

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03831

研究課題名(和文) コラーゲン結合型FGF-2による水平性歯槽骨吸収に対する歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regeneration therapy for horizontal alveolar bone resorption with collagen-binding FGF-2

研究代表者

高柴 正悟 (Takashiba, Shogo)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：50226768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)は局所定着性が低く、歯周再生応用に制限がある。我々はコラーゲン結合型bFGF(CBFGF)とコラーゲンパウダー(CP)を併用してラットの水平歯槽骨欠損に対する治療効果を示したが、本研究ではCBFGFの特性を明らかにしCBFGF/CPの有効性をイヌモデルで評価した。CBFGFは、徐放性で、CPや歯周組織に長期間存在した。CBFGF/CPは、術後5日目の間葉系幹細胞様細胞数とNANOGとPDGF受容体 の発現細胞数を増加させ、垂直性と水平性の両骨欠損で新生骨とセメント質の形成を促進した。以上から、CBFGF/CPはこれまでの歯周再生療法の限界を大きく超越できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに実用化された塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用いた歯周再生療法の適応症は、歯槽骨欠損がやや小規模な垂直性骨吸収に制限されていた。これはbFGFの局所定着性が低いことに起因する。そこでガス壊疽菌Clostridium histolyticumのコラゲナーゼから得たコラーゲン結合ドメインとbFGFから成る融合タンパク質(CBFGF)を作製し、コラーゲンパウダーと共に用いること(CBFGF/CP)によって、組織への滞在性と賦型性を持たせた。この結果、歯周再生療法の典型モデルであるイヌの歯槽骨欠損において、垂直性のみならず水平性の歯槽骨欠損の再生に成功した。現治療法の限界を超越する。

研究成果の概要(英文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) has limited periodontal regenerative applications due to its low local fixation. We have shown that collagen-binding bFGF (CBFGF) in combination with collagen powder (CP) is effective in the treatment of horizontal alveolar bone defects in rats, and in this study we characterized CBFGF and evaluated the efficacy of CBFGF/CP in a canine model. CBFGF/CP increased the number of mesenchymal stem cell-like cells and cells expressing NANOG and PDGF receptor alpha on postoperative day 5, and promoted new bone and cementum formation in both vertical and horizontal bone defects. In conclusion, CBFGF/CP can greatly improve the limitations of conventional periodontal regenerative therapy.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 水平性骨吸収 塩基性線維芽細胞増殖因子 コラーゲン結合タンパク質 非臨床試験

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、口腔内細菌のバイオフィームによって引き起こされる炎症性疾患である。歯周炎の治療では、歯周組織再生に必要な理想的な条件、すなわち上皮の付着が少なく、新しいセメント質や骨が形成されるようにする歯周組織再生治療が行われてきた。最近では、誘導型組織再生治療法、エナメルマトリックス誘導体、成長因子も臨床で使用されている。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、細胞の増殖、移動、分化に関与している。イヌモデルで歯周再生を促進することが報告され、ランダム化臨床試験で慢性歯周炎患者の骨再生を有意に促進することが報告された。その結果、bFGF は歯周病再生剤として臨床の場で使用されるようになった。

しかし、bFGF をはじめとする成長因子は、標的特異性が低く、欠損部位での滞留時間が短いという問題がある。さらに、上皮を貫通する歯の解剖学的特性、口腔内の唾液、歯周組織内の血流などの影響により、その適用が有効でない傾向にある。そのため、現在の歯周再生療法は垂直方向の歯槽骨欠損に限定されており、水平方向の骨欠損や重度の根分岐部病変の場合、欠損部位に成長因子を高濃度に維持することは困難である。

そこで、コラーゲンに結合させるアンカーシステムに着目した。筋壊死の原因微生物の一つである *Hathewayaya histolytica* (旧 *Clostridium histolyticum*) は、2 種類のコラゲナーゼを産生する。これらは C 末端にコラーゲンアンカーを持ち、不溶性基質に定着することでコラーゲン繊維を効率よく加水分解することができる。我々は (Nakamura ら, J Periodontol, 2019), コラーゲンパウダー (CP) を添加した CBFGE/CP が、術後 8 週間において bFGF/CP よりも効果的にラットの水平歯槽骨再生を促進することを報告した。

