

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463070

研究課題名(和文)ラット歯周炎モデルの確立と骨形成薬剤による骨再生療法の研究

研究課題名(英文)Creation of a rat model of the periodontal disease, and research of the bone regeneration treatment using the osteogenic small chemical compound

研究代表者

波田野 典子(Hatano, Noriko)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：70396737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周炎による不可逆性骨欠損部の骨再生を目指し、骨形成性低分子化合物による歯槽骨再生を目的とした。骨形成性低分子化合物ヘリオキサンチン誘導体(TH)を(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin(CD)に包接させた溶液をヒドロキシプロピルセルロース(HPC)に含有させたゲルを作製、そのゲルは骨芽細胞分化誘導能があり、細胞毒性はなかった。自然発症に近い歯周炎を発症するラット歯周炎モデルを作製した。そのモデルを用いて、歯槽骨欠損を生じたところにTH含有ゲルを投与したところ、歯槽骨欠損が有意に少なかった。また、生体に投与しても炎症反応は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was aimed for the alveolar bone regeneration with the osteogenic small chemical compound to regenerate of the irreversible bone defect part by periodontitis. Osteogenic helioxanthin-derivative (TH) incorporated the solution which let (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin(CD) include it into cellulose was made the gel. The gel had osteoblastic differentiation inducibility, and there was not the cytotoxicity. We made the rat model of periodontal disease that was near the natural development of the symptoms of periodontitis. After giving TH-containing gel using the rat model in the place where the defect of alveolar bone, predominance had few alveolar bone losses. There are not the cytotoxicity in vivo.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨再生

1. 研究開始当初の背景

歯周炎とは、歯を支える歯周組織（歯肉、歯周靭帯、セメント質、歯槽骨）の炎症性変化とそれに伴う病態を指す。厚生労働省の歯科疾患実態調査および患者調査より、歯石沈着あるいは歯周ポケットを有する人（歯周治療が必要な人）は、20歳代では60.7%、50歳代では79.7%にものぼり、加齢とともに罹患率が高くなる、国民病と言われるほど罹患率が高い疾患である。世界においても罹患率が高く、World Health Organization (WHO) は、世界共通の歯周炎評価を規定している。歯周炎に罹患すると不可逆性の骨欠損が生じ、歯の喪失を招く。歯の動揺や喪失に伴い、食事が摂れないことによるQOLの低下、健康状態の悪化が生じる。よって、健全な口腔内環境の維持は、全身の健康維持のために必要不可欠である。歯周炎は、一度罹患すると長期にわたり炎症が継続し、慢性炎症に移行することが多い。また、歯周炎で失われた歯周組織を再生させることは、中胚葉性間葉組織由来と外胚葉性間葉組織由来からなる組織の性質上非常に困難である。

現在行われている、歯槽骨の再生療法としては、骨移植（自家骨移植、同種骨移植、異種骨移植、人工骨移植）、細胞増殖因子（多血小板血漿、骨形成タンパク質、血小板由来増殖因子、線維芽細胞増殖因子）の使用、Guided Tissue Regeneration: GTR 法、Guided Bone Regeneration: GBR 法、エナメルマトリックスタンパク質を用いた Emdogain® (gel)を用いる方法、低分子化合物のシンバスタチンを用いる方法などが挙げられる。いずれも歯槽骨に対し骨形成を認めるとされているが、生体適合性、免疫応答、安全性などにおいて懸念されるものが多い。そこで、申請者は、異種動物由来の素材を使用せず、骨芽細胞分化誘導能を持つ骨形成性低分子化合物と生体適合性の優れた担体を用いた、歯周炎における歯槽骨再生を検討した。

2. 研究の目的

歯周炎は日本だけでなく、世界においても罹患率が高い疾患である。歯周炎の発症進行要因は複雑であり、歯周組織は由来の異なる組織から成り立っていることから、炎症などでひとたび破壊されるとその組織の再生は困難である。本研究では、歯周炎による不可逆性骨欠損部の骨再生を目指し、骨形成性低分子化合物による歯槽骨再生を目的とした。歯周炎の研究は長年行われているが、ヒトにおける歯周炎の発症過程を模倣した、炎症性骨欠損が誘導される歯周炎動物モデルの作製は困難とされていることから、その確立を目指した。さらにそのモデルを用いて評価することにより、骨形成性低分子化合物とより生体適合性の優れた担体を組み合わせ、新しい歯槽骨再生療法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨形成性低分子化合物の骨芽細胞分化誘導能および細胞毒性の検証。

