

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791612

研究課題名（和文）脳由来神経栄養因子を用いた歯周組織再生療法の臨床応用に関する研究

研究課題名（英文）Study of periodontal tissue regenerative therapy using Brain-derived neurotrophic factor

研究代表者

長谷川 直彦 (Hasegawa Naohiko)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10346512

研究成果の概要：本研究では脳由来神経栄養因子（BDNF）の組織再生誘導能を十分に引き出す歯周組織再生療法を確立することを目的として、歯周組織再生過程の解明と適切なキャリアーの選択について検討した。その結果、BDNFは投与後早期に歯周靭帯細胞の増殖・分化を制御し歯周組織再生を誘導することが明らかとなり、キャリアー（担体）として高分子ヒアルロンが歯周組織再生療法の臨床応用に有用であることが示唆された。また歯槽骨再生促進因子としての $\beta$ -TCP併用により多様な歯周組織欠損に対応できることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

新たな歯周組織再生療法を開発するために、様々な増殖因子の研究が行われている。しかしながら複雑で多様な歯周組織欠損においては、増殖因子の組織再生誘導能を十分に引き出すドラッグデリバリーシステムの確立が不可欠であり、そのためには詳細な歯周組織再生過程の解明と適切なキャリアー（担体）の選択と条件設定が重要となってくる。

私たちは、歯周組織再生療法の増殖因子として神経栄養因子の1つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) に着目し、研究を行っている。in vitro では BDNF が上皮細

胞増殖に影響せず、歯周靭帯線維芽細胞の増殖を促進するとともに、骨関連タンパク質発現を促進することを報告した。また、in vivo で BDNF をアテロコラーゲンとともにビーグル犬の実験的歯周組織欠損に填入するとセメント質の再生を伴う歯周組織再生が誘導されることを示した。

BDNF のような増殖因子を主体とした歯周組織再生療法を考える場合、キャリアーは、生体内で生物活性を保持した増殖因子を一定期間、徐放化する性質を持つことが必要であり、生体親和性と吸収性に優れる材料が適していると考えられる。さらに BDNF によって内在性細胞を再生させたい場所へ遊走し、増殖・分

化させると同時に、歯周組織欠損において、適当な“足場”としての機能する必要がある。

また、歯周組織欠損の大部分を占める歯槽骨欠損においてはキャリアー自体も効率的に骨再生を誘導できる性質を具備するものが望ましい。

## 2. 研究の目的

本研究ではBDNFの組織再生誘導能を十分に引き出す歯周組織再生療法を確立することを目的として以下の検討を行った。

- (1) BDNF/アテロコラーゲン複合体を歯周組織欠損に填入した後の歯周組織再生過程を解明する。
- (2) BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体を歯周組織欠損に填入した後の歯周組織再生を評価する。
- (3) 歯槽骨再生促進因子としての $\beta$ -三リン酸カルシウム( $\beta$ -TCP)の併用効果を検討するためにBDNF/高分子ヒアルロン酸/ $\beta$ -TCP複合体を歯周組織欠損に填入した後の歯周組織再生を評価する。

## 3. 研究の方法

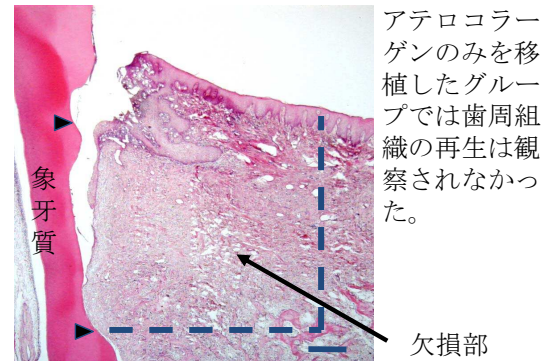
- (1) BDNF をアテロコラーゲンとともにビーグル犬の実験的歯周炎を惹起した3壁性歯周組織欠損に BDNF/アテロコラーゲン複合体を填入した。填入後1、2、4週間後、組織標本を作製し、組織計測および免疫組織学的検討を行った。免疫染色の抗体には proliferating cell nuclear antigene(PCNA)、osteopontin(OPN)に対する抗体を用いた。
- (2) ビーグル犬の実験的歯周炎を惹起したⅢ級根分岐部歯周組織欠損に BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体を填入した。コントロール群として高分子ヒアルロン酸のみを填入した。6週間後、組織標本を作製し、光学顕微鏡下にて組織観察を行った。
- (3) 歯槽骨再生促進因子としての $\beta$ -三リン酸カルシウム( $\beta$ -TCP)の併用効果の検討するために BDNF/高分子ヒアルロン酸/ $\beta$ -TCP複合体をを填入した。6週間後、組織標本を作製し、光学顕微鏡下にて組織観察を行った。

