

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390557
 研究課題名（和文） サイトカイン再生療法をオーダーメイド医療として展開するための基礎研究
 研究課題名（英文） The basic study for the progression of the order-made medicine by cytokines for periodontal tissue regeneration
 研究代表者
 栗原 英見（ Kurihara Hidemi ）
 広島大学・医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：40161765

研究成果の概要（和文）：

In vivo において、術後 2 週の BDNF/HA 複合体充填群では、歯周組織再生はまだ十分でないものの、露出象牙質近傍や再生歯槽骨周囲に BDNF 受容体である *trkB* の陽性細胞が観察された。さらに、それらの細胞は、細胞増殖マーカー PCNA や骨分化マーカー OPN も発現しており、歯周組織再生早期において、BDNF は増殖や分化といった細胞機能を制御することで組織再生を促進していることが示唆された。さらに、アルツハイマー病との関係が示唆されている 3 つの *trkB* の SNP に関して、10 個体のゲノム DNA を用いて SNP 解析を行った。同 10 個体より分離培養した歯肉線維芽細胞を用いて、BDNF によるヒアルロン酸合成酵素 HAS-1 の mRNA 発現促進と *trkB* の SNP のパターンを比較検討した。

研究成果の概要（英文）：

In vivo study, two weeks after the BDNF application, periodontal tissue regeneration was insufficient, but invasion of epithelial cells to defects was not observed. *TrkB*, PCNA and OPN-positive cells were detected on the denuded root surface, around the regenerating alveolar bone and in the soft connective tissue of regenerating periodontal tissues. *TrkB* positive cells may quickly responded to applied BDNF and started to proliferate and differentiate for the periodontal tissue regeneration within 2 weeks. Furthermore, we investigated the *trkB* single nucleotide polymorphisms (SNPs) which are reported to have some relationships with Alzheimer's disease. We also compared effect of BDNF on HAS-1 mRNA expression on human gingival fibroblasts with the results of SNP analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：サイトカイン療法、オーダーメイド、歯周組織再生、宿主応答

1. 研究開始当初の背景

サイトカイン類を局所に投与する歯周組織再生療法は、GTR 法に比較すると“スキル依存性”が低く、“プロトコール主導”の治療法であり、今後一般臨床医による臨床応用が拡大すると考えられる。現在までに、血小板由来増殖因子 (PDGF-BB)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、インシュリン様増殖因子 (IGF)、 β 型トランスフォーミング増殖因子 (TGF β)、骨形成因子 (BMP)-2、BMP-7 (OP-1) など多種のサイトカインが研究され一部は市販された。申請者らも、神経栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) が歯周組織再生に有効であることを、*in vitro*, *in vivo* の系で示してきた。歯周組織の欠損形態は多様であり、宿主 (患者) の応答も多様であるから、サイトカインの選択肢が多いことは良いが、選択の基準となる客観的な根拠が必要となる。抗癌剤などにおいては、薬の投与による副作用と効果を投与前に客観的に調べて薬の選択を行なう系が確立されつつある。いわゆる、オーダーメイド医療である。再生療法に用いるサイトカインについても、個々の患者にとって最も適したサイトカインがあると考えられ、宿主の応答を基盤としたサイトカイン選択の基準を確立することは、個々の患者に最適な治療法を提供するために重要である。

2. 研究の目的

今後の臨床応用の拡大が予想されるサイトカイン歯周組織再生療法について、サイトカインに対する宿主応答性を基盤とした選択基準を確立するために、PDGF-BB, bFGF, BDNF について再生メカニズムの違いと特徴

を明確にした上で、宿主応答性の違いを明らかにしていく必要がある。本研究は、まず BDNF による歯周組織再生の詳細なカスケードを明らかにするとともに、BDNF による歯周組織再生における個体の感受性を、BDNF 特異的細胞応答、遺伝子多型という点から解析することとした。

