

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16994

研究課題名（和文）Decorinの組織再生賦活化特性を応用した新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of new periodontal regeneration therapy using Decorin

研究代表者

杉井 英樹（Sugii, Hideki）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80802280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Decorinを歯周組織再生能を有する新規の細胞外マトリックスとして着目し、その歯周組織再生に関わる影響を解析した。歯根膜幹細胞株（PDLSCs）を用いて、その増殖、遊走、分化に及ぼす影響を検討した結果、Decorinは、骨芽細胞様分化を促進する一方、増殖、遊走、および歯根膜関連因子の発現には影響を及ぼさなかった。

次に、ラット歯周組織傷害モデルを用いて、歯周組織再生時のDecorinの発現様式を解析した結果、炎症期から組織再生期への移行期においてその発現が強く上昇することが明らかとなった。以上の結果より、Decorinが歯周組織再生において重要な役割を担ってい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

進行したう蝕、歯周炎により重度の歯周組織欠損が生じた場合、歯根膜および骨の再生が困難となり、抜歯となる。したがって、このような症例を再生する治療法の開発が待ち望まれている。

Decorinは、組織再生に関与する分子で、本研究において、傷害されたラット歯周組織の治癒過程初期における歯根膜、および新生骨の周囲でDecorinの発現が上昇し、さらにDecorinが歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。上記結果より、Decorinは歯周組織再生を促進する因子と考えられ、これを用いて、広範囲の歯周組織欠損を有する症例に対する治療法の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the biological functions of decorin (DCN) in the healing and regeneration of wounded periodontal tissue. We investigated the expression pattern of DCN during the healing of wounded periodontal tissue in rats and the effects of DCN on the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament (PDL) stem cells (HPDLSCs). The expression of DCN was increased around the wounded PDL tissue on day 5 after surgery. Furthermore, DCN promoted the osteoblastic differentiation of HPDLSCs. DCN did not affect proliferation, migration, or the PDL-related gene expression of HPDLSCs. In conclusion, this study demonstrates that DCN has a role in the healing of wounded periodontal tissue. Furthermore, DCN secreted from PDL cells may contribute to bone healing by upregulating osteoblastic differentiation in HPDLSCs, indicating a therapeutic effect of DCN in periodontal tissue regeneration.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：Decorin Periodontal ligament osteoblasts

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行したう蝕、歯周炎により重度の歯周組織欠損が生じた場合、歯根膜および骨の再生が困難となり、抜歯となる。したがって、このような症例を再生する治療法の開発が待ち望まれている。本研究では Decorin を歯周組織再生誘導分子として着目し、その機能を強化するために、Decorin と結合し、歯周組織再生を促進する因子 X を明らかにする。これを用いて、広範囲の歯周組織欠損を有する症例に対する治療法の開発に繋がりたいと考えている。

2. 研究の目的

進行したう蝕、歯周炎により重度の歯周組織欠損が生じた場合、歯根膜および骨の再生が困難となり、抜歯となる。したがって、このような症例を再生する治療法の開発が待ち望まれている。Decorin は、組織再生に関与する分子で、bone morphogenetic protein 2 の結合により、その機能が強化され、広範囲の骨欠損を再生できる。これまでに申請者は、傷害されたラット歯周組織の治癒過程初期における歯根膜、および新生骨の周囲で Decorin の発現が上昇し、さらに Decorin が歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。そこで本研究では Decorin を歯周組織再生誘導分子として着目し、その機能を強化するために、Decorin と結合し、歯周組織再生を促進する因子 X を明らかにすることとした。これを用いて、広範囲の歯周組織欠損を有する症例に対する治療法の開発に繋がりたいと考えている。

3. 研究の方法

1. Decorin と結合し、歯周組織再生を促進する因子のピックアップ Decorin と結合する因子の選別：これまでに申請者は、歯根膜幹細胞株(PDLSC)を IL1 β にて刺激した結果、Decorin の発現が上昇することを明らかにしており、傷害された歯周組織における、IL1 β にて刺激された、治癒過程初期の歯根膜において、Decorin が高発現している可能性が示唆された。本研究では、治癒過程初期の歯根膜において、Decorin に歯周組織再生を促す因子が結合していると仮説を立て、IL1 β を添加した PDLSC よりタンパクを回収し、抗 Decorin 抗体を用いて、免疫沈降を行い、Decorin と結合している因子を選別する。Decorin を高発現する歯根膜で発現が高い因子の選別：ラット歯周組織傷害モデルを用いて、Decorin を高発現する傷害後 3 日の組織切片中の、正常な歯根膜、および治癒過程初期の歯根膜より、Laser capture microdissection 法にて組織採取を行う。さらに、マイクロアレイ解析にて、治癒過程初期の歯根膜において発現が高い因子を選別する。項目およびにおいて共通する因子を、因子 X の候補としてピックアップする。2. 因子 X のスクリーニング 傷害されたラット歯周組織における発現様式：ラット歯周組織傷害モデルを用いて、傷害された歯周組織における治癒過程初期の歯根膜において、候補因子と Decorin における共発現の有無を、免疫蛍光染色にて解析し、Decorin と共発現する因子を選別する。PDLSC に及ぼす影響：組織再生には細胞の分化、増殖、および遊走が重要である。そこで PDLSC を培養し、その表現型を評価する。培養の際に、a. Decorin および候補因子を添加する群、b. Decorin を添加する群、c. 候補因子を添加する群、d. 非添加群を設定し、A) 歯根膜細胞関連因子の発現解析、B) 細胞増殖能解析、C) 細胞遊走能解析を行う。そして、培養後の PDLSC において、歯根膜細胞関連因子の発現、増殖能、および遊走能が最も高い候補因子を、因子 X として絞り込む。3. Decorin と因子 X の併用による歯周組織再生能の検討 ラット歯周組織欠損モデルを用いて、歯周組織欠損部位に、a. コラーゲンゲル、Decorin、および因子 X を移植する群、b. コラーゲンゲルおよび Decorin を移植する群、c. コラーゲンゲルおよび因子 X を移植する群、d. コラーゲンゲルを移植する群を設定し、3D マイクロ CT 撮影により硬組織形成能を評価する。組織切片を作製し、HE 染色および Masson trichrome 染色を用いて歯根膜線維形成能を評価する。骨、セメント質、そして歯根膜の組織分化に関連した、それぞれの抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、そのタンパク発現を評価する。

