

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16974

研究課題名(和文) ヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜の使用における歯周組織治癒メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigating the mechanism of placental amnion-chorion membranes on periodontal regeneration

研究代表者

吉田 航 (Yoshida, Wataru)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30875703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、外科的に作製したラットの歯周組織欠損に様々な成長因子を含むヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜(HACM)の局所応用による歯周組織治癒の効果を検討した。術後4週の評価では、HACM応用群はUnfilled群と比較し新生骨様構造が多く認められ、薄い新生セメント質様構造も認められた。さらに、HACM抽出液中にはVEGFおよびFGF-2が含まれている事をELISAにて確認した。ラット歯根膜由来細胞にHACM抽出液を滴下し評価したところ細胞増殖能および遊走能が促進された。以上より、HACMの含有成分が歯根膜由来細胞の増殖および遊走を促すことで、歯周組織治癒を促進させ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

本研究では、外科的に作製した歯周炎モデルに成長因子を含むHACMを応用して歯周組織治癒に及ぼす影響を比較・検討した。HACMには多数の成長因子が含まれており、現在までに歯科領域では歯周組織再生療法に応用された報告がいくつか存在する。しかし、HACMから徐放される成長因子が治癒にどのような影響を及ぼすのかが不明な点が多いため、本研究で明らかにするという着想に至った。今回の結果では、HACMの含有成分が歯根膜由来細胞の増殖および遊走を促すことで、歯周組織治癒を促進させることが示唆された。本研究の推進により、新たな歯周組織再生療法の開発基盤を構築することで新たな治療戦略の足掛かりになると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the effect of local application of human dehydrated amnion-chorion membrane (HACM) which contains various growth factors, on the periodontal healing of surgically created periodontal defects in rats. At 4 weeks, the amount of new bone formation in the HACM group was greater than in the unfilled group. Thin new cementum-like structures in the HACM group were also observed. Furthermore, the concentration of VEGF and FGF-2 was measured by ELISA from the HACM extracts. When HACM extract was dropped onto rat periodontal ligament-derived cells, cell proliferation and migration were promoted. These results suggest that growth factors contained in HACM promote proliferation and migration of periodontal ligament-derived cells and lead to enhanced periodontal healing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周組織再生療法 ヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生は、歯周治療の最大の目標である。これまでエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) について多くの研究データが蓄積され、これらの材料・薬剤の使用は臨床的にも良好な結果が報告されている。歯周組織再生には様々な成長因子が異なるメカニズムで働くため、複数の成長因子を含む生体材料は、より効果的に作用する可能性があると考えられている (Anitua E et al. J Periodontol 2012)。そこで我々は、FGF-2、上皮成長因子 (EGF)、腫瘍細胞増殖因子 (TGF) などの成長因子を豊富に含むとされる (Russo A et al. Cell Tissue Bank 2012)、ヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜 (Placental amnion/chorion: PAC 膜) に着目した。PAC 膜はヒトの胎盤の内層に位置する羊膜および外層に位置する絨毛膜で構成され、タイプ I コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスを含み、細胞の付着、成長、分化の促進に関わることが報告されている (Gupta A. Int J Biomater 2015)。これまでに PAC 膜に関する研究は、70 年以上にわたり行われており、火傷や潰瘍の治療への使用を含め、様々な用途で使用されてきた。PAC 膜は、細胞外マトリックスや成長因子を含むだけでなく抗菌性を持つため、細胞の増殖や分化に機能し、創傷治癒を促進することが示唆されている。さらに、PAC 膜はアメリカの FDA の認可を受けており、歯周組織再生材料として human dehydrated amnion/chorion membrane (HACM) がすでに GTR 膜や結合組織移植片の代わりとして使用され、良好な結果を示している (Holtzclaw DJ et al. Clin Adv Periodontics 2013, Agarwal SK et al. Eur J Dent 2016)。しかし、HACM の使用が歯周組織の治癒に及ぼす影響についての詳細なメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、外科的に作製したラット歯周組織欠損において HACM の応用が歯周組織治癒に及ぼす影響と、そのメカニズムを解明することである。

in vivo においては、我々がすでに作製しているラット 3 壁性歯周組織欠損モデルを用いて、HACM 応用後の治癒動態を形態学的 (μ CT)、組織学的 (H-E, Azan)、免疫組織化学的 (VEGF, α -SMA) に検討する。in vitro においては HACM に含まれるとされる成長因子 (VEGF, FGF-2) の release kinetics を経時的に ELISA 法によって計測する。さらに、HACM の抽出液をラットより採取した歯根膜由来細胞の培養液中に滴下し、細胞増殖能を WST-1、細胞遊走能を Wound healing assay により評価した。本研究は、HACM の応用による細胞および組織への影響について、in vivo と in vitro から多角的に評価する。

3. 研究の方法

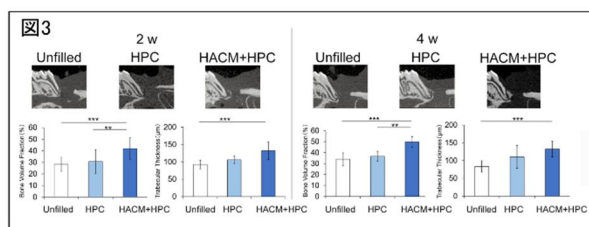
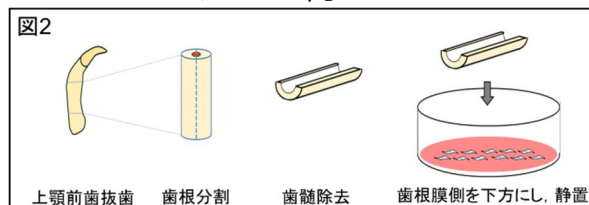
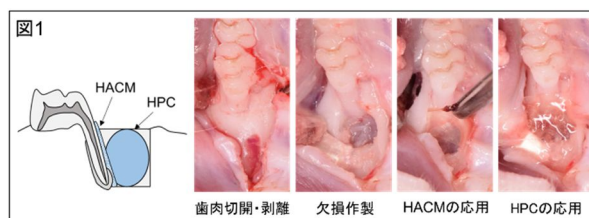
in vivo では、Wistar ラットの上顎第一臼歯近心に規格化した歯周組織欠損 (2 mm × 2 mm × 1.7 mm) を作製し、根面のルートプレーニングを行う (Oortgiesen DAW et al. J Clin Periodontol 2012) (図 1)。群分けは欠損内にヒドロキシプロピルセルロース (HPC) のみを応用した群と HACM+HPC を併用した群をスプリットマウスデザインで行う。術後 2 週または 4 週で欠損部の歯周組織治癒過程の形態学的評価として μ CT による骨梁構造解析を行う。組織染色では H-E 染色にて新生骨および上皮の深行増殖を評価し、Azan 染色にて新生歯根膜角度および新生セメント質の観察をする。免疫組織化学染色は VEGF、 α -SMA 染色を行い血管新生に関連する特定遺伝子やタンパク質の発現を評価する。

in vitro では、HACM を PBS 中に溶解した HACM extract (100-500 μ g/ml) を作製し、ELISA にて VEGF および FGF-2 の濃度を測定した。さらに、ラットの上顎前歯より採取した歯根膜由来細胞の培養液中に HACM extract を滴下し、細胞増殖能を WST-1、細胞遊走能を Wound healing assay により評価した (図 2)。