3. 研究の方法

①BDNF による歯周組織再生のカスケードの解明

雌ビーグル犬 (12~20 ヶ月齢、体重 10~14 kg) の下顎第 2、3、4 小臼歯にⅢ級根分岐部歯周組織欠損を作成し (図 1 A)、アルジネート印象材を填入することで実験的歯周炎を惹起させた (図 1 B)。一週間後、印象材を除去し、ルートプレーニングを行い、歯肉弁を元に戻して縫合した。その後ブラッシングを行うことで、炎症を軽度抑えた歯周組織を確立した。さらに一週間後、BDNF (50 μ g/ml) /高分子ヒアルロン酸複合体を加えて欠損部に充填した (図 1 C)。コントロール群として高分子ヒアルロン酸のみを充填した。手術後 2, 6 週間経過観察した後、灌流固定を行い、組織標本を作製した。切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色を行い、光学顕微鏡下にて組織観察を行った。

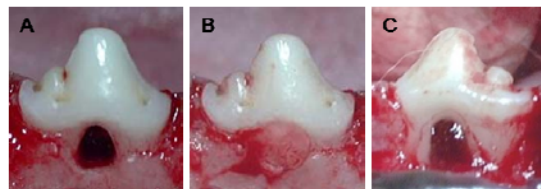


図1 BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与術式
(A)ビーグル犬下顎根分岐部歯周組織欠損の作製
(B)炎症を惹起するためにアルジネート印象材填入
(C) BDNF/高分子ヒアルロン酸充填

②BDNF 受容体 (trkB) の SNP 解析

ヒト 10 個体より分離・培養した歯肉線維芽細胞 (HGF) からゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR システムを用いて、BDNF の高親和性受容体 *trkB* について SNP を解析した。今回はアルツハイマー病との関連が示唆されている rs1624327、rs1443445、rs3780645 について検討を行った。

③HAS mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響

培養ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に BDNF (50 ng/ml) を 3、6、12、24 時間作用させて、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS)-1、-2、-3 の mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR を用いて解析した。

④BDNF に対する個体の感受性の検討

10 個体より分離培養した歯肉線維芽細胞 (HGF1~10) において、BDNF (50 ng/ml) 24 時間作用時の HAS-1 mRNA 発現をコントロール (BDNF 作用なし) との比率でグラフ化した。結果は 3 回の実験の平均値±S.D. で表わし、上記②の結果と比較した。

4. 研究成果

①BDNF による歯周組織再生のカスケードの解明

術後 2 週において、高分子ヒアルロン酸のみを移植した HA 群、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群ともに歯周組織再生は十分ではなかった (図 2 A, B)。HA 群は根分岐部直下に上皮が侵入していたが、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群では、上皮の侵入は観察されなかった (図 3A)。欠損底部の象牙質表面では再生セメント質が観察された (図 3B)。

図 2 HE 染色 (術後 2 週)

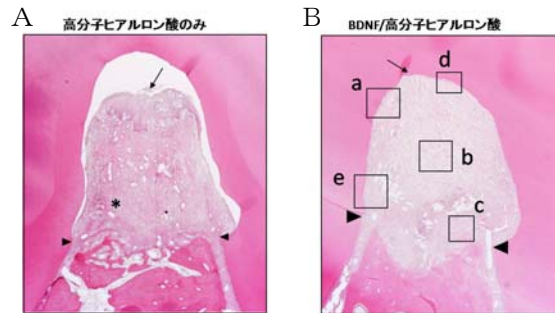


図 3 HE 染色 (術後 2 週)

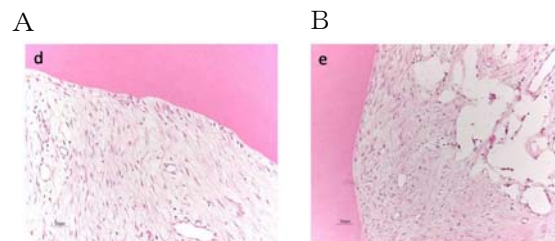
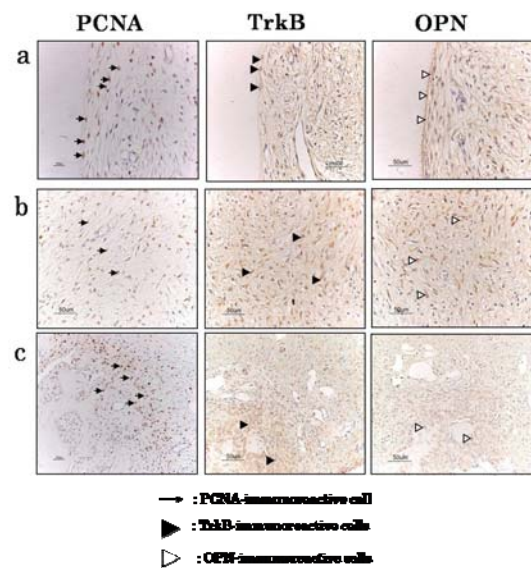