4. 研究成果

本研究では、Decorin の歯周組織再生能を有する新規の細胞外マトリックスとして着目し、その歯周組織再生に関わる影響を解析していった。まず、in vitro において、PDLSCs を用いて、その増殖、遊走、分化に及ぼす影響を検討した。その結果、Decorin にてコーティングされたディッシュ上で培養された PDLSCs においては、その骨芽細胞様分化が促進される一方で、増殖、遊走、および歯根膜関連因子の発現には影響を及ぼさなかった。以上の結果より、Decorin は PDLSCs の骨芽細胞様分化を促進することで、歯槽骨の再生に寄与している可能性が示唆された。次に、in vivo において、当研究室で樹立されたラット歯周組織傷害モデルを用いて、その歯周組織再生時の Decorin の発現様式を解析した。その結果、炎症期から組織再生期への移行期においてその発現が強く上昇することが明らか

となった。また、炎症性サイトカインによって刺激された歯根膜細胞において Decorin が産生されることから、Decorin が歯周組織再生において重要な役割を担っていることが推察された。上記の内容に関して、Molecules に「Decorin Promotes Osteoblastic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells」というタイトルで、2022 年 11 月に論文発表を行った。また、2022 年 6 月には、第 156 回日本歯科保存学会学術大会にて、「Decorin によるヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化誘導に関する分子機構の解明」という演題でポスター発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugii Hideki, Albougha Mhd Safwan, Adachi Oriie, Tomita Hiroka, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Itoyama Tomohiro, Maeda Hidefumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Activin A Promotes Osteoblastic Differentiation of Human Preosteoblasts through the ALK1-Smad1/5/9 Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13491 ~ 13491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413491	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 -
1. 著者名 Yoshida Shinichiro, Sugii Hideki, Itoyama Tomohiro, Kadowaki Masataka, Hasegawa Daigaku, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Ipposhi Keita, Yamashita Kozue, Maeda Hidefumi	4. 巻 130
2. 論文標題 Development of a novel direct dental pulp-capping material using 4-META/MMA-TBB resin with nano hydroxyapatite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112426 ~ 112426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112426	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 Sugiura Risa, Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Sugii Hideki, Fujino Shoko, Adachi Oriie, Kadowaki Masataka, Yamashita Daiki, Maeda Hidefumi	4. 巻 10
2. 論文標題 PAX9 Is Involved in Periodontal Ligament Stem Cell-like Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by Regulating Extracellular Matrix	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10102366	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 -
1. 著者名 Kadowaki Masataka, Yoshida Shinichiro, Itoyama Tomohiro, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Hasegawa Daigaku, Sugii Hideki, Kaneko Hiroshi, Sugiura Risa, Maeda Hidefumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of M1/M2 Macrophage Polarization in Reparative Dentin Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1812 ~ 1812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12111812	査読の有無 無
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 Adachi Orie, Sugii Hideki, Itoyama Tomohiro, Fujino Shoko, Kaneko Hiroshi, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Hasegawa Daigaku, Obata Junko, Yoshida Shinichiro, Kadowaki Masataka, Sugiura Risa, Albougha Mhd Safwan, Maeda Hidefumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Decorin Promotes Osteoblastic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 8224 ~ 8224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27238224	査読の有無 無
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 杉井英樹、Mhd Safwan Albougha、足立織利恵、富田洋嘉、友清淳、濱野さゆり、長谷川大 学、吉田晋一郎、糸山知宏、小幡純子、前田英史。
2. 発表標題 Activin A によるヒト前骨芽細胞の分化誘導 に関わるシグナル伝達の解析
3. 学会等名 第155回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideki Sugii, Mhd Safwan Albougha, Ori Adachi, Hiroka Tomita, Atsushi Tomokiyo, Sayuri Hamano, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Junko Obata, Tomohiro Itoyama, Taiga Ono, Keita Ippoushi and Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Activin A mediates the ALK1-Smad1/5/9 pathway during osteoblastic differentiation of human pre-osteoblasts.
3. 学会等名 The 99th General Session & Exhibition of the IADR. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田晋一郎、杉井英樹、糸山知宏、門脇正敬、一法師啓太、山下梢、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、前田英史。
2. 発表標題 Nano Hydroxyapatite 含有 4-META/MMA-TBB レジンは、Calcium-sensing receptor-MEK/ERK 経路を介してヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進する。
3. 学会等名 第 154 回日本歯科保存学会春季学術大会。
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立織利恵、杉井英樹、糸山知宏、兼子大志、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、小幡純子、吉田晋一郎、藤野翔香、Mhd Safwan Albougha、前田英史
2. 発表標題 Decorinによるヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞様分化誘導の分子機構の解明
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会学術大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉井英樹、吉田晋一郎、Mhd Safwan Albougha、足立織利恵、友清淳、前田英史
2. 発表標題 Nano Hydroxyapatite含有4-META/MMA-TBBレジンがヒト歯根膜幹細胞のセメント芽細胞様分化に及ぼす影響について
3. 学会等名 43回日本歯内療法学会学術大会
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
---------	---------