## 4. 研究成果

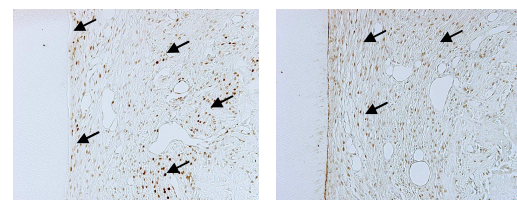
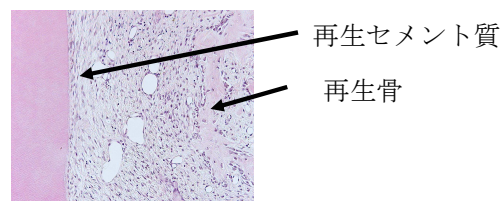
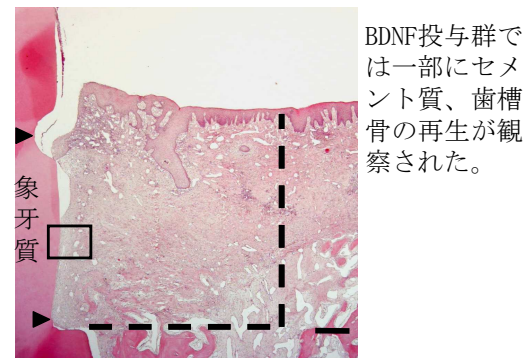
- (1) BDNF/アテロコラーゲン複合体を填入後、1、2週間目では、欠損部では歯周組織の再生はほとんど観察されなかった。抗 PCNA 抗体、抗 OPN 抗体を用いた免疫染色では、根面近くの細胞が PCNA、OPN 陽性を示した。また結合組織中に PCNA 陽性細胞が多く観察された。

4週間後、欠損部はセメント質の再生を伴う歯周組織の再生が観察された。組織計測の結果、コントロール群に比べ、BDNF投与群はセメント質再生率、骨再生率ともに有意に高い値を示した。

これらのことからBDNFが投与後早期に歯周靭帯細胞の増殖・分化を制御したことで歯周靭帯、セメント質、歯槽骨の再生を伴う歯周組織再生が生じることが明らかになった。

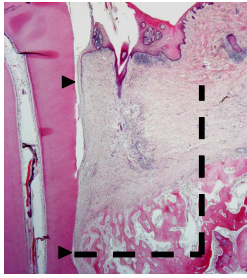


BDNF 2週間後

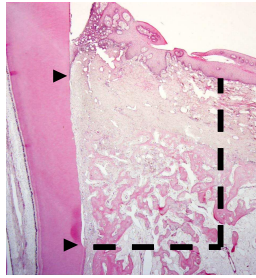


根面近くの細胞にOPN、PCNA陽性細胞(矢印)が、結合組織中にPCNA陽性細胞が観察される。

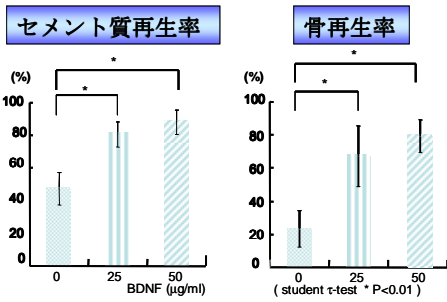
コントロール群  
4週間後



BDNF投与群 4週間後



BDNF投与群では 再生骨、再生セメント質を伴う歯周組織の再生が観察された。



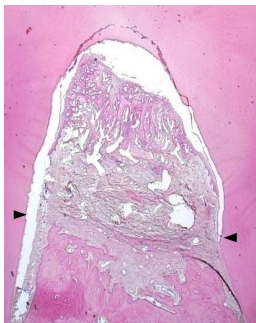
4週間後の組織計測

(2)

BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群では、象牙質表面の大部分で新生セメント質が観察され、欠損の半分程度までの歯槽骨の再生と歯周靭帯の再生が認められた。