図 2 B(d)の拡大像

図 2 B(e)の拡大像

欠損底部の既存の歯槽骨周囲、欠損部の露出象牙質近傍の結合組織中に *trkB* 陽性細胞、PCNA 陽性細胞が多く認められた。露出象牙質表面層に OPN の沈着が見られた (図 4)。

図 4 HE 染色 (術後 2 週)



→ : PCNA-immunoreactive cell
 ▲ : TrkB-immunoreactive cells
 ▷ : OPN-immunoreactive cells

術後 6 週において、高分子ヒアルロン酸のみを移植した HA 群は、ある程度の歯槽骨再

生が観察されたものの、根分岐部直下に上皮が侵入し、露出象牙質表面に再生セメント質は観察されなかった。また、欠損群と比較すると炎症性細胞浸潤は軽度であった(図 5A)。BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群はコントロール群と比較し、まだ完全ではないが、明らかに歯周組織再生量が多かった(図 5B)。根分岐部直下に上皮の侵入はなく、コラーゲン線維の埋入を伴ったセメント質が再生していた(図 6A)。また、コントロール群に比べて多くの管腔が観察された(図 6A)。再生歯槽骨と再生セメント質の間には一定の幅を維持した歯周靭帯の再生も観察された(図 6B)。

図 5 HE 染色 (術後 6 週)

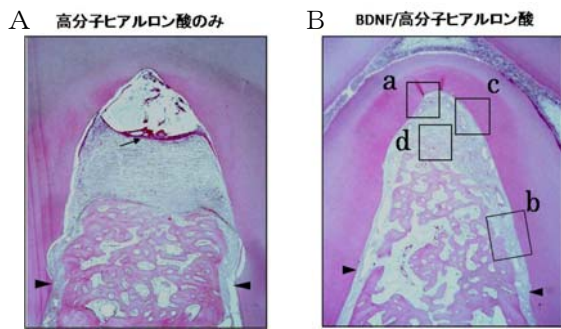
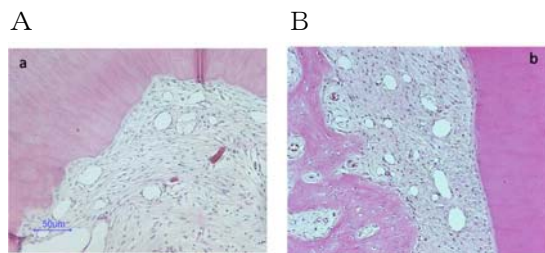


図 6 HE 染色 (術後 6 週)

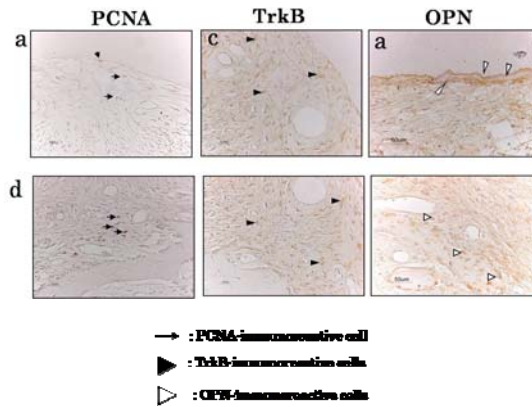


2 週モデルと比較し、再生歯槽骨上部をはじめ欠損部全体で PCNA 陽性細胞の発現は減少している。新生セメント質と象牙質の界面、新生セメント質表層には OPN の沈着が認められた(図 7)。

