

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10169

研究課題名（和文）LIPUSを併用したBMP9と脱分化脂肪細胞による新規歯周・骨組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel periodontal/bone regenerative therapy utilizing LIPUS, BMP9, and dedifferentiated fat cells

研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI, Kazuyuki)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90218298

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低出力超音波パルス（LIPUS）照射下での、強力な骨形成タンパクであるbone morphogenetic protein 9(BMP9)を用いた新規の再生療法開発のための研究基盤確立を目的としている。本研究の結果としてラット頭蓋骨骨欠損においてLIPUSとrhBMP-9の併用は骨再生治療に効果的なアプローチとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病などにより喪失した歯周組織・骨組織の再生療法として骨移植術、組織再生誘導法(GTR・GBR)、enamel matrix derivative (EMD)および線維芽細胞成長因子(bFGF)、骨形成タンパク(BMP)などが使用されているが、適応症の制限や再生組織量の限界等の様々な問題があり、新たな治療法の開発が必要である。本研究でLIPUSとrhBMP-9の併用は骨再生治療に効果的なアプローチとなることが示唆されたことにより、歯科領域、特に歯周組織・骨組織の再生療法へのLIPUSの応用が期待され、今後の臨床応用に発展する可能性のある非常に興味深い知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, it is aimed for research base establishment for new regenerative therapy development using strong bone morphogenetic protein BMP9 under low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) exposure. In result of this study, it was suggested that combination of LIPUS and rhBMP-9 in rat calvarial defects was effective approach for bone regenerative therapy.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 DFAT BMP9 LIPUS

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病などにより喪失した歯周組織の再生や顎骨の造成を行う治療法としては、様々な骨移植材、GTR・GBR やシグナル分子 (EMD、bFGF など) を作用させる等の手法が臨床に用いられている。しかし、(1)適応症が狭い、(2)再生組織量が十分でない、(3)満足のいく予知性が得られないなど、様々な問題があり、重度の歯周組織または顎骨欠損に対し応用可能な安全で効率的な再生療法の開発が求められている。この問題の解決を目的として Tissue engineering の 3 要素の観点から、細胞移植、シグナル分子、スキャフォールドについて様々な研究が行われている。

細胞移植療法に用いる細胞として、骨髄由来間葉系幹細胞、歯根膜由来幹細胞(PDLSC)などの応用が研究され、既に臨床研究段階に入っているものもある。しかし、(1)採取できる細胞数が限られる、(2)細胞採取に患者への侵襲が大きい、(3)細胞の複数回の採取が困難、など様々な問題が残されている。我々は成熟脂肪細胞に由来する細胞で、高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を示す脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) に着目して研究を進めてきた。DFAT は少量の脂肪組織から、年齢を問わず、簡便に、高純度で均質な細胞の大量調製が可能であることから実用的な治療用細胞として期待できると考えられる(Matsumoto T et al., J Cell Physiol, 2008)。

シグナル分子として歯周組織再生のために EMD や bFGF などが使用されているが、大きな歯周組織欠損に効果が十分でなく、また骨造成のために BMP2 が海外では既に臨床応用されているが、有害事象も報告されており、さらに効果的で安全なシグナル分子を見出すことが求められている。BMP9 は TGF スーパーファミリーに属する 14 種類の BMPs の中の 1 つであり、BMP2、BMP6、BMP7 よりも高い骨分化誘導能を有し、これらの BMP と異なったメカニズムを介してその作用を發揮している(Luu HH et al., J Orthop Res, 2007)。我々も既に BMP9 の高い骨分化能を報告している(Nakamura T et al., Clin Oral Investig, 2017、Fujioka-Kobayashi M et al., Int J Oral Maxillofac Implants, 2017、Fuchigami Set al., Eur J Oral Sci, 2016)。またこの BMP9 の作用は免疫抑制剤 FK506 によってその作用が増強される(Nakamura T et al., Biochem Biophys Res Commun, 2013)。

