

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592393

研究課題名（和文） 歯周組織再生治療促進のための注入型キャリアに関する研究

研究課題名（英文） Injectable composite carrier for periodontal healing and regeneration

研究代表者

山本 松男(YAMAMOTO MATSUO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50332896

研究成果の概要：

本研究は、歯周病で破壊された歯周組織の治癒及び再生を促進し、かつ簡易な治療方法の開発に通ずる投与方法の検討を目的として行われた。前者の目的では細胞外マトリックスの産生及び血管新生を促すことが知られている軟骨増殖因子を用い、後者の目的にはリコンビナント・ヒト型コラーゲンゲルを用いた。一度の注入によって硬組織形成が促進され、その過程を組織学的及び分生生物学的に解析すると、血管新生を伴う骨・軟骨関連の細胞外マトリックス産生の増加が観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,500,000	750,000	3,250,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：生体材料、再生医学、細胞・組織、歯学、生体機能

1. 研究開始当初の背景

歯周病に罹患し破壊された組織の治療に関して、近年では、完全な健康な組織を取り戻すことを目指した「再生医療」が注目を集めている。組織誘導再生法（GTR法）やブタ歯胚から抽出したエナメルタンパクを用いた再生療法は既に多数の良好な臨床結果が得られているが、術式が複雑で手術に伴う二次感染の可能性があることや他種生物由来の材料であるという点でそれぞれ改善の余

地が残されている。増殖因子の応用も研究が続けられてきたが、その作用を十分に医療に応用する手段として、担体＝キャリアの問題が残されてきた。組織の治癒や再生を促進するためには、安全性の担保、宿主細胞の治癒・再生能力を引き出す、操作性にすぐれる、等の条件を満たす担体＝キャリアに関する研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞の移動、増殖、血管新生等の細胞の能力を引き出す場として機能するキャリアの検討である。

3. 研究の方法



生体における硬組織の形成、再生・治癒は、上図のように各段階により解析が可能であり、*in vitro* および *in vivo* の研究手法を組み合わせることで総合的に解析、評価を行う。すなわち、周囲からの細胞の移動、キャリア内での細胞の増殖、細胞の分化（性状変化、細胞外マトリックス産生や成長増殖因子の産生、細胞表面マーカー発現等）、血管新生、骨形成量、骨質（骨化度）である。

- については *in vivo* 系もしくは *in vitro* 系手法により解析を行い、については経時的な被検体（マウス頭部）の μ CT による非侵襲的な手法を用いて解析を行う。

4. 研究成果

リコンビナント・ヒト型コラーゲンゲル注入部位内での細胞の移動、増殖、分化、血管新生過程に対して、マウス頭部変化を経時的に非侵襲的に解析することとした。その上で、特に細胞外マトリックスによる細胞機能制御機構の解析および動物組織内での血管新生を伴う骨化機構の解析を中心に研究を推進した。

について、硬組織の誘導形成について、注入後経時的に（3日後、1週間後、2週間後）マイクロCT（ScanXmate-E080）で解析を行ったところ、3日後および1週間後には、注入部位及び対照群ともに骨の誘導を認めなかったが、2週間後においては明瞭な骨様透過像の形成を認めた。

- について、組織学的な所見より、注入後3日後においては細胞様構造物が疎な部位が認められ注入したコラーゲンゲルの残留がうかがわれるものの、1週間後には線維

芽細胞様細胞の存在が認められ、かつ活発な細胞増殖を示す抗 PCNA 抗原陽性細胞の増加が顕著であった。形成された骨様硬組織は多くの場合既存の頭蓋骨に連続していた。新生骨および既存骨ともに抗型・型コラーゲン染色に陽性であったが、抗オステオカルシン染色を行ったところ新生骨骨髄腔壁ではオステオカルシン陽性細胞が多数確認されたが、既存骨骨髄腔壁には認められなかった。新生骨においては活発な骨形成のための細胞外マトリックス産生が行われているものと推察された。新生骨付近においては管腔構造物が確認され、血管新生を想像させる。組織学的な所見より、1週間後には線維芽細胞様細胞の存在が認められ、形成された骨様硬組織は多くの場合既存の頭蓋骨に連続していた。しかし、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアルシアンブルー染色によって新生骨と既存骨の境は明瞭であることが明らかであった。新生骨では抗型・型コラーゲン染色に陽性であった。また一部軟骨細胞様構造を認めたため、軟骨細胞様分化に必須の転写因子である Sox-9 に対する免疫染色を行ったところ、新生された骨様構造物において抗 Sox-9 抗体陽性細胞が多数確認された。一方、新生骨付近においては管腔構造物が確認され、血管新生を想像させる。一般的には軟骨が骨に置換される過程では血管侵入を伴うが、新生骨様構造物の中心部分では血管マーカーである Von Willebrand Factor (VWF) に対して免疫組織学的に陽性である細胞からなる管腔構造物が認められた。

一方、細胞培養系において血管因子の発現を解析したところ、マウス頭蓋より分離した線維芽細胞を GDF5 で刺激することにより、血管成長因子である VEGF の産生が上昇する結果を得た。48時間刺激の条件下で、無刺激に対して約2倍の VEGF 産生が確認された。

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3件）

1. 培養歯根膜細胞中における各種間葉系前駆細胞の存在確認 奥津朋彦, 小林誠, 小出容子, 高田貴虎, 滝口尚, 山本松男 昭和歯学会雑誌 2007年27巻3号 P165-172

2. Agasa Miyazono, Atsushi Yamada, Naoko

Morimura, Masamichi Takami, Dai Suzuki, Makoto Kobayashi, Ken-ichi Tezuka, Matsuo Yamamoto, Ryutaro Kamijo. TGF- β suppresses POEM expression through ERK1/2 and JNK in osteoblasts. FEBS Lett. 2007 581, p5321-5326

3.H.Kadomatsu, T. Matsuyama, T. Yoshimoto, Y. egishi, H. Sekiya, M. Yamamoto, Yuichi Izumi, Injectable growth/differentiation factor-5-recombinant human collagen composite induces endochondral ossification via Sox9 expression and angiogenesis in murine calvariae. J Periodontal Res, 2008;043:p483-489

〔学会発表〕(計 5 件)

1.Recombinant HumanCollagen/Recombinant human GDF-5 を用いたマウス頭蓋骨における骨形成効果 門松秀司, 松山孝司, 吉元剛彦, 山本松男, 和泉雄一 日本歯周病学会会誌 49 巻春季特別 P154 第 50 回春季学術大会・横須賀 2007 年

2.培養ヒト歯根膜細胞における各種腱・靭帯マーカー遺伝子の発現制御 三井将, 小林誠, 森高俊一郎, 山本松男 Journal of Oral Biosciences 49 巻Suppl. p182 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 2007 年

3.培養ヒト歯根膜細胞における各種BMP antagonistの発現制御 森高俊一郎, 小林誠, 三井将, 山本松男 Journal of Oral Biosciences 49 巻Suppl. P182 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌, 2007 年

4.Application of rhGDF-5 highlights bone

regeneration in vivo. 山本松男 大連医科大学創立 60 周年記念式典 歯学部講演会 2007. 10. 03. 中華人民共和国・大連

5.Growth/differentiation factor-5(GDF-5)による歯周組織再生の検討 吉元剛彦, 松山孝司, 與那嶺豊, 門松秀司, 小園清香, 山本松男, 和泉雄一, 野口和行 日本歯周病学会会誌 50 巻春季特別 P147、第 51 回春季学術大会・大宮 2008 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織
(1)研究代表者
山本松男(YAMAMOTO MATUO)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 50332896

(2)研究分担者

(2)研究分担者

滝口 尚 (TAKIGUCHI TAKASHI)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：60317576

関谷秀樹 (SEKIYA HIDEKI)
東邦大学・歯学部・講師
研究者番号：70267540

臼井通彦 (USUI MICHIHIKO)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：10453630

(3)連携研究者