポトーシス関連遺伝子を rt-PCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞増殖率の測定

LF と添加することで hGF の細胞増殖率は向上した。また、Zn²⁺ を添加してもさらなる上昇は認められなかった。(図 1) 本研究の条件下では、Zn²⁺ よりも LF の方が細胞増殖率に影響を与えることが示唆された。



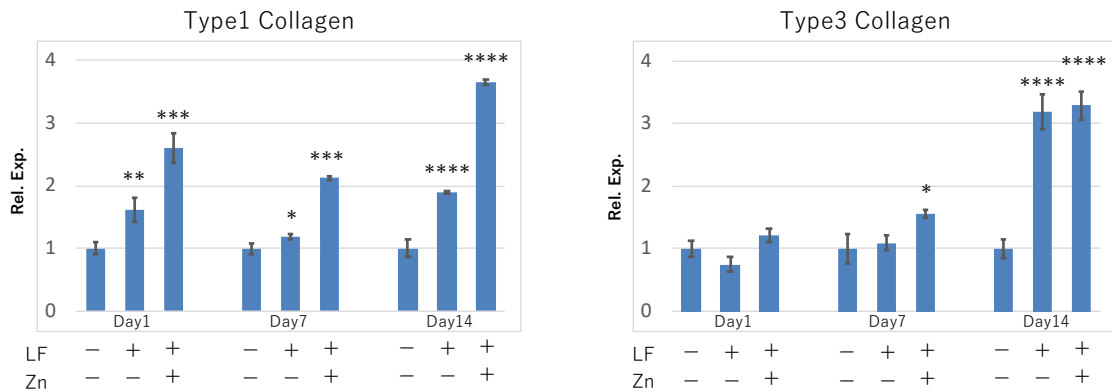
【図 1】細胞増殖試験

(2) 酸化ストレスモデルの作成

800μM 以上の濃度の H₂O₂ を作用させることで、細胞生存率に有意差を認めた。この結果から、ある一定濃度以上ではアポトーシスを誘導することが示された。

(3) 線維芽細胞の遺伝子発現の比較

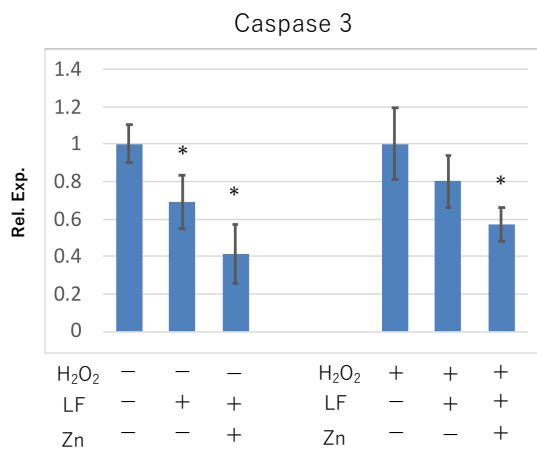
細胞培養培地に LF を添加することでコラーゲン遺伝子発現の向上が認められた。さらに Zn²⁺ を添加することで、その効果は増強した。(図 2)



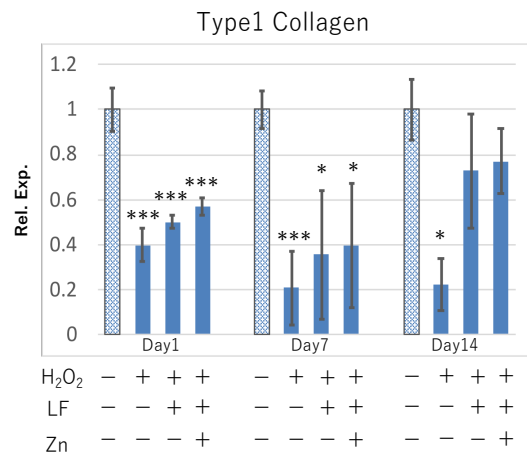
【図 2】コラーゲン遺伝子発現

アポトーシスの指標となる Caspase3 遺伝子発現の抑制をみとめた。さらに Zn²⁺ を添加することで、その効果は増強した。(図 3) また、酸化ストレスを与えた細胞でも同様の効果が認められた。

酸化ストレスを与えると、コラーゲン遺伝子発現の抑制が認められた。これは、14 日後でも回復が認められなかった。(図 4) しかしながら、LF または LF+Zn²⁺ を培地に添加することで、次第に回復し、14 日後では酸化ストレスを与えていないコントロールと同等のレベルまで回復した。



【図 3】Caspase3 遺伝子発現



【図 4】コラーゲン遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------