免疫染色の結果から、BDNF が投与後早期に

歯周靭帯細胞や未分化な間葉系幹細胞などの内在性細胞の増殖を trkB を介して促進させると示唆される。さらに、それらの細胞の象牙質表面におけるセメント芽細胞、歯槽骨周囲における骨芽細胞への分化にも関与していると考えられる。

図 7



②BDNF 受容体 (trkB) の SNP 解析

rs1624327 に関しては、HGF3 のみ A/A のホモで、他のゲノム DNA はすべて G/G のホモであった(図 8)。

rs1443445 は HGF1 と 9 が G/G のホモ、HGF2, 6, 7, 10 は A/G のヘテロ、HGF3, 4, 5, 8 は A/A のホモであった(図 9)。

rs3780645 は HGF10 のみ C/T のヘテロで、他は C/C のホモであった(図 10)。

図 8

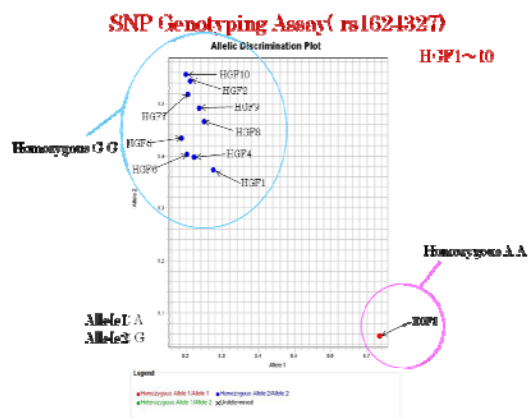


図 9

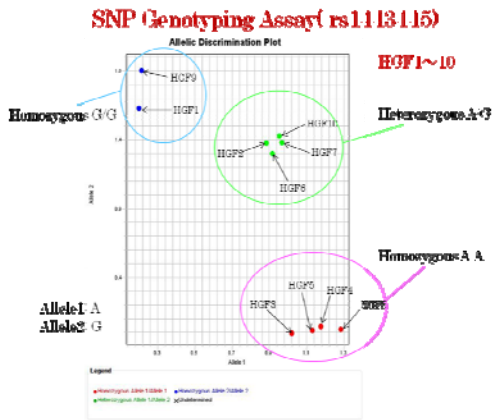
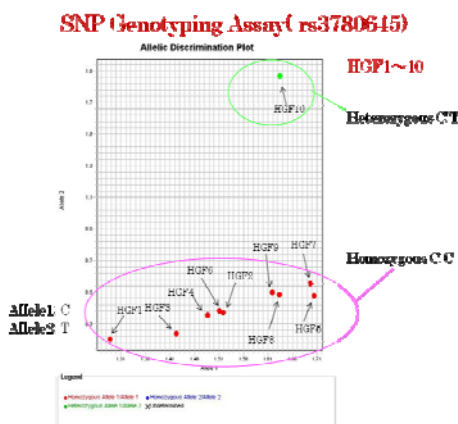
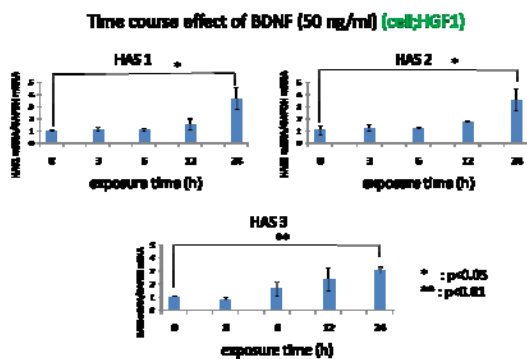


図 10



BDNF (50 ng/ml)は歯肉線維芽細胞の HAS-1、-2、-3 mRNA 発現をほぼ時間依存的に促進した。(図 1 1)

図 1 1

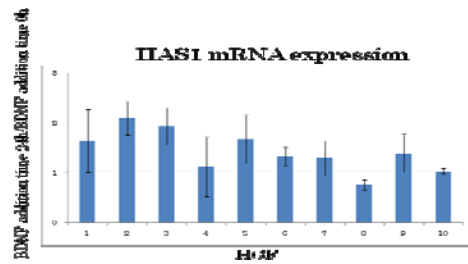


HGF4, 8, 10 は BDNF による HAS-1 mRNA 発現の促進が認められなかったのに対し、HGF2 や 3 は BDNF に対する反応が高かった(図 1 2)。

本研究結果②の trkB の SNP のデータと比較

して、明らかな関連性は認められなかった。今後、他の SNP や HAS 以外のターゲットにも着目して、trkB 受容体 SNP と BDNF に対する細胞の応答性との相関を明らかにしていくことで、歯周病患者への BDNF の選択基準の基礎データを得ることができると考えられる。

図 1 2



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 4 件)

1. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin $\alpha(V) \beta(3)$ -FAK cascade. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Shiba H, Kawaguchi H, Kurihara H. J Cell Physiol. (査読有)2011 Jul 18. May;227(5):2123-9.

2. Characteristics of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid as a Brain-Derived Neurotrophic Factor Scaffold in Periodontal Tissue Regeneration. Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, Iwata T, Matsuda S, Kawahara K, Kawaguchi H, Kurihara H. Tissue Eng Part A. (査読有)2011 Apr;17(7-8):955-67

3. The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics. Kajiya M, Shiba H, Komatsuzawa H, Ouhara K, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Mizuno N, Kawaguchi

H, Kurihara H. J Endod. (査読有)2010 Jun;36(6):1009-13.

4. The expressions of claudin-1 and E-cadherin in junctional epithelium. Fujita T, Hayashida K, Shiba H, Kishimoto A, Matsuda S, Takeda K, Kawaguchi H, Kurihara H. J Periodontal Res. (査読有)2010 Aug;45(4):579-82.

[学会発表] (計6件)

1. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Induces Migration of Endothelial Cells: Shinji Matsuda, Hidemi Kurihara 89th General session and Exhibition of the international association for dental research (2011年3月17日、サンディエゴ、USA)

2. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発: 武田克浩、柴秀樹、藤田剛、松田真司、小西昭弘、片桐菜穂子、河口浩之、栗原英見; 第10回日本再生医療学会総会 (2011年3月1日; 東京)

3. Brain-derived Neurotrophic Factor / Hyaluronic Acid Complex Enhances Periodontal Tissue Regeneration: K. Takeda, H. Shiba, H. Kawaguchi, H. Kurihara; The Korean Academy of Periodontology. The 50th Anniversary and International Congress of Scientific Meeting (2010年11月28日、ソウル、韓国)

4. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) はヒト歯肉線維芽細胞の TrkB を介してヒアルロン酸合成酵素発現を促進する: 片桐菜穂子、武田克浩、柴秀樹、小西昭弘、橋高瑞穂、藤田剛、松田真司、河口浩之、栗原英見; 第53回秋季日本歯周病学会学術大会 (2010年9月19日、香川)

5. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は血管内皮細胞遊走過程における integrin の発現、及び Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化

を制御する: 松田真司、藤田剛、加治屋幹人、武田克浩、柴秀樹、河口浩之、栗原英見; 第53回日本歯周病学会学術大会 (春季) (2010年5月14日、岩手)

6. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発 - 根面処理併用効果の検討 - : 小西昭弘、武田克浩、柴秀樹、林田浩一、橋高瑞穂、藤田剛、松田真司、河口浩之、橋本正道、辻紘一郎、栗原英見; 第9回日本再生医療学会 (2010年3月18日; 広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原英見 (Kurihara Hidemi)
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 40161765

(2) 研究分担者

柴秀樹 (Shiba Hideki)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 60260668

水野智仁 (Mizuno Noriyoshi)
広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 60325181

武田克浩 (Takeda Katsuhiko)
広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10452591

日野考宗 (Hino Takamune)
広島大学・病院・講師
研究者番号: 20274102

岩田倫幸 (Iwata Tomoyuki)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 30418793

H22→H23

林田浩一 (Hayashida Kouichi)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 10437585

H21→H21

(3) 連携研究者

()
研究者番号: