

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19062

研究課題名(和文) 持続的な骨組織再生効果を有する骨誘導因子徐放型メンブレンの開発

研究課題名(英文) Development of bioactive substances delivered membrane with sustained bone regeneration

研究代表者

白井 麻衣 (Shirai, Mai)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80779819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：同種骨で製作した脱灰骨シートの骨造成能の検証、骨タンパク質に含まれる生理活性物質の同定、および生理活性物質と共存する非コラーゲン性タンパク質との相互作用を調べることを目的とした。脱灰骨シートは骨造成の誘導能を有し、その効果はシートに含まれる骨タンパク質中のトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF- $\beta$ )によるものであった。TGF- $\beta$ はシート中の象牙質マトリックスタンパク質1(DMP1)、Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)、ビグリカン(BGN)などの非コラーゲン性タンパク質と結合することで活性が維持されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脱灰骨シートが石灰化誘導能を有し、その作用が脱灰骨に含まれるTGF- $\beta$ によること、さらにTGF- $\beta$ 活性は脱灰骨中のDMP1、MEPE、BGNなどのNCPと結合することで活性が維持されることを見出した。脱灰骨シートは、活性を維持した状態の骨誘導因子を徐放し、定量的・定性的な骨造成を可能とするメンブレンとして、GBR法やリッジブリザーションなどのインプラント治療に有用である可能性がある。今後は、シートの多孔度の測定、in vivoおよびin vitroでの徐放時間の測定などの実験、人工材料への置換を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To investigate the bone augmentation ability of demineralized bone sheets mixed with allogeneic bone with protein fractions containing bioactive substances and the interaction between coexisting bioactive substances and proteins.

Conclusions: Demineralized bone sheets are capable of inducing bone augmentation, and this ability is mainly due to transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in the bone protein mixed with the sheets. The activity of TGF- $\beta$  is maintained when binding to bone Noncollagenous proteins such as Dentin matrix protein 1 (DMP1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), and billycan (BGN) in the sheets.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨造成 吸収性メンブレン 骨誘導因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において、抜歯に伴う歯槽骨吸収による骨高径の低下は避けられず、一定の骨高径および骨幅が必要であるインプラント治療を行う際の障害となる(Schropp L et. al. 2003 Int J Periodontics Restorative Dent)。そこで、歯槽骨吸収を抑えるだけでなく、理想的な歯槽骨高径が獲得できる材料の開発が望まれている。現在、骨増生における遮蔽膜の有効性は既に知られており(Dahlin C et. al. 1989 Int J Oral Maxillofac Implants)、様々なメンブレンが市販されているが、骨誘導能を有するメンブレンは少ない。

### 2. 研究の目的

抜歯後の骨量の増加を目的とした歯槽骨再生治療では自家骨移植や、同種骨、異種骨、人工骨などの補填材が用いられる。我々の先行研究において、ラット大腿骨を脱灰し作製したシート(脱灰骨シート)を用いて抜歯窩を被覆したところ歯槽骨の骨造成が促進され、脱灰骨に含まれる生理活性物質の作用によるものであると示唆された。我々は脱灰骨シートに含まれる生理活性物質がその機能を発揮するには、骨タンパク質中に共存する非コラーゲン性タンパク質(NCP)と相互に作用する必要があると考え、ラット骨より調製した脱灰骨シートの石灰化誘導能の検証、脱灰骨に含まれる生理活性物質の同定、および生理活性物質との相互作用に関与する NCP の特定と機能を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験

6週齢ラット大腿骨を採取し、骨髄、海綿骨、骨膜の除去、超音波洗浄機とリン酸緩衝生理食塩水(PBS)による洗浄後、塩酸を用いて脱灰した骨試料(DBS-P)から脱灰骨シートを作製した。また、DBS-Pからグアニジンを用いて可溶性画分(G2画分)を除去した脱灰骨シート(DBS-E)を作製した。さらにDBS-EをPBS処理し、再度G2画分を混合したシート(DBS-R)とPBSのみで処理を行ったシート(DBS-C)を調製した。これら4種類の脱灰骨シートを用いて同種ラットへの移植実験を行い、移植8週後に各シートのmicro-CT撮影を行い、構造を解析した。

