

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18997

研究課題名(和文) コラーゲンアンカリングによる成長因子徐放システムを用いた歯周組織再生の研究

研究課題名(英文) The study of periodontal regeneration using growth factor delivery system due to collagen anchoring

研究代表者

中村 心 (Nakamura, Shin)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：70837690

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)：塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)製剤が上市されたが、その適応症は限定的である。そこで、コラーゲン結合ドメイン(CBD)とbFGFから成る融合タンパク質(CBFGF)を用いて、組織再生効果を高めることを考えた。本研究では、CBFGFの機能を詳細に検討した上で、化学架橋によってCBDとbFGFを連結することを試みた。まず、ラットモデルを用いて、CBFGFが組織中へ滞留し持続的に活性を発揮することを示した。また、架橋剤によって作製した架橋型CBFGFは、組換え融合型CBFGFと比較して分子量が大きかった。bFGFとCBDの架橋反応比率や反応効率について、さらに研究を進める必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

bFGF製剤は、局所滞留性や標的特異性に乏しいため、歯周組織再生療法において、適応症が垂直性骨吸収へ限定されている。CBFGFは、bFGFの欠点を克服することによって、水平性骨吸収に対する歯周組織再生療法への応用に加えて、先天性骨欠損や顎堤増大術への応用に寄与できる可能性がある。また、CBDとタンパク質の化学架橋によって、新規の薬剤デリバリーシステムとして、bFGFだけでなく他の生理活性物質への連結など、CBDの汎用性の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Basic fibroblast growth factor (bFGF) has been utilized for periodontal regeneration. However, its application is limited because of its low target specificity and local retention. Therefore, we focused on CBFGF consisted of bFGF and collagen-binding domain (CBD) to promote regenerative efficacy. The aim of this study is to evaluate the function of CBFGF in detail and to expand the versatile application of CBD. Retention of CB-bFGF in local tissue and mesenchymal stem-like cells in periodontal tissue was evaluated in rats. Consequently, we showed CBFGF exerted the prolonged efficacy due to the improvement of local retention. Moreover, we tried to connect bFGF and CBD using chemical cross-linking agent. Molecular weight of cross-linked CBFGF was bigger than recombinant fused CBFGF. It is suggested that multiple bFGFs bind to CBD, or bFGFs formed complex with each other. Further investigation is necessary to examine the ratio and efficiency of cross-linked reaction.

研究分野：歯科保存治療学・歯周病学

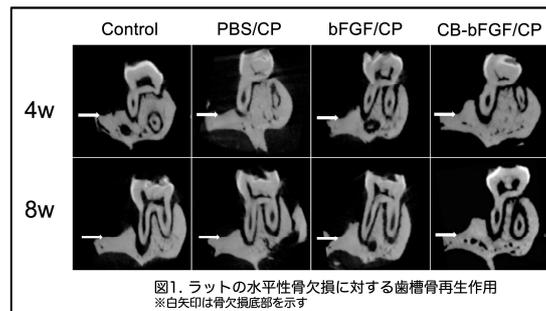
キーワード：ドラッグデリバリーシステム 成長因子 歯周組織再生 コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度の歯周病に対する組織再生治療剤として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の臨床応用が開始された。bFGF は細胞増殖や遊走、分化、そして血管新生などを制御して、理想的な歯周組織の再生を導くことが知られている。しかし、増殖因子は標的特異性や組織滞留性が低いことと、適応部位が口腔内という薬剤が拡散しやすい環境であるために、適応症が垂直性骨欠損へ制限されることが課題である。その解決策として、細菌のコラゲナーゼに由来するコラーゲン結合ドメイン (CBD) を用いて、成長因子をコラーゲン線維へアンカリングする薬物送達システムへ着目した。ガス壊疽菌である *C. histolyticum* 由来のコラゲナーゼは、CBD によってコラーゲン線維へ結合し、組織破壊を進行させる。我々は、この CBD と bFGF から成る融合タンパク質 (CBFGF) を大腸菌生産系にて精製した。そして、CBFGF をコラーゲン基剤と共にラットの水平性骨欠損モデルに投与すると、bFGF の場合と比較して有意に骨量と骨塩量を増大させることを示した (図 1, Nakamura S, et al, 2019)。これは、CBFGF がコラーゲン結合活性によって、局所組織中へ滞留し、持続的に有効性を発揮するためと考えた。

また、我々は CBD を応用した薬物送達システムが、他の生理活性物質に対しても応用できると考えた。しかし、生理活性物質ごとに融合タンパク質を精製することは多大な時間とコストを要する。そこで、化学架橋剤を用いて生理活性物質と CBD を連結することによって、その汎用性を拡大することを考えた。



2. 研究の目的

本研究では、(1) これまで有効性を実証してきた組換え融合型 CBFGF において歯周組織再生作用のメカニズムを検討するために、その組織内滞留性や生物学的活性を評価すること、(2) CBD と既存の bFGF を、化学架橋剤を用いて連結し、その機能を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

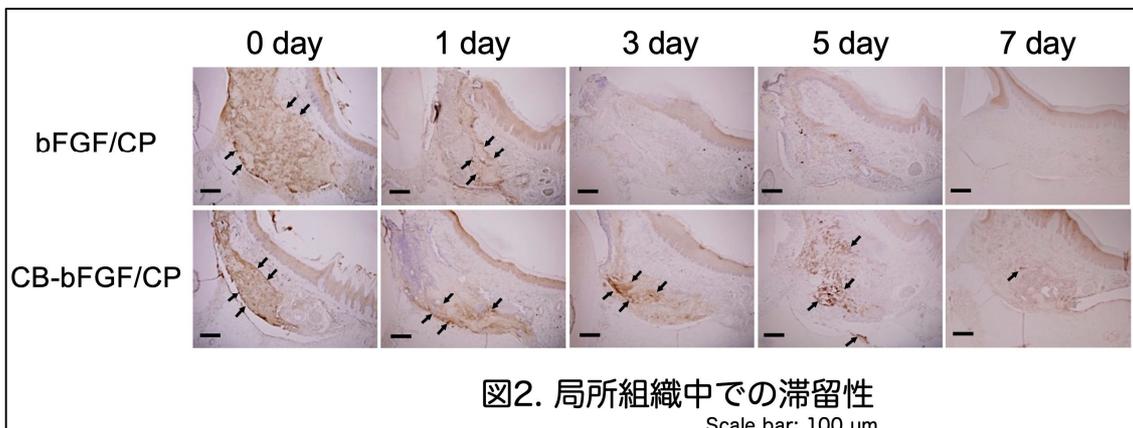
(1) CBFGF の有効性のメカニズムについて、ラットの水平性骨欠損モデルを用いて実験を行った。免疫組織化学染色を用いて、局所組織中での CBFGF の滞留性を評価した。また、フローサイトメトリーと免疫組織化学染色を用いて、CBFGF の幹細胞に対する作用について評価した (岡山大学動物実験委員会承認番号: OKU-2017554, OKU-2019600)。

(2) CBD と bFGF の化学架橋について、二価性化学架橋剤 Sulfo-GMBS (N-(4-Maleimidobutyryloxy) sulfosuccinimide) を用いて実験を実施した。まず、架橋反応の条件を探索するために、多量に必要となる CBD と bFGF を大腸菌生産系にて精製した。続いて、CBD, bFGF, そして架橋剤を様々な比率で反応させ、生成されたタンパク質を Western blotting で評価した。架橋反応は、最初に、bFGF のアミノ基と Sulfo-GMBS を反応させ、その後、CBD のシステイン残基へ bFGF-GMBS を結合させた。未反応の架橋剤は、SpinTrap カラムを用いて除去した。得られた生成物を歯根膜細胞に作用させ、その細胞増殖活性を WST-8 assay を用いて評価した。

4. 研究成果

本研究によって以下の研究成果を得た。

(1) ラットの水平性骨欠損モデルにおいて、免疫組織化学染色の結果、bFGF は、投与後 3



日で検出が弱まる一方で、CBFGF は、投与後 5 日まで骨欠損作製部位で顕著に検出され、投与 7 日後まで確認された(図 2)。CBFGF は、bFGF と比較して局所組織中で長期に滞留した。また、ラットの歯周組織を採取してフローサイトメトリーを行った結果、CBFGF は投与 5 日後において、bFGF と比較して有意に間葉系幹細胞様細胞 (MSC) 数を増加させた(図 3, * : $p < 0.05$)。FGF レセプター (FGFR) を発現した MSC 数も、CBFGF 投与後、bFGF と比較して増加する傾向があった(図 3)。さらに、免疫組織化学染色の結果、CBFGF は投与 5 日後に、幹細胞に関連したタンパク質として知られている Nanog と PDGFR α の陽性細胞数を bFGF と比較して有意に増加させた(図 4, * : $p < 0.05$)。これらの結果から、CBFGF は、bFGF と比較して局所組織中へ長期に滞留し、持続的に活性を発揮する可能性が示された。本研究成果によって、CBFGF が歯周組織再生療法において、有効性を発揮するメカニズムの一端が明らかになった。CBFGF は、水平性骨欠損のように材料や薬剤の喪失しやすいシビアな環境下においても、その局所滞留性によって有効性を発揮できる可能性があり、歯周組織再生療法の適応症拡大が期待できる。