4. 研究成果

(1) マイクロ CT による骨梁構造解析

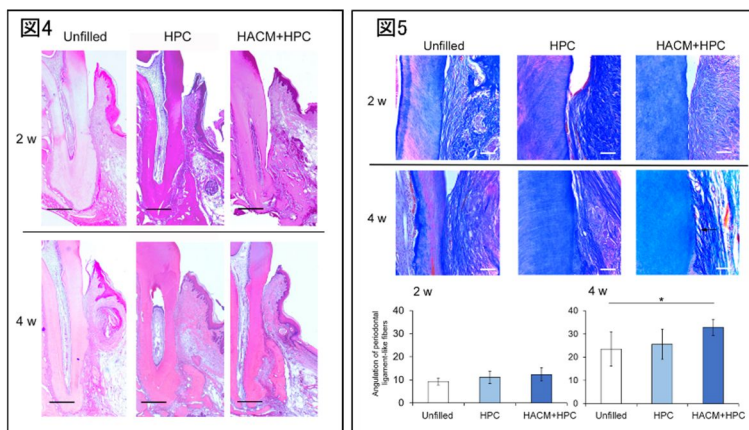
マイクロ CT の矢状・水平断像において HACM+HPC 群では、術後 2 週で著明な新生骨の形成が観察された。骨梁構造解析の結果 Unfilled、HPC 群と比較し、HACM+HPC 群は骨体積率、骨梁幅において有意に高い値を示した。術後 4 週でも同



様に Unfilled, HPC 群と比較し, HACM+HPC 群は骨体積率, 骨梁幅において有意に高い値を示した(図 3)。

(2) 組織学的観察(H-E, Azan 染色)

全ての手術部位において欠損部は新生結合組織で満たされており, 炎症所見は認められなかった。H-E 染色所見では, 術後 2, 4 週において HACM+HPC 群は, Unfilled, HPC 群と比較して, より多くの新生骨様構造を認めた(図 4)。さらに, 歯肉上皮の down-growth に着目すると術後 2, 4 週で HACM+HPC 群は, Unfilled, HPC 群と比較して有意に down-growth は短い結果となった。Azan 染色所見では, 術後 2 週では全ての群で歯根に沿って走行する歯根膜様線維束が認められ, 術後 4 週では, HACM+HPC 群でのみ歯根に沿って斜走する歯根膜様線維束と薄いセメント質様構造が観察された(図 5)。以上のことから HACM を歯根面に設置することで歯肉上皮の進行を抑制し, さらには歯根膜細胞およびセメント質の新生を促していると示唆できる。



(3) 免疫組織化学染色 (VEGF, α -SMA 染色)

VEGF, α -SMA 陽性細胞は, 結合組織内の新生血管近くや新生骨の周囲で観察された。術後 2, 4 週後での VEGF 陽性細胞において HACM + HPC 群は Unfilled 群と比較して VEGF 陽性細胞の割合が有意に高かった。

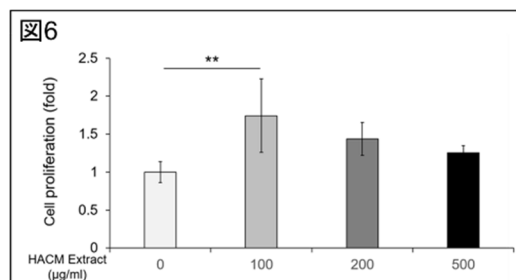
α -SMA 陽性細胞において術後 2 週では群間での有意差は認められず, 術後 4 週では HACM+HPC 群は Unfilled, HPC 群と比較しての α -SMA 陽性細胞の割合が有意に高かった。

(4) HACM extract に含まれるタンパク質の計測

ELISA にて HACM extract 中の成長因子の濃度を計測したところ VEGF: 50 pg/ml, FGF-2: 23 pg/ml が含まれていることが確認された。

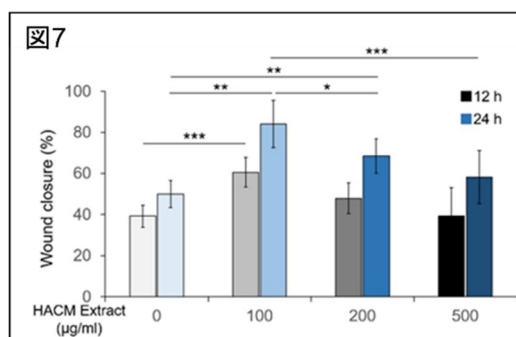
(5) 細胞増殖能の評価(WST-1)