### 2. 研究の目的

本研究では、歯周再生治療の代表的な大動物モデルであるイヌモデルを用いて、*in vitro* および *in vivo* で CBFGE の特性を調べ、その複合材料の歯周再生効果を評価した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 試験物質の調製

ヒト bFGF は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) から入手した。bFGF と *H. histolytica* クラス II コラゲナーゼ由来のコラーゲン結合ドメインからなる融合タンパク質 (CBFGE) は、既報に沿って作製し、アフィニティークロマトグラフィーにより CBFGE を精製した。CP は株式会社ニッピ (日本、茨城県) より購入した。

#### 2) *In vitro* リリースアッセイ

インビトロ放出アッセイは、既報に沿って実施した。すなわち、5mg の CP を有する 0.1 nmol の bFGF または CBFGE を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中に調製した。13,000×g, 4min, 4°C で遠心分離した後、混合物を 1 mL の PBS に浸し、37°C でインキュベートした。一定期間後、13,000×g で遠心分離し、タンパク質を含む上清を回収した。累積放出量は、Human FGF-basic ELISA キット (Legend MAXTM Human FGF-basic, BioLegend, San Diego, CA, USA) を用いた酵素結合免疫吸着法 (ELISA) により定量化した。7 日後の CP と CBFGE または bFGF のいずれかとの混合物に関して、bFGF に対するウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いてウェスタンブロットティングにより分析した。

#### 3) 動物

本研究では、雄の Sprague-Dawley ラット (10-12 週齢; CLEA 社, 東京, 日本) と雄のビーグル犬 (32~38 ヶ月齢, 北山ラベス株式会社, 長野, 日本) を使用した。外科手術は、全身麻酔下で行われた。本研究は、岡山大学動物愛護使用委員会の承認を得た (許可番号: OKU-2017554, OKU-2019337, OKU-2019600)。すべての動物実験は、岡山大学動物実験指針に基づき実施し、動物の苦痛を最小限にするよう努めた。

#### 4) *In vivo* リテンション解析

既報に沿ってラットに水平方向の骨欠損を作成した。その後、0.58 nmol の bFGF または CBFGE と混合した 5mg の CP を欠損部位に塗布した。一定期間後に組織を得て、Azan 染色で観察した。免疫組織化学にはアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法で bFGF に対するウサギポリクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を用い、ヘマトキシリンで対比染色した後、DAB シグナルを光学顕微鏡で観察した。

#### 5) CBFGE の *in vivo* での生理活性

既報に沿ってラットに水平骨欠損を形成した。一定期間後に上顎骨を抽出し、上記のように

免疫組織化学的解析を実施した。一次抗体として NANOG に対するウサギポリクローナル抗体 (BIOSS, Woburn, MA, USA) および PDGF 受容体  $\alpha$  (PDGFR  $\alpha$ , BIOS) に対するウサギポリクローナル抗体を用いた。各ラットから無作為に3つの切片をピックアップし、陽性細胞を数えた。さらに、欠損部位の結合組織を含むラット歯肉組織から細胞を得て、フローサイトメトリーを既報に沿って実施した。抗 CD16/32 (BioLegend), 抗 FGF 受容体 1 (FGFR1; Cell Signaling Technology), 抗 FGF 受容体 2 (FGFR2; Cell Signaling Technology), PE 標識抗 Ter119 (BioLegend), 抗 CD105 (BioLegend), PE/Cy7 標識抗 CD45 (BioLegend), ALEXA FLUOR 647 標識抗 CD73 (BioLegend), APC/Cy7 標識-CD90 (BioLegend), および Live/Dead fixable violet dead cell stain kit (BioLegend). さらに、二次抗体として ALEXA FLUOR488 標識抗 IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific) および PE/Cy5.5 標識 IgG 抗体 (BioLegend) を使用した。既報に沿って間葉系幹細胞様細胞を CD105+, CD73+, CD90+, Ter119-, CD45-細胞と定義し、MAQSquant Analyzer (Miltenyi Biotec) を用いてフローサイトメトリー分析を実施した。