骨形成性低分子化合物であるヘリオキサンチン誘導体 (TH) は、水に不溶性の物質 (Biochem Biophys Res Commun 357: 854-60, 2007、Biochem Biophys Res Commun 395: 502-8, 2010) であり、先行研究では TH の曝露初期における細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能について確認されていないため、マウス頭頂骨由来前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて確認を行った。細胞毒性に関しては MTT アッセイ、骨芽細胞分化誘導能に関しては Real-time RT-PCR を用いて評価した。次に、臨床応用に向けて環状オリゴ糖である (2-Hydroxypropyl)- γ -cyclodextrin (CD) に包接させ、水に可溶化することで生体適合性を向上させることを試みた。さらに、その TH 溶液を投与部に留めるための担体として、ゲルに着目し、ヒドロキシプロピルセルロース (hydroxypropyl cellulose 1000-4000 cP, Wako, HPC) を用いることを検討した。TH 含有ゲルの骨芽細胞分化誘導能および細胞毒性を調べるため、MC3T3-E1 細胞を用い、Real-time RT-PCR、MTT アッセイにより上記と同様に検討を行った。

(2) ラット歯周炎モデルの作製と評価。

in vivo における歯槽骨再生を評価するために、動物歯周炎モデルを検討した。既存の動物歯周炎モデルは、齧歯類、犬類、霊長類など、様々な動物において作製されているが、完全に歯周炎を再現しているモデルはないとされている (Programmatic Consultation Summary (Online) 2007)。ヒトにおける歯周炎の発症には、複数の要因が関わり、組織破壊と組織回復のサイクルを長期間繰り返すため複雑であり、ゆえに歯周炎を研究することは非常に困難とされている。そこで、歯周炎における治療効果を判定できる動物モデルとして、簡便かつ再現性があり、ヒトにおける発症過程を模倣した炎症性骨欠損が誘導されるラット歯周炎モデルの確立を目指した。8週齢、オスの Wistar ラットの上顎第二臼歯の歯冠周囲に 5-0 絹糸を結紮することで、プラークの付着を誘発し、歯周炎を発症させ、骨欠損を起こさせる方法を検討した。自然治癒経過を観察するため、全身麻酔下において、絹糸を結紮し、4週間目で糸を除去し、絹糸除去直後、除去後1週間、除去後2週間、除去後4週間、除去後8週間における評価を行った。評価は、放射線学的解析および組織学的解析を行った。放射線学的解析にはマイクロ CT (inspeXio SMX-90 CT 島津製作所) を用いて、3次元画像解析を行った。組織学的解析は、脱灰骨薄切標本を用いて、Hematoxylin Eosin 染色 (H-E 染色)、Masson Trichrome 染色を行

った。

(3) 薬剤送達用担体と組み合わせた TH の歯槽骨再生効果の検証。

本研究で作製した、ラット歯周炎モデルの骨欠損部に、薬剤送達用担体と組み合わせた TH 含有ゲルを投与し、歯槽骨再生効果の検証を行った。ラット歯周炎モデルの自然治癒経過の結果より決定した、投与時期に TH 含有ゲルを投与し、自然治癒経過と比較するため、絹糸除去 4 週間目で効果を検証する。評価は、放射線学的解析として、マイクロ CT を用いて、3 次元的な画像解析を行った。組織学的解析は、脱灰骨薄切標本を用いて、H-E 染色、Masson Trichrome 染色を行った。また、ゲルを投与する際、歯肉に炎症を惹起させないために、歯と歯肉の境である歯肉溝に、直径がマイクロサイズの鈍針のチップを用いて注入することを検討した。ゲルの投与量は、投与部位が非常に小さいため、およそ 1 ~ 3 μ L を投与することを検討した。市販のマイクロシリンジは、ゲルを押し出すことが可能な一桁単位のマイクロ量の計測が不可能である。そのため、ゲルを投与するための最適なマイクロシリンジのその作製に関しても検討した。

4. 研究成果

(1) TH の骨芽細胞分化誘導能および細胞毒性の検証。

MC3T3-E1 細胞を用い Real-time RT-PCR により、TH 10 μ M 曝露 4 日目、7 日目において、初期の分化マーカーである alkaline phosphatase (Alp) の発現の上昇と、後期分化マーカーである、osteocalcin (Oc) の発現の上昇を認めた。この結果より、TH は曝露 4 日目まで初期分化のみならず、後期分化も促進させ、7 日間経過した後も骨芽細胞分化誘導能を維持していることが示唆された。また、MTT アッセイにより細胞毒性がないことも確認した。TH は水に不要なため、ジメチルスルホキシド (DMSO) を使用する必要があるが、より生体親和性を高めるため、CD に包接させ水に可溶化し、骨芽細胞分化誘導能は DMSO 溶解時と同様に認め、細胞毒性はないことを確認した。さらに、HPC を添加した TH 含有ゲルを作製し、骨芽細胞分化誘導能を認め、細胞毒性は認めなかった。

