

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792114

研究課題名(和文) 歯肉線維芽細胞による骨芽細胞および骨膜細胞の機能発現の亢進

研究課題名(英文) Enhancement of functional expression of osteoblastic and periosteal cells by gingival fibroblasts with paracrine effect of fibroblastic growth factors

研究代表者

山田 将博 (YAMADA, MASAHIRO)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90549982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉線維芽細胞は、非細胞間接触相互作用により、FGF-1および-18を傍分泌し、近傍の骨芽細胞のFGF-1および-18の自己分泌を促進させ、骨芽細胞の細胞増殖活性および骨基質産生能を亢進させること、また、同様の相互作用により骨膜細胞の機能発現を亢進させた。そのため、歯肉結合組織移植片直下において経年的な骨増生が生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gingival fibroblasts enhanced osteoblastic and periosteal proliferation and differentiation. The mechanism was involved in paracrine secretion of FGF-1 and -18 from GF and subsequent autocrine secretion of these growth factors from osteoblasts and periosteal cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生 線維芽細胞増殖因子 歯肉結合組織 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療において、審美的獲得のため、しばしばインプラント周囲上皮下結合組織移植が行われる。近年、上皮下結合組織移植部位直下の経年的歯槽骨増生の事例がいくつか臨床報告されている。また、豊富な上皮下結合組織の存在は歯槽骨増生術の予知性を向上させると臨床的に考えられている。しかし、その細胞生物学的機序は不明である。その機序が解明されれば、インプラント周囲組織増生術の発展にとって有益な情報となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上皮下結合組織由来の線維芽細胞が骨芽細胞および骨膜細胞の機能発現に与える影響を細胞培養試験的に調べ、上皮下結合組織が歯槽骨増生へ寄与する細胞生物学的機序の一端を示すことである。

3. 研究の方法

ラット硬口蓋歯肉由来線維芽細胞、頭蓋由来骨芽細胞および骨膜細胞を用いた培養研究を行う。骨芽細胞(もしくは骨膜細胞)と線維芽細胞の個別培養、混合培養、共培養をそれぞれ行い、一定期間培養後、細胞増殖能、骨関連基質遺伝子発現、骨芽細胞表現型発現の解析、FGF やその受容体をはじめとしたタンパク質の網羅的にすることにより、歯肉線維芽細胞は骨芽細胞もしくは骨膜細胞の機能発現を亢進するかどうかの検証、またそれら細胞間に生じる細胞間インタラクションの分析を行い、上皮下結合組織が歯槽骨増生へ寄与する細胞生物学的機序の一端を示す。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞様細胞(OB)を口腔粘膜細胞(MC)もしくは骨膜細胞(PSc)で物理的接触させて共培養(Direct co-culture)したものの、PSc と OB を物理的接触無しに共培養 (Indirect co-culture) ものでは OB 単一培養に比べて、培養 3 日目の OB のアルカリフォスファターゼ (ALP)活性は低下した。一方、OB と MC の Indirect co-culture では OB の ALP 活性は増加した。

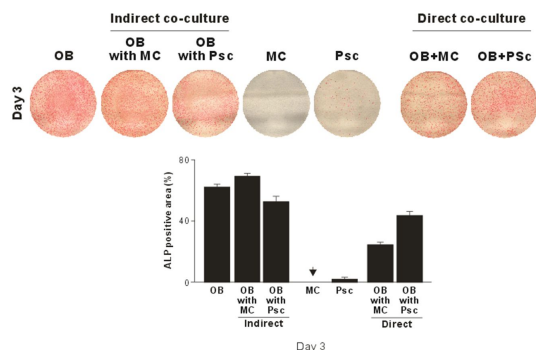


図 1 ラット大腿骨由来骨芽細胞様細胞、口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞もしくは骨膜細胞と接触式もしくは非接触式に共培養した骨芽細胞の培養 3

日後の ALP 染色結果

(2) OB を MC もしくは PSc で Direct co-culture したものでは OB 単一培養に比べて、培養 14 日目の細胞外基質石灰化度は低下した。一方、OB を PSc で Indirect co-culture したものでは変わらなかったが、MC で Indirect co-culture したものでは、OB 単一培養に比べて、石灰化基質面積は増加した。

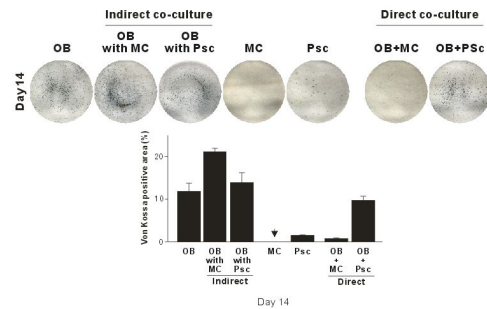


図 2 ラット大腿骨由来骨芽細胞様細胞、口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞もしくは骨膜細胞と接触式もしくは非接触式に共培養した骨芽細胞の培養 14 日後の von Kossa 染色結果

(3) 培養 7 日目において、MC は線維芽細胞増殖因子(FGF)-1 および-18 の発現が高かった。一方、OB では、それらの発現は低い、その受容体(FGFR)1-3 の発現は高かった。OB を MC と Indirect co-culture したものでは、OB の FGF-1 と-18 および Osteocalcin の発現が向上し、かつ、FGF-2、Osterix、Runx2/Cbfa1 および BMP-2 の発現は低下した。FGF-18 の発現が高い PSc と Indirect co-culture した OB では、FGF-1、-2 と-18、Osterix、Runx2/Cbfa1、BMP-2 および Osteocalcin の発現は低下した。

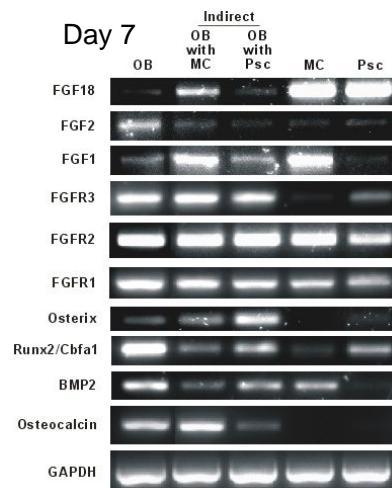


図 3 ラット大腿骨由来骨芽細胞様細胞、口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞もしくは骨膜細胞と非接触式に共培養した骨芽細胞の培養 7 日後の RT-PCR 遺伝子発現解析結果

(4) 培養 4 日目において、OB を MC もしくは PSc で Indirect co-culture したものでは、OB 単

一培養に比べて、OB の細胞増殖活性は増加した。

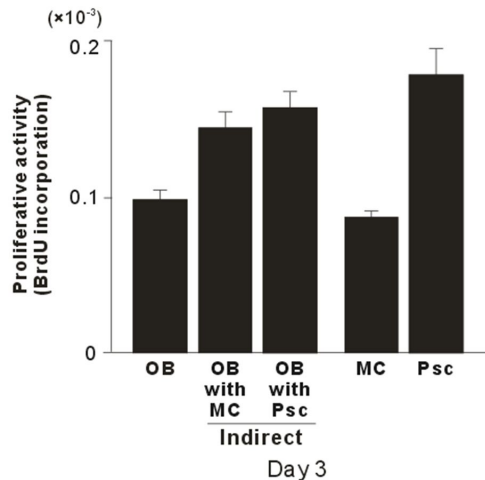


図 4 ラット大腿骨由来骨芽細胞様細胞、口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞もしくは骨膜細胞と非接触式に共培養した骨芽細胞の培養 4 日後の BrdU 細胞増殖活性解析結果

(5) OB を MC もしくは PSc で Indirect co-culture したものは、OB 単一培養に比べて、培養 2 日目では変わらなかったが、培養 4 日目では増加した。

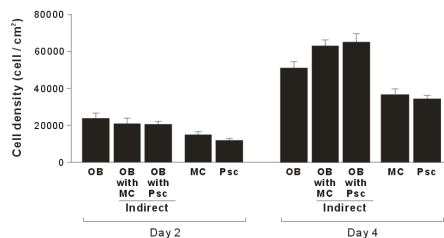


図 5 ラット大腿骨由来骨芽細胞様細胞、口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞もしくは骨膜細胞と非接触式に共培養した骨芽細胞の培養 2 および 4 日後の細胞数計測結果

(6) PSc を MC と direct co-culture したものは、PSc の培養 7 日目 ALP 活性および 21 日目の石灰化基質面積は減少したが、Indirect co-culture したものは、単一培養に比べて、PSc の培養 7 日目 ALP 活性および 21 日目の石灰化基質面積は増加した。

