

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592890

研究課題名(和文) 生体活性ガラスと再生促進因子を応用した根尖部歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for periapical bone defect using a combination of bioactive glass and bone regeneration-stimulating factor

研究代表者

阿南 壽 (Anan, Hisashi)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80158732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット根尖病変モデルにPSリポソーム(PSL)を応用した結果、早期にBMP-2およびALPの発現が亢進されたことより、破壊された根尖部歯周組織の治癒が促進された可能性が推察された。また、生体活性ガラス(bioactive glass 以下 BAG) とPSLを併用することにより、骨欠損部では活発な新生骨の形成が認められたことより、骨窩洞内への生体活性ガラスと再生促進因子(PSL)の応用は消失した骨組織の再生を誘導する可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)：Periapical lesions were induced in the mandibular first molars of rats, and then PS liposomes (PSL) were applied to the exposed periapical tissues. In the PSL-treated rats, cells expressing BMP-2 rapidly increased in number, and newly formed reparative bone tissues showing strong alkaline phosphatase activity were observed earlier and larger in amount than that seen in the phosphate-buffered saline (PBS)-treated rats. It is suggested that PSL may create a favorable environment that promotes the healing of destroyed periapical tissues.

In addition, active new bone formation was observed in the bone defect with a combination of bioactive glass (BAG) and PS. The findings suggested that osteogenesis in bone cavities can be promoted through combined use of PSL and BAG.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PSリポソーム 生体活性ガラス BMP-2 ALP 骨形成 創傷治癒 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、歯周組織の創傷治癒過程において、マクロファージが破壊と修復の両面に関与しており、治癒もしくは破壊へ向かう分岐点において重要な働きをする細胞であることが示唆されている (Riches D 他 The molecular and cellular biology of wound repair. 2ed. 1996)。さらに最近では、炎症性細胞が食後、アポトーシスを起こすことにより抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  の発現が亢進すること (Valerie A et al. J Clin Invest 101, 890-898, 1998) や、invitro の実験系でマクロファージ系細胞が骨形成因子である BMP-2 を産生することが報告されている (Champagne C et al. Bone 30, 26-31, 2002)。しかし、根尖部歯周組織再生の分野でマクロファージの BMP の発現に焦点をあて、解析した報告は認められない。

(2) 生体活性ガラス (BAG) に関しては、骨補填剤 (水沼一昭他、日口腔インプラント誌、1999) や人工歯根のコーティング材 (山森徹雄他、補綴誌、1992) としての臨床応用の検討がなされてはいるものの、BAG と再生促進因子を骨欠損部に応用し、骨形成への影響を解析した報告は少ない。

(3) 細胞膜リン脂質の phosphatidylserine を含むリポソーム (PSL) は破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への成熟を抑制し、慢性関節リウマチの動物モデルにおける骨破壊を抑制することが知られている (Wu et al, J Immunol, 2010; 184: 3191-3201)。一方、骨形成への影響を解析した報告は少ない。そこで今回、ラット骨欠損モデルを用いて、PS リポソームと生体親和性に富む BAG が骨形成に及ぼす影響について検索した。

### 2. 研究の目的

ラット骨欠損モデルを用いて、PS リポソームと生体親和性に富む BAG が骨形成に及ぼす影響について検討する。

### 3. 研究の方法

#### 実験

ラットの下顎第一臼歯遠心根を抜髄、開放することにより、自然感染による根尖病変の成立を計った。術後 7 日目に、根管内に PS リポソームまたは生理食塩液 (SALINE) を貼薬した。その後、3 日および 7 日目に、根尖病変部における骨吸収因子である RANKL および TRAP の発現、骨形成因子である BMP-2 および ALP の発現ならびにマクロファージ、破骨細胞および骨芽細胞の動態について組織化学的に解析した。

#### 実験

1. BAG の作成 : SiO<sub>2</sub>; 53 wt%, CaO; 20 wt%, Na<sub>2</sub>O; 23 wt%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 4 wt% の組成のガラスを溶融法によって合成した後、粉碎してふるいに通し、粒径 100  $\mu$ m 以上の粉末を得た後、

乾熱滅菌 (200  $^{\circ}$ C, 20 分) を行った。

2. PS リポソームの調整 : PS リポソーム (PSL) は Wu らの方法に基づいて行った。すなわち、phosphatidylcholine (PC) と PSL の乾燥リン脂質フィルムを molar ratio 7:3 の割合で PBS に溶解し、氷上で 10 分間超音波振動を与えて溶解した。0.22  $\mu$ m のフィルター滅菌を行い、調整から 3 日以内に実験に供した。

3. 動物実験 : 10 週齢雄性 Wistar 系ラット 37 匹を用いた。イソフルランによる吸入麻酔後、ラット頭頂部を剃毛し切開線を入れ、皮膚および骨膜を剥離反転した。注水下でトレフィンバー (GC 社製、直径 5 mm) により、円形の骨欠損を作製した。欠損部に BAG を 6 mg + PBS 10  $\mu$ l 埋入、BAG 6 mg + リポソーム 10  $\mu$ l 添加、コントロール群として何も埋入しないの 3 種類を施した。その後、骨膜と皮膚をそれぞれ縫合した。処置の 2、4、8 週間後に屠殺し、4% paraformaldehyde 水溶液で灌流固定を行い、頭部を取り出した後、 $\mu$ CT (SKYSCAN, Bruker Corporation 社製) にて解析を行った。

#### 実験

ラット上顎第一臼歯近心根の歯根尖切除部に BAG と PSL を填入し、その治癒過程を組織学的に解析した。

### 4. 研究成果

#### 実験

生理食塩液投与群の歯周組織病変部においては ED1 陽性マクロファージの浸潤が認められ (図 1A)、TRAP 陽性破骨細胞ならびに RANKL 陽性細胞が多く観察された (図 1B, C)。一方、PS リポソーム投与群では生理食塩液投与群に比較して、ED1 陽性マクロファージの浸潤が多く観察されたが (図 1D)、TRAP 陽性破骨細胞ならびに RANKL 陽性細胞は少数であった (図 1E, F)。

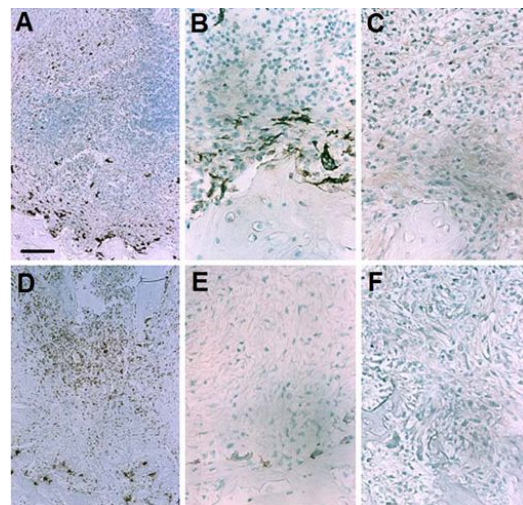


図1 根尖性歯周炎モデルにおける ED1, TRAP ならびに RANKL の発現に及ぼす PS リポソームの影響

また、PS リポソーム投与群の根尖病変は生理食塩液投与群と比較して著しく縮小し、骨面では骨芽細胞が層状に配列すると共に、新生骨の活発なリモデリング像が観察された(図 2A,C)。さらに、骨形成因子である BMP-2 ならびに ALP の発現は PS リポソーム投与群において生理食塩液投与群と比較して有意に多く認められた(図 2A-D)。