#### (2) 生理活性物質の同定

6週齢SDラット大腿骨および脛骨から調製した骨粉をグアニジンによる前処理、塩酸による脱灰、再度グアニジンによる抽出を行って可溶性画分(G2画分)を得た。G2画分をヘパリンアフィニティークロマトグラフィー(Hep-AFC)で分離し、電気泳動、質量分析、ヒト歯根膜由来細胞(hPDL)を用いたアルカリフォスファターゼ(ALP)活性測定とPAI-1プロモーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、生理活性物質の同定を行った。

#### (3) 生理活性物質とNCPとの相互作用の検証

Hep-AFCにて得られた生理活性物質を含む画分(Hep-c)に対して質量分析法を行い、共存するNCPを特定した。さらに特定された各リコンビナントNCPを用いて生理活性物質と混合させ、混合試料をイオン交換高速液体クロマトグラフィー(IE-HPLC)で分離し、各溶出画分に対してhPDL細胞を用いてALP活性を測定することで生理活性物質とNCPとの相互作用を検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物実験

G2画分を含む脱灰骨シート(DBS-P, DBS-R)は、高度に石灰化が誘導されたが、G2画分を含まない脱灰骨シート(DBS-E, DBS-C)では石灰化が生じなかった(図1)。この結果から脱灰骨シートは石灰化誘導能を有しており、その効果はG2画分に含まれる生理活性物質やNCPによるものと示唆された。また実験に用いたラットに移植による免疫反応が認められなかったことから、同種骨を用いた脱灰骨シートは骨補填材や吸収性メンブレンとして今後のインプラント治療に貢献できる可能性が示された。

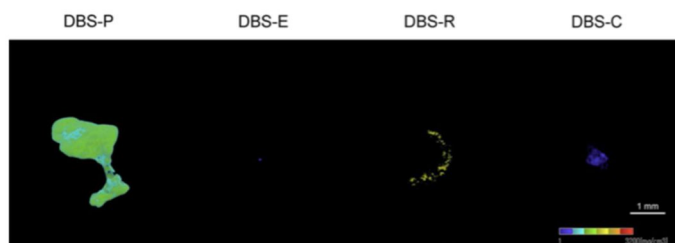


図1. 定量的CT解析による骨密度

#### (2) 生理活性物質の同定

G2画分はHep-AFCにより5つの画分に分離され(図2A)、そのうち3番目の溶出画分であるHep-

c は、hPDL 細胞に対する ALP 活性を上昇させた (図 2C)。また、トランスフォーミング増殖因子 - (TGF-) 応答性 PAI-1 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにおいても高い活性を示したことから Hep-c に生理活性物質として TGF- が存在することが判明した。

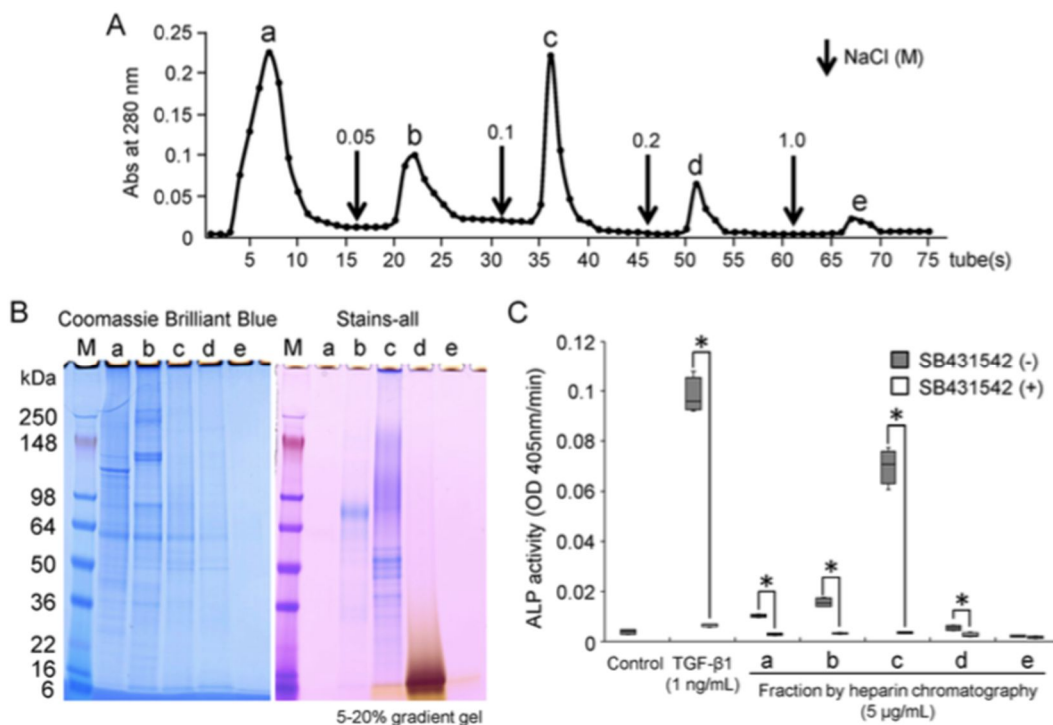


図 2 . ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを用いた G2 画分の分離と各画分に対する TGF- 活性の検出

(3) 生理活性物質と NCP との相互作用の検証

Hep-c の電気泳動像では、分子量約 25-150 kDa に渡って酸性 NCP のバンドがいくつか観察され (図 2B)、質量分析にて象牙質マトリクスタンパク質 1 (DMP1)、Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)、ビグリカン (BGN) が主に特定された。これら 3 種類の NCP と TGF- による *in vitro* 結合実験において、IE-HPLC での分析後の TGF- 活性は、TGF- 単体では約 11.3%の活性が残存したが、3 種類の NCP と結合させることで、その活性は約 14.7~32.7%に増加することが明らかとなった。この結果から 3 種類の NCP が TGF- に結合することで TGF- 活性が維持されることが示唆された。

Accession number	Protein name	Gene symbol	Molecular weight (kDa)	Quantitative value
P47853	Biglycan	Bgn	42	2.7E+10
Q9ES02	Matrix extracellular phosphoglycoprotein	Mepe	47	2.7E+10
P98193	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	Dmp1	53	2.1E+10
Q01129	Decorin	Dcn	40	1.3E+10
P02770	Albumin	Alb	69	1.1E+10
P07897	Aggrecan core protein	Acan	221	3.5E+09
D3ZAF5	Periostin	Postn	90	3.3E+09

Detected proteins are listed in order of increasing quantification value

図 3 . Hep-C に含まれるタンパク質 (質量分析結果)

Binding protein	Unbound (ng)	Bound (ng)
TGF-β1 only	112.9 ± 0.38	-
DMP1	-	149.5 ± 0.41
MEPE	-	167.9 ± 0.77
BGN	-	132.4 ± 0.48

The value indicates total ng of TGF-β1 obtained from IE-HPLC after binding experiments against 20 μg of protein

図 4 . TGF- との *in vitro* 結合実験

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 Haruka Saito, Risako Chiba-Ohkuma, Yasuo Yamakoshi, Takeo Karakida, Ryuji Yamamoto, Mai Shirai, Chikahiro Ohkubo	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of bioactive substances involved in the induction of bone augmentation using demineralized bone sheets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Implant Dent	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40729-022-00449-9	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齊藤 悠, 白井麻衣, 大久保力廣
2. 発表標題 脱灰骨抽出物中の骨再生誘導に関する生理活性物質の特性
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第131回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤 悠, 山本竜司, 白井麻衣, 大熊理紗子, 山越康雄
2. 発表標題 骨抽出物中に含まれる石灰化誘導因子の同定
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤 悠, 白井麻衣, 大久保力廣
2. 発表標題 脱灰骨中の石灰化誘導能に関する生理活性物質の特性解析
3. 学会等名 令和4年度日本補綴歯科学会西関東支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 悠, 山本竜司, 白井麻衣, 大熊理紗子, 山越康雄
2. 発表標題 骨タンパク質に含まれる骨再生促進因子の効果の検証
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 悠, 白井麻衣, 大久保力廣
2. 発表標題 骨タンパク質に含まれる骨再生促進因子の効果の検証と分析
3. 学会等名 公益社団法人日本口腔インプラント学会第41回関東・甲信越支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 悠, 白井麻衣, 大久保力廣
2. 発表標題 脱灰骨の骨タンパク質の骨形成への影響
3. 学会等名 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 悠, 山本竜司, 白井麻衣, 大熊理紗子, 大久保力廣
2. 発表標題 脱灰骨シートに含まれる骨形成因子の同定
3. 学会等名 第62回一般社団法人歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------