ラット前歯から抽出した歯根膜細胞(rPDLC)の増殖能に対する HACM extract の効果を, WST-1 アッセイで評価した。細胞増殖能は, コントロール群と比較して 100 μ g/ml の HACM Extract は有意に増加した(図 6)。200, 500 μ g/mL の HACM extract はコントロール群と比較して細胞増殖能に有意差は認められなかった。さらに, HACM extract の濃度:100 ~ 500 μ g/mL では, 細胞毒性は認められなかったが, 高濃度:1000 μ g/mL では細胞毒性が認められた。



(6) 細胞遊走能の評価(Wound healing assay)

rPDLC に各濃度 (0-500 μ g/ml) の HACM extract を添加し, scratch 後 24 時間の創傷閉鎖面積を計測して細胞遊走能を評価した。100 ~ 200 μ g/mL の HACM extract は 24 時間でコントロール群と比較して rPDLC の創面閉鎖を促進し, 有意な細胞遊走能が認められた(図 7)。500 μ g/mL の HACM extract では有意な細胞遊走能は認められなかった。



本研究の結果, HACM 応用群は Unfilled, HPC 群と比較し, H-E 染色で新生骨様構造は多く認められ, Azan 染色で歯根に沿って斜走する歯根膜様線維束と薄い新生セメント質様構造が認められた。骨梁構造解析の結果, 骨体積率で有意に大きな値を示した。さらに, 免疫組織化学染色では新生血管形成に關与する遺伝子の発現が認められた。また, HACM に FGF-2 と VEGF の成長因子が含まれており, HACM の抽出液をラット歯根膜細胞に滴下すると細胞増殖能や細胞遊走能を促進することが認

められた。以上から HACM 中に含まれる FGF-2 と VEGF が歯根膜由来細胞の増殖および遊走を促し、歯肉上皮の進行を抑制し、さらには血管新生を促すことで歯周組織治癒を促進させたと示唆された。

引用文献

(1) Anitua E., Troya M. & Orive G. (2012) Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor- β 1-induced myodifferentiation. *J Periodontol* 83:1028-1037.

(2) Russo A., Bonci P. & Bonci P. (2012) The effects of different preservation processes on the total protein and growth factor content in a new biological product developed from human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 13:353-361.

(3) Gupta A., Kedige S.D. & Jain K. (2015) Amnion and Chorion Membranes: Potential Stem Cell Reservoir with Wide Applications in Periodontics. *Int J Biomater* 274082

(4) Holtzclaw D. & Hinze F. (2014) Prevalence of Palatal Exostoses in Patients Who Have Received Periodontal Surgery in the Posterior Maxilla. *Clin Adv Periodontics* 4:203-207.

(5) Agarwal S.K., Jhingran R., Bains V.K., Srivastava R., Madan R. & Rizvi I. (2016) Patient-centered evaluation of microsurgical management of gingival recession using coronally advanced flap with platelet-rich fibrin or amnion membrane: A comparative analysis. *Eur J Dent* 10:121-133.

(6) Oortgiesen D.A., Plachokova A.S., Geenen C., Meijer G.J., Walboomers X.F., van den Beucken J.J. & Jansen J.A. (2012) Alkaline phosphatase immobilization onto Bio-Gide® and Bio-Oss® for periodontal and bone regeneration. *J Clin Periodontol* 39:546-555.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imamura K, Hamada Y, Yoshida W, Murakami T, Nakane-Koyachi S, Yoshikawa K, Saito A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Investigating the effects of dehydrated human amnion-chorion membrane on periodontal healing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12060857	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今村健太郎, 中根咲, 吉田航, 吉川幸輝, 齋藤淳
2. 発表標題 ヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜メンブレン（HACM）の応用が歯周組織の創傷治癒に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Imamura K, Hamada Y, Yoshida W, Yoshikawa K, Saito A
2. 発表標題 To evaluate the effect of Human dehydrated amnion-chorion membranes on periodontal healing in vivo and in vitro.
3. 学会等名 The 107th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村健太郎, 吉田航, 中根咲, 吉川幸輝, 齋藤淳
2. 発表標題 ヒト胎盤由来羊膜・絨毛膜メンブレン（HACM）の応用が歯周組織再生に及ぼす影響
3. 学会等名 第313回東京歯科大学学会例会
4. 発表年 2022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
---------	---------