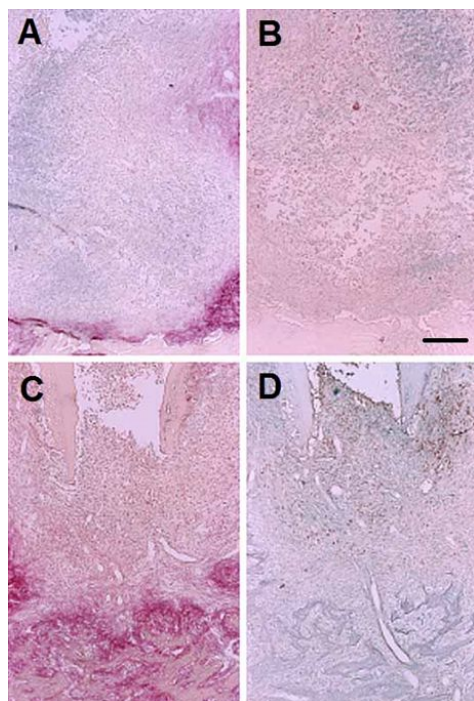


図2 根尖性歯周炎モデルにおけるALPならびにBMP-2の発現に及ぼすPSリポソームの影響

#### 実験

1. コントロール群、BAG 群 および BAG + PS リポソーム添加群においてラットに体重の変化は認められなかった。
2. コントロール群では実験期間を通して骨欠損部に硬組織形成は認められなかった。
3. BAG 群では、処置後 2 週齢における骨欠損部に、BAG 周囲に硬組織の形成像はほとんど認められなかった。処置後 4 週齢では、BAG を核にして、新規の硬組織様石灰化物が少数、散在性に認められた。8 週齢では、骨欠損部に BAG を中心にして不透過性の亢進した像が多数認められた。
4. BAG + PS リポソーム添加群では処置後 4 週目から骨欠損部に BAG を中心にして不透過性の亢進した像が認められた(図 3)。

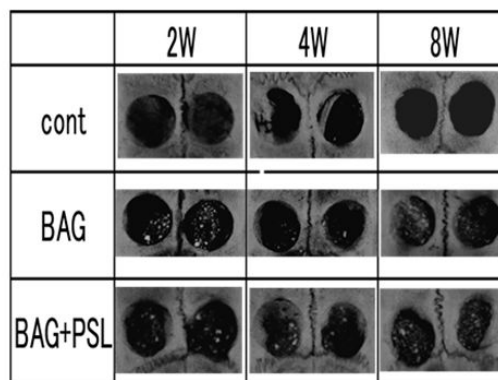


図3 BAG + PS リポソーム添加群では、術後 4 週目から骨形成が促進されていた。

#### 実験

歯根尖切除部の骨創腔内では、術後4週目においては大部分が骨組織で満たされていた。生体活性ガラス(BAG)はハイドロキシアパタイトと同様にリン酸カルシウム系材料の一つである(Hench LL 他、J Biomed Mater Res 1971)。これまでBAG に関しては骨補填剤(水沼一昭他、日口腔インプラント誌、1999)や人工歯根のコーティング材(山森徹雄他、補綴誌、1992)としての臨床応用の検討がなされており、歯科領域においても実際にいくつかの製品が市場に出ている。このBAG を骨組織が再生するための足場(scaffold)として利用し、骨誘導因子であるPSリポソームと併用することで、より高い骨形成能が得られるものと考え、その検証を目的として今回の実験を行った。その結果、BAG + PSリポソーム添加群の4週目において、骨欠損部における骨形成能の亢進が認められた(図4)。

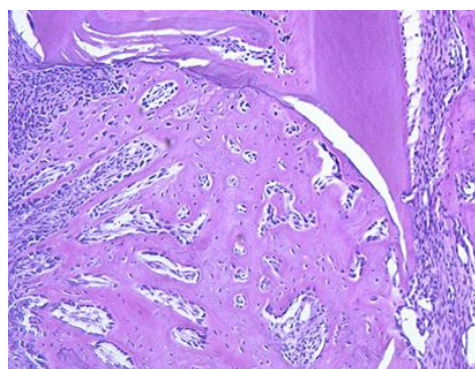


図4 根尖周囲の骨窩洞は新生骨組織で満たされていた。

骨髄細胞培養系において、PSリポソームはTRAP陽性の多核細胞破骨細胞の形成を用量依存的に減少させることが明らかとなっている。また、PSリポソームは腹腔マクロファージにおいて抗炎症作用を持つPGE<sub>2</sub>ならびにTGF-1の産生分泌を誘導し、LPS刺激による強力な炎症性サイトカインであるTNF- の産生分泌

を抑制することが報告されている。これらのことと今回の実験結果より、BAG + PSリポソーム添加群ではBAG群と比較して、早期に硬組織形成が促進されたことが推察された。

#### 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 11 件)

1. 熱刺激が歯髓由来細胞の増殖能および分化能に与える影響:

諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 水上正彦, 松本典祥, 春名千英子, 泉利雄, 阿南壽. 日歯保存誌、査読有、2012; 55: 304-312.

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009596712>

2. 低栄養条件下で熱刺激が象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響:

諸富孝彦, 北村知昭, 水上正彦, 板家圭祐, 牛尾悟志, 福田泰子, 松本典祥, 春名千英子, 松浦洋志, 泉利雄, 阿南壽. 日歯内療誌、査読有、2012; 33: 105-112.

3. Salivary levels of cortisol and chromogranin A in patients with burning mouth syndrome:

A case-control study: Shigeyama-Haruna C, Soh I, Yoshida A, Awano S, Anan H, Ansai T: Journal of Stomatology 2013, 3, 39-43. doi:10.1001/jama.1992.03480090092034

4. 破壊されたラット根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain®gel の効果の解明: 松本典祥, 水上正彦, 春名千英子, 諸富孝彦, 泉利雄, 阿南壽. 日歯内療誌、査読有、2013; 34: 22-28.

5. Leucine-rich Amelogenin Peptide による軟骨形成の誘導:

畠山純子, 畠山雄次, 春名千英子, 松本典祥, 諸富孝彦, 泉利雄, 沢禎彦, 笹野泰之, 阿南壽. 日歯保存誌、査読有、2013; 56: 560-569. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009830615>

6. 非接触型歯科用分光光度計を用いた漂白効果と後戻りの評価:

大野知子, 内藤徹, 阿南壽, 佐藤博信. 日歯保存誌、査読有、2013; 56: 69-77. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009596784>

7. 下顎脛の腫脹を伴う歯内-歯周疾患

型病変の診断および治療における歯科用コーンビームCTの有用性: 牛尾悟志, 松本典祥, 水上正彦, 泉利雄, 諸富孝彦, 春名千英子, 福田泰子, 逸見晃司, 板家圭祐, 阿南壽. 日歯保存誌、査読有、2013; 56: 150-155.

8. Continuous fever-range heat stress induces thermotolerance in odontoblast-lineage cells: Morotomi T, Kitamura C, Okinaga T, Nishihara T, Sakagami R, Anan H. Archives of Oral Biology、査読有、2014: 59; 741-748. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.03.014

9. The effect of growth differentiation factor-5, 6, 7 in chondrogenic cell differentiation of ATDC-5: Hatakeyama Y, Matsuda Y, Hatakeyama J, Oka K, Anan H, Tsuruga E, Inai T, Ishikawa H, Sawa Y. American Journal of BioScience、査読有、2014; 2: 188-192. DOI: 10.11648/j.ajbio.20140205.13

10. ストロンチウム含有試作生体活性ガラスの骨形成能の病理組織学的検討: 泉利雄 丸田道人 板家圭祐 水上正彦 松本典祥 畠山純子 中山英明 松家茂樹 阿南壽. 日歯保存誌、査読有、2014; 57: 492-501. <http://dx.doi.org/10.11471/shikahozon.57.492>

11. Histological evaluation of the effects of Emdogain gel on injured root apex in rats: Matsumoto N, Minakami M, Hatakeyama J, Haruna C, Morotomi T, Izumi T, Anan H. J Endod、査読有、2014;40 : 1989-1994. DOI: 10.1016/j.joen.2014.08.024.

[学会発表](計 15 件)

1. 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 阿南壽. 熱刺激後に生存する象牙芽細胞様細胞は増殖能と基質形成能が亢進する. 136 日本歯科保存学会春季学術大会, 2012.6.28-29. (沖縄県宜野湾市)

2. 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 阿南壽. 象牙芽細胞様株化細胞への軽度熱刺激による熱耐性誘導機構の解析. 137 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会, 2012.11.22-23. (広島市)

3. 牛尾悟志, 阿南壽, 松本典祥, 水上正彦, 泉利雄, 諸富孝彦, 春名千英子, 福田泰子,

逸見晃司, 板屋圭祐. 下眼瞼の膨張を伴う  
歯内?歯周疾患 型病変の一症例. 137 日本歯  
科保存学会 2012 年度秋季学術大会,  
2012.11.22-23. (広島市)

4. 泉利雄, 福田泰子, 板屋圭祐, 春名千英  
子, 松本典祥, 諸富孝彦, 阿南壽.  
Strontium 含有試作 Bioactive glass の生体  
親和性. 137 日本歯科保存学会 2012 年度秋季  
学術大会, 2012.11.22-23. (広島市)

5. 春名千英子, 泉利雄, 諸富孝彦, 松本典  
祥, 福田泰子, 水上正彦, 牛尾悟志, 逸見  
晃司, 板屋圭祐, 阿南壽. 口腔乾燥症患者  
におけるストレス性内分泌ホルモンの解析.  
137 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会,  
2012.11.22-23. (広島市)

6. Morotomi T, Kitamura C, Terashita M,  
Nishihara T, Anan H. Heat-stress induces  
odontoblast differentiation on clonal  
dental pulp cell. 91General Session &  
Exhibition of the International  
Association for Dental Research, 3.23-26.  
(Seattle, Washington, USA)

7. Morotomi T, Kitamura C, Terashita M,  
Izumi T, Haruna C, Matsumoto N, Anan H.  
Analysis of thermotolerant mechanism  
induced by continuous mild heat stress on  
odontoblast-like cell KN-3. 9<sup>th</sup> World  
Endodontic Congress 2013, 5.23-26.  
(Tokyo)

8. Matsumoto N, Minakami M, Izumi T,  
Morotomi T, Haruna C, Ushio S, Fukuda Y,  
Itaya K, Henmi K, Anan H. Histologic  
evaluation of effects of emdogain gel on  
injured rat root apex. 9<sup>th</sup> World Endodontic  
Congress, 2013, 6.23-26. (Tokyo)

9. 水上正彦, 阿南壽, 北河憲雄, 稲井哲一  
朗. ヒト角化細胞 HaCaT におけるタイト結合  
形成機序の研究. 138 日本歯科保存学会,  
2013. 6. 27-28. (福岡市)

10. 諸富孝彦, 泉利雄, 水上正彦, 西崎竜  
司, 稲永晃子, 阿南壽, 北村知昭. ストロ  
ンチウム置換生体活性ガラスは in vitro に  
おいて象牙芽細胞様株細胞の分化を促進す  
る. 139 日本歯科保存学会, 2013. 10. 17-18.  
(秋田市)

11. 板家圭祐, 泉 利雄, 水上正彦, 松本  
典祥, 畠山純子, 中山英明, 阿南 壽. Sr 含  
有生 体活性ガラスの骨形成能の病理組織学

的検索. P75 日本歯科保存学会, H26 年 6 月  
19-20 日. (滋賀)

12. 松本典祥, 水上正彦, 中山英明, 畠山  
純子, 松崎英津子, 泉 利雄, 阿南 壽.  
破壊されたラット根尖孔でのセメント質形  
成に及ぼす EmdogainRgel の効果の解明. o-  
第 14 回日本外傷歯学会, 平成 26 年 7 月  
26-27 日. (大阪)

13. 松本典祥, 畠山純子, 赤尾瑛一, 泉健  
太郎, 西崎竜司, 中山英明, 水上正彦, 泉  
利雄, 阿南 壽. PS リポソームと生体活性ガ  
ラスを応用した骨欠損修復法の開発. P166 第  
141 回日本歯科保存学会, 平成 26 年 10 月 31  
日. (山形)

14. 畠山雄次, 松田裕子, 畠山純子, 岡曉  
子, 阿南 壽, 稲井哲一朗, 石川博之, 沢  
禎彦. The study of functional  
differentiation of GDFs in chondrocyte  
cell kinetics. 0 0 0 第 5 6 回歯科基礎医  
学会, 2014 年 9 月 25 日-27 日. (福岡市)

15. 畠山純子, 木附智子, 合島怜央奈, 村  
田直久, 畠山雄次, 阿南 壽, 城戸瑞穂.  
口腔粘膜におけるメカノセンサーPiezo の発  
現. 第 5 6 回歯科基礎医学会, 2014 年 9 月  
25 日-27 日. (福岡市)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

阿南 壽 (ANAN HISASHI )  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 80158732

### (2) 研究分担者

諸富孝彦 (MOROTOMI TAKAHIKO )  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 10347677

泉 利雄 (IZUMI TOSHIO )  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 40248547

### (3) 連携研究者

なし