

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10166

研究課題名(和文)再生治療が組織にもたらす代謝アダプテーションと3次元超微細構造変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of metabolic adaptation and three-dimensional structure changes caused by regenerative therapy with FGF-2.

研究代表者

野崎 剛徳 (NOZAKI, TAKENORI)

大阪大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：30263304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FGF-2を用いて歯周組織再生療法を行った部位では、対照部位に比べて良好な歯周組織再生が得られた。免疫組織学的解析により、試験部位と対象部位の両方で、ともに組織再生に関する因子の発現がみられたが、特に術後4週の試験側においてオステオポンチンの発現が上昇していることが示された。一方、オミクス解析により、試験側と対照側では、手術後の各時点のクロマトグラムのピークパターンの遷移に相違が認められた。これらの結果から、歯周組織再生治療にFGF-2を用いると、細胞の代謝や細胞間相互作用に変化が生じ、組織の治癒に影響を与える微小環境が改善することにより、良好な組織再生が得られることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織再生療法の効果を最大限に高めるためには、局所の微小環境を治癒・再生に適した状態へと導くことが肝要である。そこで、現在最も有効性の高い歯周組織再生療法薬であるFGF-2を用いた再生治療により、治癒の過程にどのような影響が生じ、治癒の場の微小環境にどのような変化が生じるのかを、オミクスの手法を用いて解析した。その結果、FGF-2を用いることにより、組織の治癒に関する細胞の代謝や細胞間相互作用に変化が生じて、効果的な治癒・再生が進行し得る微小環境が構築されることにより、良好な組織再生が得られることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tissue regeneration was well induced at the test site using FGF-2 compared to the control site. Immunohistochemical analysis showed that multiple factors involved in angiogenesis and tissue regeneration were expressed at both the test site and the control site. It was also suggested that the expression of osteopontin was increased on the test site at 4 weeks after surgery.

Omics analysis suggested that there were differences between the test site and the control site in the transition of the peak pattern of the TIC chromatogram at each time point after surgery. These results suggest that FGF-2 alters metabolism and cell-cell interactions involved in tissue healing and regulates expression of factors necessary for tissue regeneration effectively.

研究分野：歯周治療学

キーワード：FGF-2 歯周組織再生 オミクス解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は歯周組織の再生療法に有効な薬剤で、我々はこれまでに、FGF-2 を用いると手術創の治癒が早いこと、また骨欠損部のリモデリングが長期にわたり継続することを臨床的に証明するとともに、これらの現象が、強い細胞増殖促進活性を持つにもかかわらず、細胞が増殖した後の分化を阻害しないという FGF-2 の作用特性と、FGF-2 と VEGF-A の協調による強力な血管新生作用によって生じるものであらうと考察してきた。しかし、組織の微小環境がいかなる時間軸で治癒・再生に適した状態となっていくのか、また、この環境構築に関わる細胞群がどのような配置をとり、いかに組織を形成していくのかについての十分な知見は得られていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、治癒・組織再生に最適な微小環境を解明することである。そのため、FGF-2 の作用によって組織が良好な治癒・再生へと向かう環境をモデルとして用い、治癒・再生の場で生じる環境のダイナミックな変化を、免疫組織学的解析とオミクス解析によって読み解くことにより、治癒・組織再生に適した微小環境において特徴的にみられる代謝変動のプロセスを解明するとともに、良好な組織再生の過程でみられる細胞群の配置を解析することで、より効果的な歯周組織再生療法を実現していくために必要とされる要因を検討する。