#### 6) イヌの骨欠損モデル

犬では2種類の骨欠損を作成した。下顎部では、5×5mm (深さ, 内側-遠位幅) の1壁骨内欠損を、前述したように外科的に作製した。上顎部位では、P1 近位から P2 遠位までの水平骨欠損を作成した。イヌは3群に分けられた: PBS/CP, bFGF/CP, CbFGF/CP の3群に分けた。その後、10 mg の CP と 1.16 nmol の bFGF または CbFGF を混合したものを欠損部位に塗布した。8週間後にイヌを安楽死させ、顎骨を摘出した。

#### 7) 放射線分析

すべての試料をデンタル X 線撮影 (XDC-70, MORITA 社, 京都) およびコンピュータ断層撮影 (CT; ラセッタ LCT-200, 日立製作所, 東京, 日本) を実施した。骨欠損部位の画像を取得し、骨量 (BV), 骨塩量 (BMC), 骨塩密度 (BMD) を測定した。一壁骨欠損モデルでは、3次元画像解析ソフト (Latheta LCT-200) を用いて、歯槽骨の欠損病変 (5mm×5mm, 歯根間幅×深さ) を、根面上の定義されたノッチに基づき作成した。水平骨欠損モデルでは、欠損病変は口蓋骨の基線に囲まれた領域とし、既存骨と新生骨を含めて根元から歯冠に向かって垂線を引き、3次元画像解析ソフトウェア (Latheta LCT-200) を用いて行った。

#### 8) 組織学的解析

試料は8~12週間脱灰してパラフィンに包埋後、6  $\mu$ m の連続切片を1壁骨欠損モデルでは中遠位面、水平骨欠損モデルでは頬舌状面にスライスした。サンプルはヘマトキシリン・エオシンおよびアザンで染色し、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, USA) を用いて組織学的および形態学的分析を実施した。

#### 9) 統計解析

すべてのデータは、平均値±標準偏差で記述した。連続変数の正規分布は、Shapiro-Wilk 検定を用いて判定した。統計解析は、PBS/CP 群, bFGF/CP 群, CbFGF/CP 群間の差異を調べるために、Tukey-Kramer の多重比較検定による一元配置分散分析で実施した。2群間の解析には Student t-test を実施した。各統計処理における検定には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) を用い、p 値<0.05 を統計的に有意とした。

### 4. 研究成果

#### 1) CP における CbFGF の放出と滞留について

bFGF と CbFGF はともに CP から PBS 溶液中に徐々に放出されたが、bFGF は CbFGF よりも速く放出された (p<0.05)。CbFGF は bFGF よりもゆっくりと CP から放出され、7日後も CP に保持されたが、bFGF は7日間で CP からほぼ完全に放出された。

#### 2) ラットにおける CbFGF の欠損部位への滞留性

bFGF/CP 群では欠損部位で検出される bFGF シグナルの面積と強度が徐々に減少したが、CbFGF/CP 群では3-5日後も残存し、より明確に欠損部位に観察された。欠損部位の CP のコラーゲンは、CbFGF/CP 群では7日以上かけて徐々に減少した。

#### 3) ラットにおける CbFGF の生理活性について

bFGF/CP 群, CbFGF/CP 群ともに、欠損部位の結合組織に NANOG, PDGFR  $\alpha$  陽性細胞が観察された。CbFGF/CP 群の NANOG 陽性細胞数は、3日目と5日目に bFGF/CP 群のそれより有意に多かった (p<0.05)。さらに、CbFGF/CP 群の PDGFR  $\alpha$  陽性細胞数は、5日目に bFGF/CP 群のそれよりも有意に高かった (p<0.05)。

CbFGF/CP 群では、欠損部位の歯肉組織における総間葉系幹細胞 (MSC) (CD105+, CD73+, CD90+, Ter119-, CD45-) の数が、5日後の時点で bFGF/CP 群に比べ有意に多かった (p<0.05)。しかし、FGFR1 または FGFR2 が陽性であった MSC の数については、両群間で有意差はなかった。組織内の全細胞に発現する FGF 受容体についてのこれらの結果は確認された。

#### 4) イヌの骨量, 骨塩量, 骨塩密度分析

片側骨欠損モデルおよび水平骨欠損モデルのいずれにおいても, 術後 8 週目の骨形成は, CbFGF/CP 群が他の群よりも顕著であった (図 1A および図 2A)。骨量および骨塩量は, CbFGF/CP 群で他の群より有意に高かったが (図 1B および図 2B ;  $p < 0.05$ ), 骨塩量は全群で有意差はなかった。

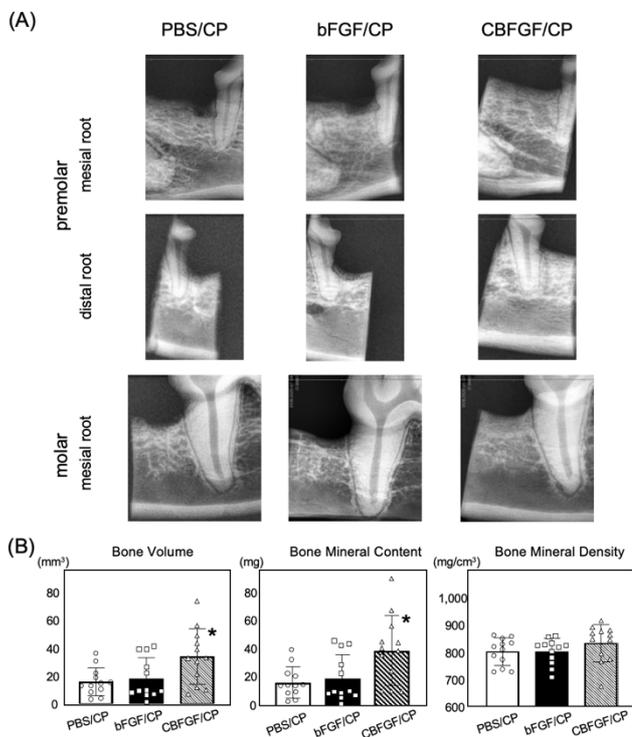


図 1. X 線解析により評価した犬モデルにおける 1 壁骨欠損の歯周再生率

(A) 術後 8 週目の代表サンプルの歯科用 X 線画像。4 個体の代表的な画像。

(B) 骨量, 骨塩量, 骨密度は, コンピュータ断層撮影 (CT) を用いて測定した。

データは 4 個体 (3 部位/個体) の平均値  $\pm$  SD で示した。一元配置分散分析および Tukey-Kramer 検定が用いられた。\*  $p < 0.05$ , コントロールグループと比較した。

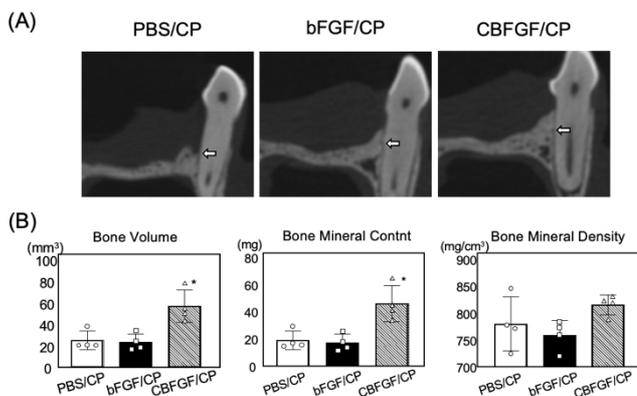


図 2. CT 解析により評価した犬モデルの水平骨欠損における歯周再生状況

(A) 術後 8 週目の代表サンプルの CT 画像。4 個体の代表的な画像。

(B) 骨量, 骨塩量, 骨密度を CT にて測定した。

データは 4 個体の平均値  $\pm$  SD で示す。一元配置分散分析および Tukey-Kramer 検定, \*  $p < 0.05$ 。コントロールグループと比較した。

#### 5) イヌにおける組織学的観察・評価

片壁骨欠損モデルおよび水平骨欠損モデルのいずれにおいても, 術後 8 週目の骨形成を Azan 染色により観察した。

一壁骨欠損モデルでは, 全群で新しい歯槽骨とセメント質の形成が観察された (図 3A)。さらに, bFGF/CP 群および CbFGF/CP 群では, セメント質組織層に対して垂直に付着したコラーゲン線維の輻射が観察された。しかし, PBS/CP 群では, コラーゲン線維がまばらに観察された。CbFGF/CP 群では, 骨高 (BH) および新生セメント質長 (LNC) が他の群に比べ有意に高かった (図 3B ;  $p < 0.05$ )。接合上皮の長さ (LJE) および結合組織の長さ (LCT) には, 有意差はなかった。