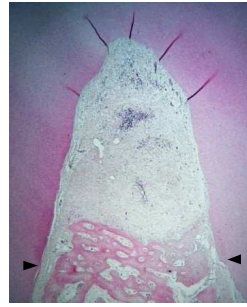
コントロール群では、根分岐部直下に上皮侵入がみられる標本が多く、歯周組織の再生もほとんど観察されなかった。

ヒアルロン酸のみ 6週間後

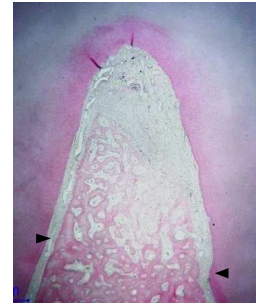


ヒアルロン酸のみを移植したグループでは歯周組織の再生は観察されなかった。

BDNF/ヒアルロン酸  
5mg/ml 6週間後

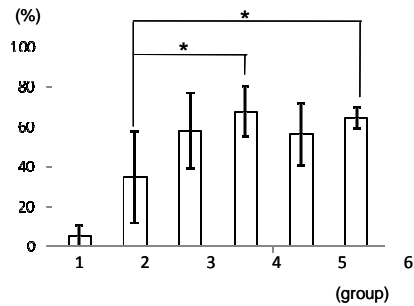


BDNF/ヒアルロン酸  
50mg/ml 6週間後

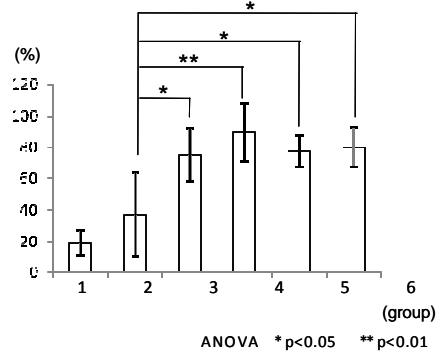


BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群では 再生骨、再生セメント質を伴う歯周組織の再生が観察された。

骨再生率 (%)



セメント質再生率 (%)



- 1: 欠損 (n=3)
- 2: ヒアルロン酸 (n=6)
- 3: ヒアルロン酸+BDNF (5mg/ml) (n=6)
- 4: ヒアルロン酸+BDNF (50mg/ml) (n=6)
- 5: ヒアルロン酸+BDNF (500mg/ml) (n=6)
- 6: ヒアルロン酸+BDNF (2mg/ml) (n=6)

(3)

BDNF/高分子ヒアルロン酸/ $\beta$ -TCP 複合体充填群では象牙質表面の大部分で新生セメント質が観察され、上皮侵入やアンキローシスは観察されなかった。また、 $\beta$ -TCP 周囲に歯槽骨の再生が広範囲に認められ、効果的に歯槽骨再生を誘導できることを示した。

(2)、(3)の結果から、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体の局所投与は歯周組織再生療法の臨床応用に有用であることが示唆された。また歯槽骨再生促進因子としての $\beta$ -TCP 併用によって、より多様な歯周組織欠損に対応できる可能性が示唆された。

#### 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2件)

- ① Mizuno N., Shiba H., Inui T., Takeda K., Kajiya M., Hasegawa N., Kawaguchi H., Kurihara H.: Effect of neurotrophin-4/5 on bone/cementum-related protein expressions and DNA synthesis in cultures of human periodontal ligament cells.: J Periodontol. 2008, Nov;79(11):2182-9. (査読有)
- ② Mizuno N, Shiba H, Xu WP, Inui T, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Hasegawa N, Kawaguchi H, Kurihara H.; Effect of neurotrophins on differentiation, calcification and proliferation in cultures of human pulp cells. : Cell Biol Int. 2007 Dec;31(12):1462-9. (査読有)

[学会発表] (計1件)

- ① 脳由来神経栄養因子 (BDNF) を用いた歯周組織再生療法に関する基礎研究: 武田克浩, 柴 秀樹, 清田真理, 加治屋幹人, 永原隆吉, 長谷川直彦, 水野智仁, 坂井宣之, 藤田 剛, 河口浩之, 辻紘一郎, 栗原英見: 日本歯周病学会 50 周年記念大会 (東京), 2007

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長谷川 直彦 (Hasegawa Naohiko)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号: 10346512

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者

武田 克弘 (Takeda Katsuhiko)  
広島大学大学院・助教  
研究者番号: 10452591