### 3. 研究の方法

本研究は大阪大学歯学部動物実験委員会の承認を受け、倫理規定を遵守して実施された (承認番号: 動歯 R-02-016-0)。

#### (1) 人工的骨欠損モデルの作成と歯周組織再製剤の適用

60ヶ月齢の雌性の TOYO ビーグル犬 1頭 (体重 11.2Kg) を用いて研究を行った。導入麻酔には酒石酸ブトルフェノール、塩酸メドミジン、ミダゾラムの 3 種混合麻酔液を用い、鎮静後にプロポフォール (7mg/kg) を静脈内投与して、深麻酔下に誘導した。そして 2~3% イソフルランを用いて麻酔を維持するとともに、プロポフォール (0.5 mg/kg/h) を持続的に静脈内投与した。全身麻酔導入後、超音波スケーラーを用いてビーグル犬の全顎の歯石を除去するとともに、歯科用キシロカインによる局所麻酔下に、両側の下顎第四前臼歯の抜歯を行った。抜歯後はグルコン酸クロルヘキシジンを用いた口腔内清掃を継続的に行って、健全な歯周組織を確立した。その後、抜歯後 12 週目に、上記と同様の麻酔管理下に、下顎両側の第一後臼歯近心部ならびに第三前臼歯遠心部の歯肉を全層弁で剥離し、骨を削除して 2 壁性の人工的骨欠損 (深さ: 4mm、近遠心径: 4mm、頬舌径: 骨幅径の 1/2) を作成するとともに、ルートプレーニングを施してセメント質を除去し、歯根象牙質を露出させた (図 1)。また、根面の最深部とセメントエナメル境にはラウンドバーでノッチを付与した。このようにして作成した人工的骨欠損の一侧を試験側としてリグロス歯科用液 (0.3% FGF-2) を適用し、残る一侧を対照側として基材 (6% ヒドロキシプロピルセルロース) を適用して、歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。術後は口腔内清掃を行いながら治癒状態を観察するとともに、経時的に歯肉溝浸出液 (GCF) の採取を行った。そして 1 週で抜糸し、4 週で全身麻酔下に放血屠殺し、被験部組織を下顎骨とともに離断して採取した。



試験側

対照側

図 1: 作成した骨欠損

#### (2) 免疫組織学的解析

採取した組織はトリミング後、5% パラホルムアルデヒド溶液に 1 週間浸漬して固定し、PBS にて洗浄した後にマイクロ CT (R<sub>m</sub>CT2) を用いて断層写真撮影を行った。そして、カルキトックスで 1 週間低温脱灰した後にパラフィン包埋を行い、近遠心方向で歯軸と平行に 4 μm の厚さに薄切した。そして脱パラフィン処理とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。また、免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析のため、切片に 1 次抗体 (rabbit anti-OPN [Abcam, UK] Mouse anti-VEGFA [Abcam, UK] Rabbit anti-BMP 2 [MyBioSource, USA] 等) を 4 で一晩作用させた後、horseradish-peroxidase 標識 2 次抗体 (goat anti-rabbit IgG) を作用させ、3,3'-diaminobenzidine substrate を基質として発色後、ヘマトキシリン溶液にて対比染色を行い、光学顕微鏡にて観察を行った。

### (3) オミクス解析

術前および術後 8、16、24 時間、2、4 日、1、4 週の各時点で、ペリオペーパーを用いて歯肉溝浸出液 (GCF) を採取し、直ちに液体窒素で凍結して -80 で保存した。これをアセトニトリル (ACN) 450  $\mu$ l と蒸留水 40  $\mu$ l の混合溶液に浸漬して 5 分間の超音波抽出を行って検体とした。この検体の 245  $\mu$ l に内部標準として 100ppm の 2-イソプロピルリンゴ酸を 5  $\mu$ l 加え、16,000  $\times$  g 4 の条件下で 5 分間の遠心分離を行って得られた上清を、イオンカラムに通して親水性化合物を抽出した。さらに抽出物をカラムに通して脱水し、10% CANピリジン溶液と MSTFA 試薬を添加して誘導体化した後、ヘキサンを用いて試料溶液をカラムから溶出させた。キャリアガスにはヘリウムを用い、誘導体化した試料を 50 から 330 まで 15 /min で昇温して、注入温度 230 スプリットレスで、カラム (CP-Sil 8 CB for Amines 長さ 30m 内径 0.25 mm 膜厚 0.25 $\mu$ m) に注入した後、JMS Q1000GX (JEOL, JAPAN) を用いてガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー (GC/MS) による質量分析を行った。そして得られたデータを用いて TIC クロマトグラムを抽出するとともに、主成分分析、相関解析を行って、メタボロームの変動を解析した。

### 4. 研究成果

マイクロ CT を用いた画像解析と HE 染色による組織検査により、両者でともに正常な組織再生が生じていることが確認された。試験側と対照側の組織再生量を比較したところ、試験側では再生した骨の高さ、セメント質の高さがともに大きく、新生歯槽骨量も多かった。また新生血管が多く形成されていることから、試験側においては、より良好な歯周組織再生が進行していることが示された (図 2、3)。

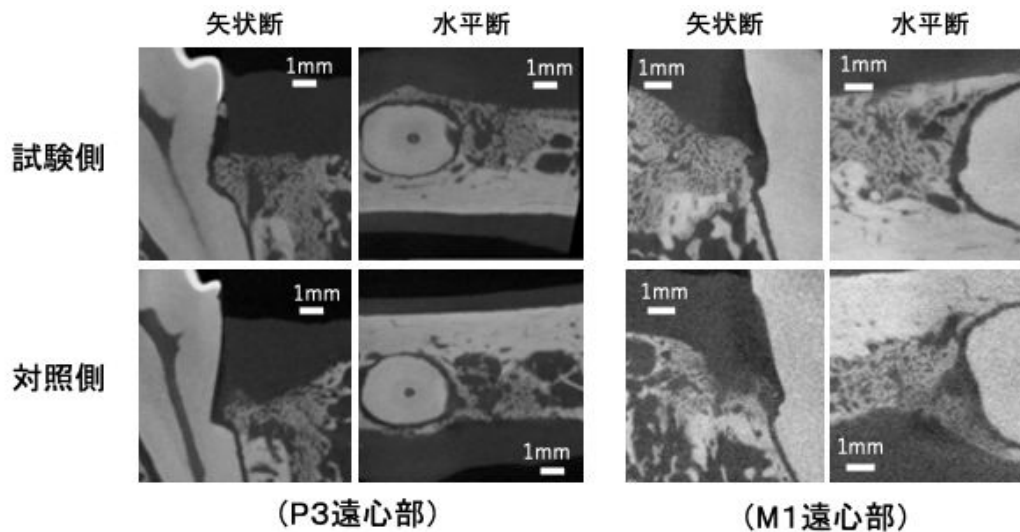


図2 術後4週のマイクロCT像

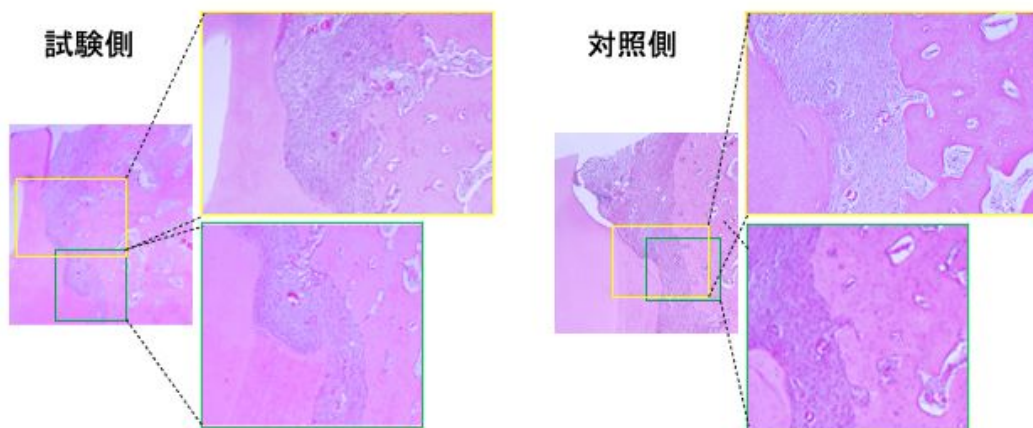


図3 術後4週のHE染色像(P3遠心部)

次に、免疫組織学的解析を行って、硬組織形成に關与する各種因子の術後 4 週の時点における発現を検討した。その結果、両側でともに血管新生や組織再生に關与する因子の発現が認められたが、特に試験側の新生セメント質の周囲においては、オステオポンチンの発現が上昇していることが示された。



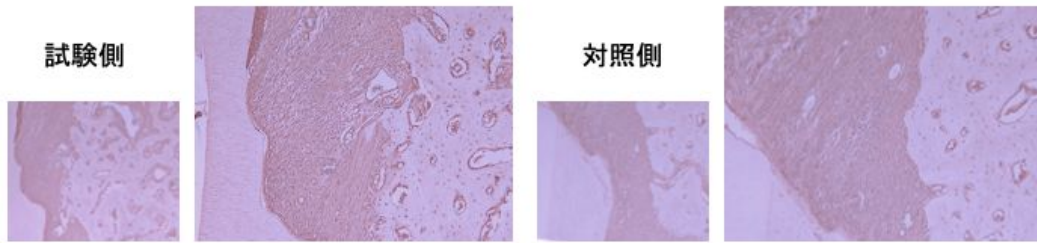


図4 術後4週の免疫組織染色像(P3遠心部:OPN)

一方、オミクス解析により各時点のクロマトグラムのピークパターンを比較した結果、試験側と対照側のいずれにおいても、術前と術後ではピークパターンに明らかな変化が生じることが示された。また、試験側と対照側の術後のピークパターンの遷移には類似性があるが、特定の物質については発現量が異なること、また発現の経時的な遷移にタイムラグがみられたことから、FGF-2を適用することにより、組織再生の微小環境を構成する細胞の代謝に変化が生じていることが示唆された。

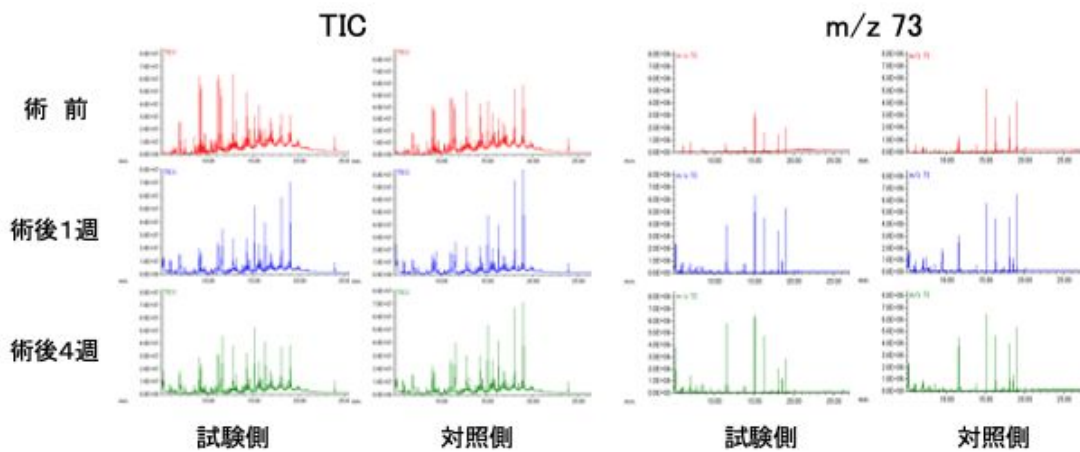


図5 各時点のGCFのクロマトグラム(M1近心部)

これらの結果から、歯周組織の再生治療に FGF-2 を用いると、新生組織を構成する細胞の代謝や細胞間相互作用に変化が生じ、組織の治癒に影響を与える微小環境が改善することにより、良好な組織再生が得られることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北村 正博、山下 元三、三木 康史、池上 久仁子、竹立 匡秀、柏木 陽一郎、野崎 剛徳、増田 聖、石原 容子、山中 克之、熊谷 知弘、村上 伸也
2. 発表標題 歯周炎を対象とした歯周組織再生剤(REGROTH)と人工骨(Cytrans Granules)の併用療法の安全性及び有効性の評価
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥山萌恵、大須賀潤一、青木順、野崎剛徳、村上伸也、豊田岐聡
2. 発表標題 歯周病診断法開発に向けた唾液中の代謝物マーカーの探索
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Okuyama M, Osuga J, Aoki J, Nozaki T, Murakami S, Toyoda M
2. 発表標題 Development of rapid analytical method of metabolites in saliva using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) for diagnosis of periodontal disease.
3. 学会等名 8th ASIA-OCEANIA MASS SPECTROMETRY CONFERENCE (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石濱 泰  (ISHIHAMA YASUSHI)  (30439244)	京都大学・薬学研究科・教授    (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	豊田 岐聡 (TOYODA MICHISATO)  (80283828)	大阪大学・理学研究科・教授  (14401)	
研究分担者	三浦 治郎 (MIURA JIRO)  (70437383)	大阪大学・歯学部附属病院・助教  (14401)	
研究分担者	清水 真人 (SHIMIZU MASATO)  (70380277)	大阪大学・歯学部附属病院・医員  (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関