水平骨欠損モデルでは, CbFGF/CP 群でのみ新生骨とセメント質の形成が観察された (図 4A)。特に CbFGF/CP 群では, セメント質組織層に垂直に付着した緻密なコラーゲン線維が観察された。CbFGF/CP 群では, BH と LNC が他の群に比べ有意に高かった (図 4B ;  $p < 0.05$ )。LJE と LCT は若干の減少傾向を示したが, 有意差はなかった。

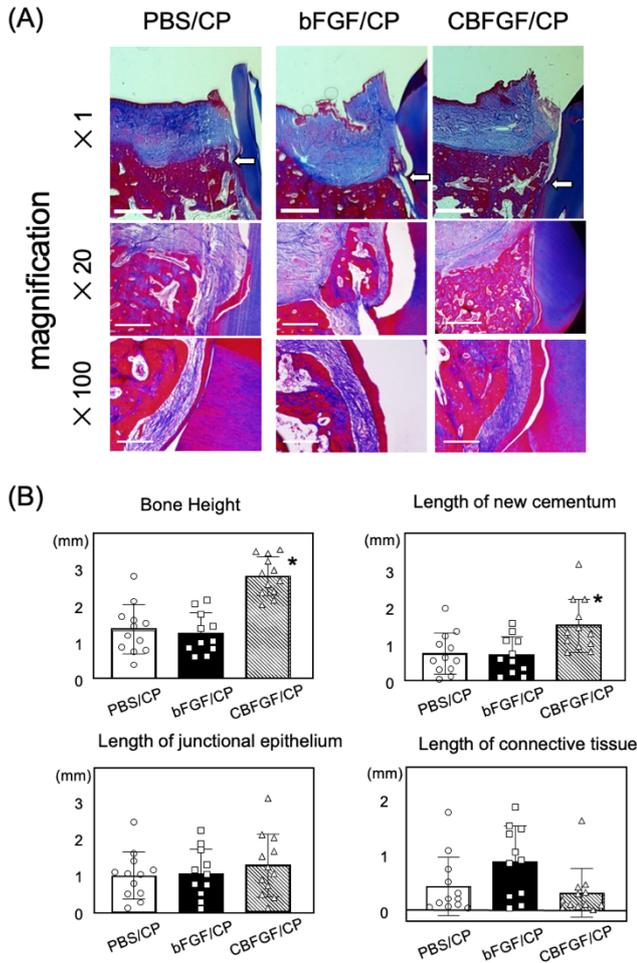


図3. 組織学的解析により評価された犬モデルにおける 1 壁性骨欠損の歯周再生効果

(A) 術後 8 週目の組織学的概観。4 個体の代表画像。スケールバー：2 (×1), 1 (×20), 0.2 mm (×100)。

(B) 骨の高さ (BH), 新しいセメント質の長さ (LNC), 接合部上皮 (LJE), 結合組織 (LCT)。

データは 4 個体 (3 部位/個体) の平均±SD で示す。一元配置分散分析および Tukey-Kramer 検定, \*  $p < 0.05$ , コントロールグループと比較。