バイオ物理療法である低出力超音波パルス (LIPUS) は低侵襲な断続的なパルス状の超音波であり、整形外科領域では、その音圧による物理的刺激を骨折部位に与えることで難治性の骨折部の骨癒合を促進する治療として既に臨床に使用されている。さらに、骨組織だけでなく、軟組織の再生への有効性も示されている。このようなことから、歯科領域、特に歯周組織・骨組織の再生療法への LIPUS の応用が期待されるが、未だ十分に研究されていない。DFAT や BMP9 に LIPUS 照射を併用することにより、より予知性の高い歯周・顎骨再生療法の開発が期待されるが、LIPUS 照射の BMP9 による誘導される骨形成や DFAT への影響については全く不明であり、その解明が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、歯周病により喪失した歯周・骨組織の再生を目指し、LIPUS、DFAT および BMP9 に着目し、新規の歯周組織再生療法の開発のための研究基盤の確立を目的とし、以下の項目を明らかにしようとした。

(1)DFAT への LIPUS の影響を明らかにする。組織幹細胞様の性質を有する DFAT を歯周・骨組織再生に関する研究は少なく、さらに歯周組織の再生に関与する DFAT に物理的刺激である LIPUS の影響を調べた報告はない。

(2)DFAT の骨芽細胞様細胞への分化を誘導するシグナル分子として BMP9 を用いる。我々のこれまでの研究より、種々の細胞で BMP9 は BMP2 よりも強く骨分化を亢進させる結果が得られている(Nakamura T et al., Clin Oral Investig, 2017、Fuchigami Set al., Eur J Oral Sci, 2016)。世界的に BMP9 を研究している研究施設は少なく、今後の展開が期待される分子と考えている。

(3)歯周・骨組織再生に LIPUS、シグナル分子 (BMP9)、DFAT の 3 者を併用する。BMP9 の組織再生能を現在臨床の再生療法で使用されている EMD および bFGF と比較する。

## 3. 研究の方法

本研究は鹿児島大学動物実験委員会 (D19011) の承認のうえ、実施された。

実験動物には Wistar 系ラット (10 週齢・雄・18 匹) を用いた。全身麻酔下にて頭蓋骨頂部に骨欠損 (4 欠損/匹) をトレフィンバー (直径 2.7mm) を用いて外科的に作製し(図 1)、(1)骨欠損のみ: Control(-)、(2)吸収性カラーゲンスポンジ (ACS) 埋植: ACS(-)、(3)rhBMP-9/ACS: rhBMP-9(-)、(4)LIPUS 照射のみ: Control(+)、(5)ACS+LIPUS:



図1.ラット頭蓋骨骨欠損



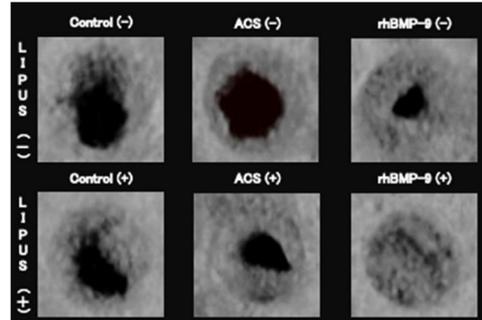
図2.LIPUS照射

ACS(+), (6)BMP-9/ACS+LIPUS: rhBMP-9(+)<sup>6</sup>の6処置を行った。LIPUS 照射群では術直後より LIPUS 照射 (1.5MHz、30mW/cm<sup>2</sup>)を週に5回 (20分/回)行った(図2)。4週後、動物の安楽死を行い、マイクロCTによる放射線学的評価を実施後、脱灰薄切標本を作製し組織学的評価・計測を行った。