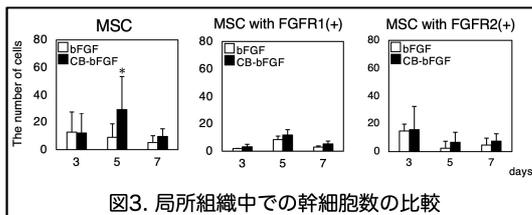


図3. 局所組織中での幹細胞数の比較

(2) CBD と bFGF の化学架橋反応の後、Western blotting を行った結果、bFGF 抗体および CBD 抗体いずれにも反応する生成物(化学架橋型 CBFGF)が生成された(図 5)。bFGF : 架橋剤 : CBD の反応比率は、いくつかのパターンで実施したが、いずれの場合も未反応の bFGF, または CBD が相当量あると考えられ、反応比率・反応効率について検討の余地があると考えられる。また、生成された化学架橋型 CBFGF (図 5, 赤枠) の分子量は、組換え生産された CBFGF (組換え融合型 CBFGF) と比較して大きく、反応比率が CBD と bFGF で 1 : 1 でない可能性や bFGF 同士で複合体を形成した可能性を推測した。

さらに、架橋反応後も bFGF の活性が喪失していないことを確認するために、化学架橋型 CBFGF を歯根膜細胞へ添加すると、精製した bFGF, 市販の bFGF, そして組換え融合型 CBFGF と比較して、細胞増殖を著しく促進した(図 6, 化学架橋型 CBFGF1-3 は、同一の方法で 3 回生成した)。一方で、CBD は歯根膜細胞に対して細胞増殖活性を示さなかった。このことから、一つの CBD に対して複数の bFGF が架橋したことや bFGF 同士で複合体を生成したことによって、細胞増殖活性を亢進した可能性がある。

以上のことから、反応比率や反応効率などの架橋反応方法について、研究開始当初に予定していたよりも検討課題が多かったため、本研究では他の生理活性物質に対して、CBD の化学架橋を適応することへ至らなかった。今後は、CBD-bFGF の化学架橋について、より専門性の高い研究者の協力を得て最適な条件を探索し、その有効性を検討することで、汎用性拡大を目指していく必要があると考えている。

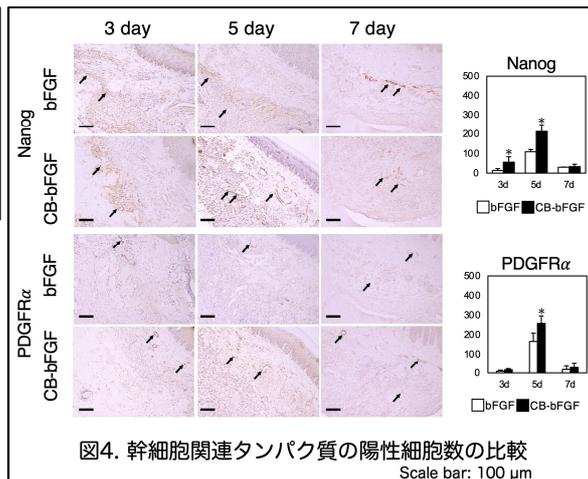


図4. 幹細胞関連タンパク質の陽性細胞数の比較
Scale bar: 100 μ m

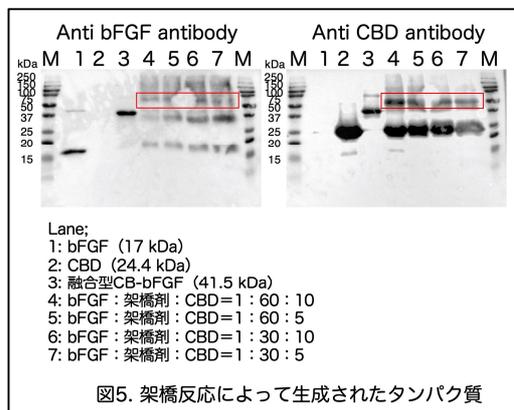


図5. 架橋反応によって生成されたタンパク質

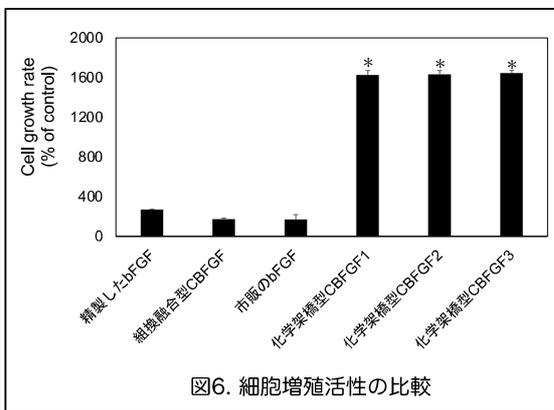


図6. 細胞増殖活性の比較

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 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	4. 巻 90巻
2. 論文標題 Acceleration of bone regeneration of horizontal bone defect in rats using collagen-binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1043-1052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.18-0674	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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 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 松下治, 美間健彦, 後藤和義, 山本由弥子, Caviness Perry, Joshua Sakson, 小出隆規, 内田健太郎, 中村心, 高柴正悟
2. 発表標題 細菌性コラゲナーゼのコラーゲン・アンカーと歯周組織再生への応用
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
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

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