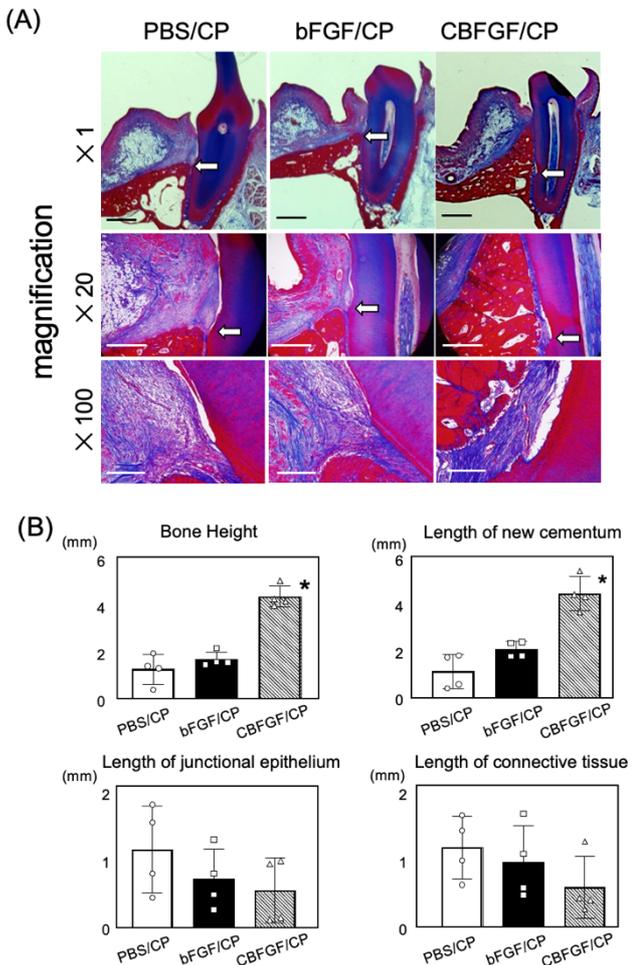


図4. 組織学的解析により評価された犬モデルの水平骨欠損における歯周再生効果

(A) 術後 8 週目の組織学的概観。4 個体の代表画像。白矢印は、人工骨欠損の底部位置を示す。スケールバー：2 (×1), 1 (×20), 0.2 mm (×100)。

(B) 骨の高さ (BH) および新しいセメント質 (LNC), 接合上皮 (LJE), および結合組織 (LCT) の長さを示す。

データは 4 個体 (1 部位/個体) の平均±SD で示す。一元配置分散分析および Tukey-Kramer

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 中村心, 伊東孝, 岡本憲太郎, 美間健彦, 内田健太郎, 山本直史, 松下治, 高柴正悟	4. 巻 40
2. 論文標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた水平性骨吸収に対する歯周組織再生療法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本歯科医学会会誌	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡本憲太郎, 伊東孝, 中村心, 大森一弘, 山本直史, 高柴正悟
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞成長因子は局所滞留性によって水平性骨欠損における歯周組織再生を促進する
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村心, 伊東孝, 岡本憲太郎, 美間健彦, 内田健太郎, 松下治, 高柴正悟
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた水平性骨吸収に対する歯周組織再生療法の開発
3. 学会等名 第36回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い (令和2年度)」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashiba S
2. 発表標題 The Biology-based Technologies in Periodontal Treatment
3. 学会等名 International Academy of Periodontology 2019 - The 17th Biennial Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura S, Ito T, Okamoto K, Mima T, Uchida K, Siddiqui YD, Ito M, Tai M, Okubo K, Yamashiro K, Omori K, Yamamoto T, Matsushita O, Takashiba S
2. 発表標題 Collagen-binding basic fibroblast growth factor regenerates horizontal alveolar bone defect
3. 学会等名 97th International Association of Dental Research, General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本憲太郎, 中村心, 伊東孝, Yasir Dilshad Siddiqui, 美間健彦, 内田健太郎, 大森一弘, 山本直史, 松下治, 高柴正悟
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞成長因子はコラーゲン基剤からの徐放によって歯周組織再生を促進する
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高柴正悟
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた水平性骨吸収に対する歯周組織再生療法の開発
3. 学会等名 BioJapan 2019
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	松下 治  (Matsushita Osamu)  (00209537)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	伊東 孝  (Ito Takashi)  (30636238)	岡山大学・大学病院・助教    (15301)	
研究分担者	平山 晴子  (Hirayama Haruko)  (40635257)	岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教    (15301)	
研究分担者	山本 直史  (Yamamoto Tadashi)  (50432662)	岡山大学・大学病院・教授    (15301)	
研究分担者	美間 健彦  (Mima Takehiko)  (80596437)	愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授    (26301)	

	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
研究協力者	中村 心  (Nakamura Shin)		
研究協力者	岡本 憲太郎  (Okamoto Kentaro)		
研究協力者	田村 和也  (Tamura Kazuya)		

## 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
---------	---------