#### 4. 研究成果

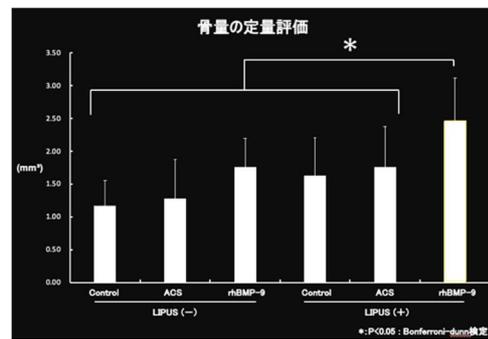
##### (1)マイクロCT所見

Control 群と ACS 群の LIPUS 非照射群は大部分が透過像で占められているが、LIPUS 照射群では非照射群と比較しやや不透過像の広がりを認めた。BMP-9 群では他群と比較し非照射群は骨欠損内の不透過性の亢進は認めるものの、欠損中央部に透過像の残存を認め、一方で照射群は均一に不透過像の亢進を認めた。



##### (2)骨量の定量評価

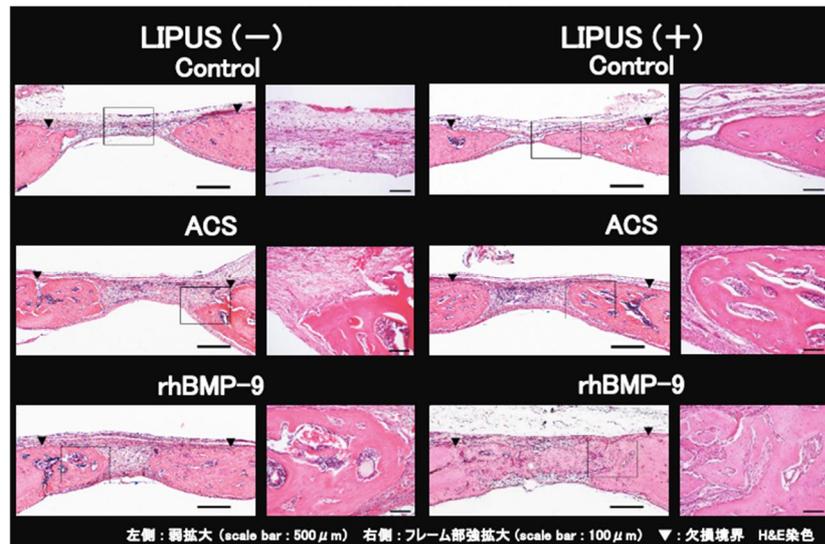
全体的に LIPUS 照射群が非照射群と比較し高値を示しており、中でも、BMP-9 と LIPUS 併用群は他群と比較し優位に高値を示した。



##### (3)組織学的所見

Control 群は LIPUS 照射群、非照射群共に骨形成は辺縁に局限しており、欠損中央部の組織幅は薄いことが示された。しかし、照射群は非照射群に比べ、やや骨欠損閉鎖が亢進していることが認められた。

ACS 群では ACS によって組織幅は Control 群と比較し確保されているものの骨欠損閉鎖の亢進はあまり認めなかった。しかし、照射群は非照射群と比較し ACS 内部に骨形成が浸潤していることが認められた。

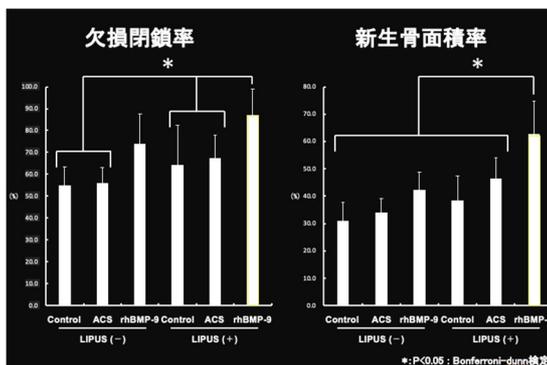


BMP-9 群では Control 群、ACS 群と比較し骨欠損閉鎖の亢進が認められた。LIPUS 照射群は非照射群に比べ骨欠損内に骨様組織の広がりを認めた。

##### (4)組織形態計測

欠損幅や欠損領域において全群間で有意差はなかった。中心部の厚さ、周辺部の厚さ共に BMP-9 と LIPUS の併用群が最大でかつ Control 群に対し有意差が認められたため、骨盤欠損部の形態保持も良好であることが示された。全パラメータで BMP-9 と LIPUS 併用群が全群で最大値を示し、Control 群と比較し有意に高値を示した。LIPUS 照射群と非照射群間では新生骨領域の BMP-

9 群、新生骨面積率の ACS 群と BMP-9 群にのみ有意差が認められた。欠損閉鎖率、新生骨面積率共に BMP-9 と LIPUS 併用群が全群間で最大値を示し、Control 群と比較し有意に高値を示した。また LIPUS 照射群と非照射群間では新生骨面積率の BMP-9 群にのみ有意差が認められた。



#### (5) 骨欠損閉鎖率と分布

骨欠損閉鎖率の高いサンプル数は BMP-9 と LIPUS 併用群が最も多く、中でも完全閉鎖を認めたのは 4 サンプルあり、良好な結果が得られた。

		骨欠損閉鎖率 (%)		
		40-60	61-80	81-100
LIPUS (-)	Control	7/12	5/12	0/12
	ACS	9/12	3/12	0/12
	rhBMP-9	1/12	8/12	3/12
LIPUS (+)	Control	5/12	4/12	3/12
	ACS	3/12	7/12	2/12
	rhBMP-9	0/12	5/12	7/12

(単位: 欠損)

以上のことから LIPUS と rhBMP-9 の併用は骨再生治療に効果的なアプローチとなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imafuji Takatomo, Shirakata Yoshinori, Shinohara Yukiya, Nakamura Toshiaki, Noguchi Kazuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Enhanced bone formation of calvarial bone defects by low-intensity pulsed ultrasound and recombinant human bone morphogenetic protein-9: a preliminary experimental study in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-021-03897-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirakata Yoshinori, Imafuji Takatomo, Sena Kotaro, Shinohara Yukiya, Nakamura Toshiaki, Noguchi Kazuyuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Periodontal tissue regeneration after low intensity pulsed ultrasound stimulation with or without intra marrow perforation in two wall intra bony defects. A pilot study in dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 54～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 瀬戸口 史晃、瀬名 浩太郎、篠原 敬哉、野口 和行 .
2. 発表標題 低出力超音波パルスはBMP9により誘導された脱分化脂肪細胞の骨芽細胞様分化を増強する .
3. 学会等名 第4回 南九州歯学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬戸口 史晃、瀬名 浩太郎、篠原 敬哉、野口 和行 .
2. 発表標題 低出力超音波パルスはBMP9により誘導された脱分化脂肪細胞の骨芽細胞様分化を増強する .
3. 学会等名 令和4年度 日本歯周病学会九州五大学 日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y Shirakata, T Imafuji, K Sena, Y Shinohara, T Nakamura, K Noguchi
2. 発表標題 Periodontal regenerative effect of low-intensity pulsed ultrasound with/without intramarrow perforation in intrabony defects in dogs.
3. 学会等名 IAP 2019 The 17th Biennial Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今藤隆智, 白方良典, 篠原敬哉, 中村利明, 野口和行
2. 発表標題 リコンビナントヒトBMP-9とLIPUS照射がラット頭蓋骨欠損の骨再生に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今藤隆智, 白方良典, 中村利明, 篠原敬哉, 野口和行
2. 発表標題 ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるリコンビナントヒトBMP-9と低出力超音波パルス照射による骨再生効果
3. 学会等名 令和元年度 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
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	白方 良典  (SHIRAKATA Yoshinori)  (60359982)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授    (17701)	

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	中村 利明  (NAKAMURA Toshiaki)  (60381183)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師    (17701)	
研究分担者	瀬名 浩太郎  (SENA Koutarou)  (60701117)	東北大学・歯学研究科・助教    (11301)	

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