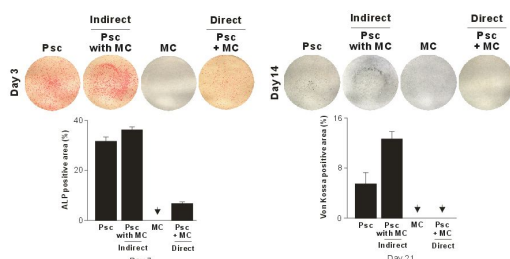


図 6 ラット口腔粘膜細胞と骨膜細胞の単一培養および口腔粘膜細胞と非接触式に共培養した骨膜細胞の培養 7 日後の ALP 染色および 21 日後の von Kossa 石灰化基質染色結果

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 8 件)

Yamada M, Ueno T, Tsukimura N, Ikeda T, Nakagawa K, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. Bone integration capability of nanopolymeric crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:859-73.

Yamada M, Minamikawa H, Ueno T, Sakurai K, Ogawa T. N-acetyl Cysteine Improves Affinity of Beta-Tricalcium Phosphate Granules for Cultured Osteoblast-like Cells. *J Biomater Appl*. 2012;27(1):27-36.

Yamada M, Ueno T, Minamikawa H, Ikeda T, Nakagawa K, Ogawa T. (First author) Early-stage osseointegration capability of a submicrofeatured titanium surface created by microroughening and anodic oxidation. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(9):991-1001.

Funato A, Yamada M, Ogawa T. (co-author) Success rate, healing time, and implant stability development of photofunctionalized dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(5):1261-71.

Yamada M, Tsukimura N, Ikeda T, Sugita Y, Att W, Kojima N, Kubo K, Ueno T, Sakurai K, Ogawa T. N-acetyl cysteine as an osteogenesis-enhancing molecule for bone regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(26):6147-56.

Funato A, Ishikawa T, Kitajima H, Yamada M, Moroi H. A novel combined surgical approach to vertical alveolar ridge augmentation with titanium mesh, resorbable membrane, and rhPDGF-BB: a retrospective consecutive case series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33(4):159-66.

加藤英治, 山田将博, 櫻井 薫
Activation of osteoblastic differentiation through calcium supplement by beta-tricalcium phosphate collagen composite leading to initial inner bone formation.

日本口腔インプラント学会誌, 2013; 26(3):405-424.

山田将博, 小川隆広, 櫻井 薫
Anti-oxidant amino acid derivative as a multifunctional molecule for bone regeneration.

日本補綴歯科学会誌, 2013:5(4): 411-413.

〔学会発表〕(計 27 件)

Yamada M, Kato E and Sakurai K.

Alkali-heat-treated Titanium Surface Enhances Fibroblastic Collagen Deposition and Binding Strength

the 90th General Session and Exhibition of the IADR, March, 20, Seattle, USA

Nishimiya H, Yamada M, Ueda T and Sakurai K.

N-acetyl Cysteine Alleviates Damage of Epithelial Monolayer from PMMA Extracts

the 90th General Session and Exhibition of the IADR, March, 22, Seattle, USA

Yamada, M., Ogawa, T. and Sakurai K.

Cytofunctional preconditioning for auto-cell transplantation to enhance bone regeneration using antioxidant amino acid derivative

29th Anniversary Meeting of Academy of Osseointegration, March, 6th, 2013, Seattle, USA

Kato, E., Yamada, M. and Sakurai K.

Establishment of connective tissue integration with alkali-heat treated titanium surface

29th Annual Meeting of Academy of Osseointegration, March, 6th, 2013, Seattle, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

東京歯科大学 HRC プロジェクト研究

HRC 第 8 プロジェクト・免疫機能・トランス

レーショナル研究グループホームページ

<http://www.tdc.ac.jp/dept/osc/hrc8/hrc8g2ac.html>

東京歯科大学有床義歯補綴学講座ホームページ

<http://www.tdc.ac.jp/dept/rpg/>

LinkedIn

https://www.linkedin.com/profile/view?id=243436736&trk=nav_responsive_tab_profile_pic

Research gate

https://www.researchgate.net/profile/Masahiro_Yamada?ev=hdr_xprf

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田将博 (YAMADA MASAHIRO)

研究者番号 : 90549982

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :