

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592182
 研究課題名（和文）濃度勾配を付与した FGF-2 による 1 壁性骨欠損に対する
 歯周組織再生に関する研究
 研究課題名（英文） The effect of gradient FGF-2 on one-wall intrabony
 defect of periodontal tissue
 研究代表者
 島袋 善夫（SHIMABUKURO YOSHIO）
 大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
 研究者番号：50231361

研究成果の概要（和文）：FGF-2 が MPDL22 の増殖および遊走活性を促進することが確認され、この FGF-2 誘導性の遊走促進作用には PI3K 経路および akt 経路の関与が示唆された。さらに遊走と関連していると考えられているヒアルロン酸もまた FGF-2 誘導性 MPDL22 の遊走に関与していることが示唆された。FGF-2 は ADSC による歯槽骨欠損部の骨再生効果を、増強させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The present study showed that FGF-2 activated MPDL-22 proliferative reaction and cell migration and that the FGF-2-induced activity of cell migration was dependent on PI3K and akt pathway. Hyaluronan was also associated with the FGF-2-activated cell migration. FGF-2 enhanced the regenerative effect on periodontal tissue induced by ADSC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：歯学・医用工学・再生歯学
 キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景
 歯周病治療において、近年 GTR や EMD など
 を応用した歯周組織の再生療法が定着し

つつある。しかしながら、これらの方法は、
 適応となる症例が限定的であり、著しい骨欠
 損や 1 壁性や 2 壁性の骨欠損に対しては必

ずしも良好な結果が得られているわけではない。

歯周組織の再生を誘導する手法として、サイトカインや幹細胞などを用いる方法が有望な手段として注目されている。サイトカインの中でも **FGF-2** は歯周組織の再生で重要な役割を果たす歯根膜細胞への増殖活性を有するために、歯周組織再生へのその応用が考えられた。濃度勾配をつけた **FGF-2** を1ないし2壁性の骨欠損に添加して、歯根膜組織や骨組織をより高位の位置へ積極的に遊走させることで、高いレベルにまで歯周組織を再生させることを期待した。また脂肪組織由来幹細胞(ADSC)は骨、軟骨、脂肪などの由来となる間葉系細胞に分化する能力を持つ成熟幹細胞である。そこで歯周組織再生への応用としてこの ADSC に着目した。

2. 研究の目的

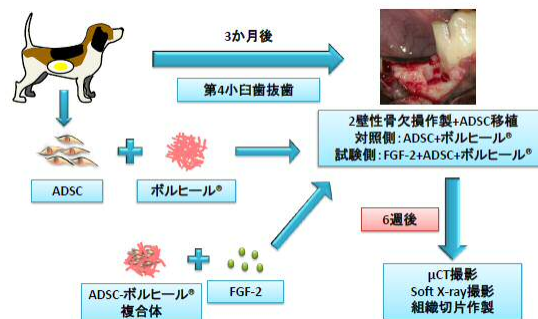
- (1) FGF-2が歯根膜細胞の増殖遊走活性へ及ぼす影響とそのメカニズム解析
- (2) ADSCによる歯周組織再生効果に及ぼす FGF-2の影響についての検討

3. 研究の方法

(1) 実験においてはマウス由来の歯根膜細胞のクローニングをおこない、アルカリフォスファターゼ活性ならびに硬組織形成能の高いクローンであるMPDL22を樹立し、実験に供した。遊走実験は、24穴培養プレート内にfilterメンブレン(6 μ m pore)を用いて、ウェル内を上下層に分け、filter上部に播種した細胞が一定時間内にメンブレン下に遊走した細胞数を計測して遊走能を評価した。また一部の実験ではチャンバースライド内にsiliconシートを静置した後に細胞を播種し、siliconシートにて細胞を排除して培養をおこなった。siliconシートの除去とともにFGF-2を添加して、細胞free spaceに遊走してきた細胞数を計測することによって遊走活性を評価した。PI3Kおよびaktの測定はそれぞれ、免疫アッセイキットを用いた。培養上清中のヒアルロン酸(HA)はinhibition

binding-protein assay kitを用いて測定した。ヒアルロン酸の分子量はagrose electrophoresisを応用して既知の分子量のHAを指標に解析した。細胞表面上のCD44分子はフローサイトメトリーを用いて解析した。細胞組織学的な解析は免疫蛍光法を用いた。ヒアルロン酸合成酵素mRNAはリアルタイムPCRを用いて解析した。

(2) ビーグル犬よりあらかじめ脂肪組織を採取し、ADSCを *in vitro* にて培養、継代した。ビーグル犬下顎第四小臼歯を抜去し、3ヶ月後に2壁性の骨欠損を作成し、同欠損部へ autoADSCを添加した。試験側にはフィブリン接着剤であるボルヒール®(FGF-2)混和物を、一方対照側にはADSC+ボルヒール®のみを添加した。6週後にビーグル犬を屠殺し、欠損作成部位のマイクロCTおよび soft X-ray 撮影をおこない、下顎骨を摘出して通法に従って脱灰して組織切片を作成した。



4. 研究成果

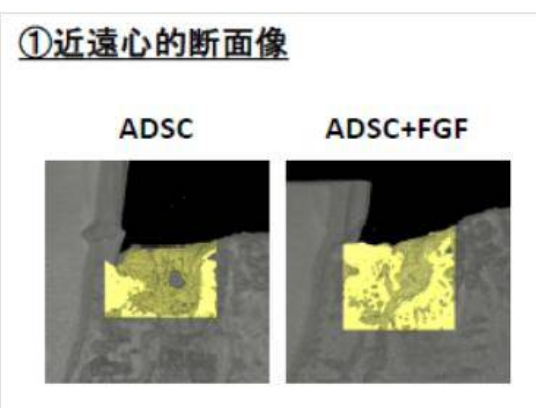
FGF-2がMPDL22の増殖活性を促進することが確認され、さらにはfilterメンブレンを用いた遊走アッセイにおいても、またsiliconシートにて細胞を排除した細胞フリースペースを作成した遊走アッセイ、いずれのアッセイ法においてもMPDL22の遊走活性を促進することが明らかになった。FGF-2により促進されるMPDL22の遊走活性はPI3Kシグナル伝達系の阻害剤である、Wortmannin and LY294002およびakt阻害剤により抑制される一方、FGF-2はMPDL22によるPI3K

およびaktシグナルを亢進していることが確認された。さらにPI3K阻害剤はMPDL22におけるFGF-2誘導性のakt活性をも抑制していた。またFGF-2刺激を受けたMPDL22は、ヒアルロン酸合成酵素-1, -2および-3mRNAの発現亢進およびヒアルロン酸産生を上昇させた。またFGF-2はヒアルロン酸の結合分子である細胞表面上のCD44分子発現を亢進させ、またFGF-2刺激を受けたMPDL22はCD44を介したヒアルロン酸avidityも上昇した。加えて、抗CD44抗体およびCD44siRNAはFGF-2によって誘導されたMPDL22の遊走を抑制することが明らかとなった。以上のことから、FGF-2はPI3Kならびにakt経路を介して、またCD44/ヒアルロン酸経路を介してMPDL22の遊走を促進していることが強く示唆された。

動物実験に関しては、当初濃度勾配付与FGF-2による1ないし2壁性骨欠損の歯周組織再生を試みた。その後より安定して良好な結果を得るためにADSCとFGF-2の組み合わせによる歯周組織再生実験をおこなった。

ADSC移植によっても欠損側の骨の増生がみられたが、FGF-2はさらに新生骨を増加させた(図1、2)。組織学的な検索からも、FGF-2添加群では上皮のダウングロスは少なく、骨梁が著しく発達していた。またADSC単独群およびADSC+FGF-2群ともに歯根面の異常な吸収像やアンキローシスなどの非生理的な所見なども認められなかった。従って、FGF-2はADSCによる歯槽骨欠損部の骨再生効果を、増強させることが明らかとなり、このことからADSCにFGF-2を添加することで、残存骨壁の少ない歯周病骨欠損に対する有用な治療法となりうることが示唆された。

図1



②新生骨体積

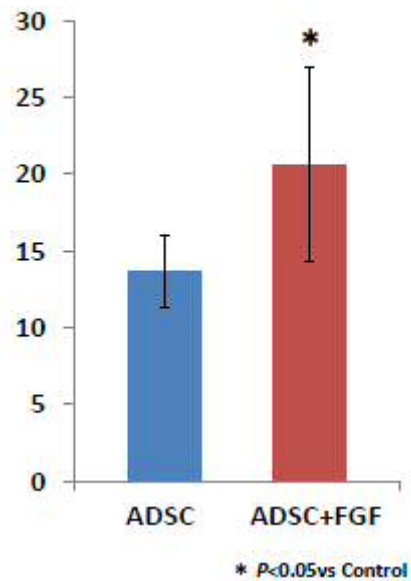
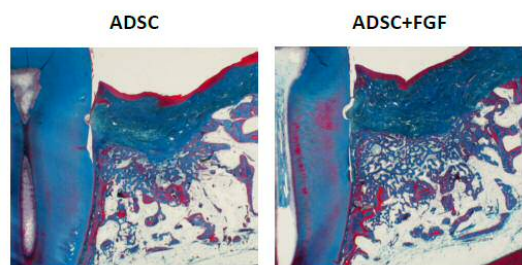


図2



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① 論文名 : Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived stem cells.

全執筆著氏名 (候補者氏名に下線) Masahide Takedachi, Keigo Sawada,

Satomi Yamamoto, Masao Ozasa, Yoshio Shimabukuro, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami.

掲載誌名・巻号・頁・発表年月：Journal of Oral Biosciences・in press

〔学会発表〕（計1件）

The 6th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC)

2nd Meeting of the International Association for Dental Research - Asia Pacific Region

2013/4/13

title:EVALUATION OF PERIODONTAL TISSUE REGENERATION BY TRANSPLANTATION OF ADIPOSE-TISSUE DERIVED STEM CELLS

Keigo Sawada, Masahide Takedachi, Masao Ozasa, Tomoaki Iwayama, Takenori Nozaki, Takushi Tauchi, Koji Miki, Mitsuyoshi Iyama, Jun Anzai, Toshie Nagayasu, Akio

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島袋善夫 (SHIMABUKURO YOSHIO)

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：50231361

(2) 連携研究者

山田 聡 (YAMADA SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00362682

(平成23年2月28日まで参画)