(2) ラット歯周炎モデルの作製と評価。

8 週齢、オスの Wistar ラットの歯槽第二臼歯の歯冠周囲に 5-0 絹糸を全身麻酔下で結紮し、プラークの付着を誘発し、歯周炎を発症させ、さらに自然治癒経過を観察した。絹糸を結紮し、4 週間目で糸を除去し、絹糸除去直後、除去後 1 週間、除去後 2 週間、除去後 4 週間、除去後 8 週間における評価を行い、マイクロ CT を用いた放射線学的解析において全ての試験側に骨欠損を認め、3 次元的解析においても有意に差を認めた。組織学的

解析において、絹糸除去直後は、H-E 染色より炎症性細胞の浸潤、破骨細胞の出現、歯肉肥厚を認め、Masson Trichrome 染色により膠原線維の断裂を認め、炎症性骨吸収であることを認めた。絹糸除去後 1 週間目より炎症性細胞の浸潤は認めず、急性炎症は消退していることを認め、絹糸除去後 8 週間経過しても骨欠損を認めていることから、慢性期に移行していることが示唆され、ラット歯周炎モデルとなりうることを示した。

(3) 薬剤送達用担体と組み合わせた TH の歯槽骨再生効果の検証。

TH 含有ゲルの骨芽細胞分化誘導能および細胞毒性の検証および解析をマウス頭頂骨由来前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて行い、生体投与への最適濃度を 10 μ M と決定した。本研究で作製したラット歯周炎モデルを用い、骨欠損を生じた上顎第二臼歯の歯と歯肉の境である歯肉溝に、TH 含有ゲルを 2 μ L 投与するための装置を作製した。装置は、歯周組織に侵襲を加えずに歯肉溝にゲルを注入できるような鈍針のナノチップを用い、粘性のあるゲルを押し出せるようなマイクロメーターヘッドを組み合わせたマイクロシリンジを作製した。両側上顎第二臼歯に絹糸を巻いたラット歯周炎モデルを作製し、絹糸除去後 1 週間目で試験側に TH 含有ゲルを投与、対照側には TH を添加していないゲルを投与し、薬剤投与後 3 週間目 (絹糸除去後 4 週間目) で組織採取、固定を行った。放射線学的解析はマイクロ CT を用いて 3 次元的な画像解析を行った。組織学的解析は、脱灰骨薄切標本を用いて、H-E 染色、Masson Trichrome 染色を行った。放射線学的解析において TH 含有ゲル投与群は歯槽骨欠損が有意に減少していた。組織学的解析においては、試験側、対照側ともに歯周組織に薬剤投与による炎症反応を生じていないことが認められた。本研究期間終了後も、ラット歯周炎モデルを用いた in vivo 評価については長期経過観察を行う予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

波田野 典子 「ラット歯周炎モデルの確立と骨形成性低分子化合物による歯槽骨再生療法の検討」第 67 回日本口腔科学会総会 2013 年 5 月 23 日 ~ 2013 年 5 月 25 日 栃木県総合文化センター(栃木県)

波田野 典子 「口腔機能の維持・改善への取り組み」岐阜県保険医協会(招待講演) 2013 年 8 月 4 日 岐阜三井会館

(岐阜県)
波田野 典子 「低分子化合物を用いた
歯槽骨の再生および臨床応用への検討」
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(招待講演) 2014 年 10 月 9 日~2014
年 10 月 10 日 城山観光ホテル(鹿児島
県)

〔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
http://www.u-tokyo.ac.jp/public/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波田野 典子 (HATANO, Noriko)
東京大学医学部附属病院 登録診療員
研究者番号：70396737

(2) 研究分担者

阿部 雅修 (ABE, Masanobu)
東京大学保健・健康推進本部 講師
研究者番号：10392333

瀬戸 一郎 (SETO, Ichiro)
東京大学医学部附属病院 講師
研究者番号：30582390
(平成 27 年度より退職)

山本 健一 (YAMAMOTO, Kenichi)
東京大学工学(系)研究科(研究院)
特任研究員
研究者番号：90583162

(3) 連携研究者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)
東京大学医学部附属病院 教授

研究者番号：90171454

鄭 雄一 (CHUNG, Ung-il /TEI, Yuichi)
東京大学工学(系)研究科(研究院)
教授
研究者番号：30345053

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)
東京大学工学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号：20466733