

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21001

研究課題名（和文）Poorly-contained欠損へのFGF-2コンビネーション療法の基盤構築

研究課題名（英文）Laying the groundwork for FGF-2 combination therapy for poorly-contained defects

研究代表者

村上 侑（Murakami, Tasuku）

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00962135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：骨壁の裏打ちの無い、重篤な骨欠損形態である“poorly-contained欠損”の歯周組織再生は臨床課題の1つである。本研究は、ラットのpoorly-contained型歯周組織欠損モデルに対する塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）と脱タンパクウシ骨ミネラル（DBBM）の併用が歯周組織治癒に及ぼす効果と、そのメカニズムを明らかにすることである。

poorly-contained欠損においてFGF-2とDBBMの併用は、DBBMが足場およびFGF-2の担体として機能し、細胞増殖および血管新生を促すことにより、新生骨形成を促進す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

これまで我々の研究グループは、FGF-2とDBBMの併用による効果について、ラット3壁性様歯周組織欠損モデルを用いて検討を行ってきた。DBBMがFGF-2の担体としても機能することを示し、両者の併用は3壁性様骨欠損において歯周組織治癒を促すことを見出した。診療ガイドライン等ではpoorly-contained欠損に対し、成長因子と足場材の併用療法が推奨されているものの、併用による治癒の詳細は明らかになっていない。本研究の成果として、これまで保存不可と診断していた重篤な歯周組織欠損に対する、効果的かつより予知性の高い歯周組織再生療法の確立への一助となった。

研究成果の概要（英文）：Periodontal regeneration of poorly-contained defects, a severe form of bone loss, is a clinical challenge. The purpose of this study is to investigate the effects of the combined use of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and deproteinized bovine bone mineral (DBBM) on the periodontal healing of poorly-contained defects in rats.

In poorly-contained defects, the combination of FGF-2 and DBBM was suggested to promote new bone formation by stimulating cell proliferation and angiogenesis, with DBBM acting as a scaffold and a carrier for FGF-2.

研究分野：歯周病学

キーワード：poorly-contained欠損 FGF-2 DBBM 歯周組織再生療法

様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周組織再生の成功のために、成長因子、足場、細胞、血液供給が重要な因子である(Bartold PM et al., J Periodontal Res, 2015)。成長因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は、これまでに歯周組織治療に関する様々な効果が報告されている。イヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルへの FGF-2 の局所使用は新生骨・セメント質を増加させ、細胞増殖、血管新生、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を促した (Murakami S., Periodontol 2000, 2011)。歯周炎に起因する歯槽骨欠損に対する FGF-2 の有効性が確認され (Kitamura M et al., J Bone Miner, 2016)、我が国で歯周組織再生療法に広く用いられている。脱タンパクウシ骨ミネラル (DBBM) はウシ由来の骨補填材であり、30 年以上、足場材として歯周治療等に使用されている。骨伝導能を有する DBBM の表層は多孔質であり、細胞接着・増殖に適した足場材である (Lee JH et al., J Periodontal Implant Sci, 2017)。

我々の研究グループは、歯周炎患者の骨内欠損を対象にしたランダム化比較試験を行い、FGF-2 と DBBM 併用群が FGF-2 単独使用群と比較し、エックス線画像上の骨添加 (radiographic bone fill) が有意に高い値を示したことを報告した (Saito A et al., J Clin Periodontol, 2019)。我々は、FGF-2 と DBBM の併用が歯周組織治療・再生に及ぼす影響に関する基礎的知見を得るため、ラット 3 壁性歯周組織欠損モデルに FGF-2 と DBBM を応用した研究を行った (Murakami T et al., Biomolecules, 2021)。その結果、DBBM が FGF-2 の担体としても機能する可能性を示し、FGF-2 と DBBM の併用は細胞増殖の増加、血管形成の調節、骨芽細胞分化などを促し、歯周組織治療を促進することを見出した。

(2) 歯周炎による骨内欠損において、骨壁数が歯周組織再生の成功に影響を及ぼす。3 壁性骨欠損は、スペースメイキングと血餅の保持の観点から、最も歯周組織再生の可能性が高い形態と考えられている (Reynolds MA et al., Clin Adv Periodontics, 2015)。一方、より重度に骨吸収が生じている、骨壁の裏打ちの無い 1・2 壁性骨欠損，“poorly-contained 欠損”の歯周組織再生の実現は臨床家および研究者の課題の 1 つである。poorly-contained 欠損に対し、成長因子の単独使用では歯周組織再生のためのスペースメイキングが十分に得られない懸念があり、成長因子と足場材の併用療法が推奨されている (Cortellini P & Tonetti MS., Periodontol 2000, 2015)。しかし、poorly-contained 欠損における FGF-2 と DBBM の併用の詳細な効果とそのメカニズムについては未だ明らかではない。そこで、poorly-contained 欠損において、DBBM が足場およびスペースメイキングの機能を担い、FGF-2 の併用により歯周組織治療を促進すると仮説を立てた (fig 1)。

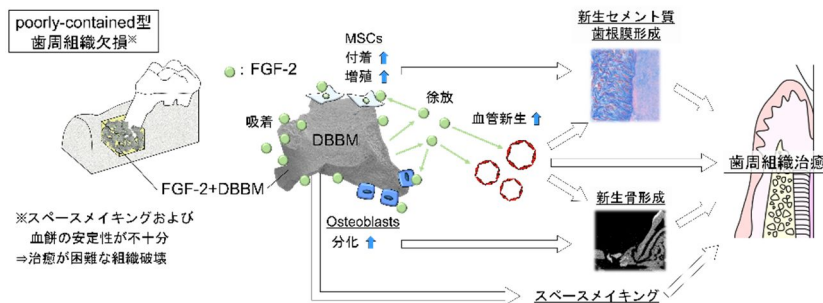


Fig 1. Hypothesis of this study.

### 2. 研究の目的

本研究では、ラット poorly-contained 型歯周組織欠損モデルにおいて、FGF-2 と DBBM の併用がどのような効果をもたらすのか、また、骨形成関連遺伝子発現や血管新生にどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

また、poorly-contained 型歯周組織欠損における FGF-2 と DBBM の併用による治療過程を in vivo と in vitro 実験で多角的に評価して、組織、細胞、遺伝子レベルでのメカニズムを解明し、有効性の実証を目標とする。本研究で得られる知見は、これまで保存不可と診断していた重篤な歯周組織欠損に対する、より予知性の高い歯周組織再生療法の提供を可能とする点に創造性があると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) ラット poorly-contained 型歯周組織欠損の作製・組織学的検討：ラットの上顎第一臼歯近心部に頬側に骨壁の裏打ちが無い poorly-contained 型歯周組織欠損を作製し、欠損内に生理食塩水 (Unfilled)、FGF-2、DBBM、または FGF-2+DBBM を応用する。術後 4 週で屠殺後、H-E 染色を行い、組織学的に治療の評価を行う。

(2) ラット poorly-contained 型歯周組織欠損の形態学的検討：術後 4 週で屠殺後、マイクロ CT 撮影、骨梁構造解析にて評価を行う。

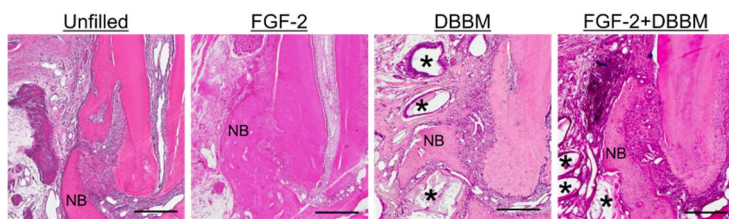
(3) ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) における血管新生能の解析：DBBM または FGF-2 添加 DBBM 上に BMSCs を播種する。72 時間でサンプルを採取し、細胞の VEGF 発現を共焦点レーザー顕微鏡にて評価する。

(4) BMSCs の生存・増殖率の測定：DBBM または FGF-2 添加 DBBM 上に BMSCs を播種する。24、72、120 時間でサンプルを採取し、細胞の生存・増殖率を WST-8 assay にて評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織学的観察 (H-E 染色)

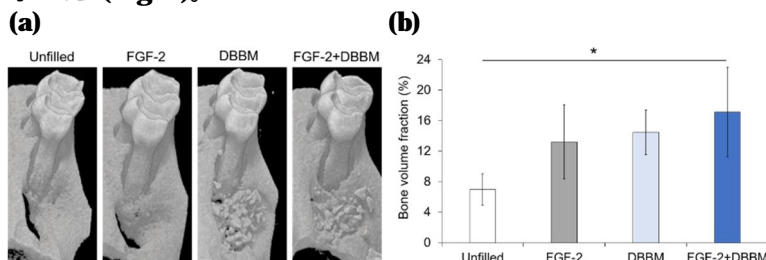
**FGF-2 および FGF-2+DBBM 群** : **Unfilled** および **DBBM** 群と比較し, 新生骨様構造物が多い傾向を認めた (**Fig. 2**).



**Fig 2. H&E stained histological observation at 4 weeks (original magnification  $\times 25$ ; bar = 500  $\mu\text{m}$ ). NB indicates newly formed bone; asterisks indicate DBBM particles.**

##### (2) 骨梁構造解析

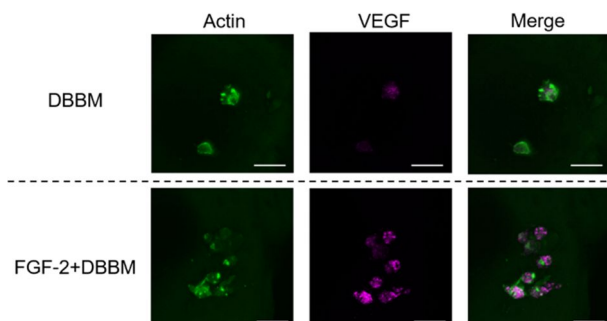
**FGF-2+DBBM 群** : **Unfilled** 群と比較し, 有意に高い骨体積率を示した (**Fig. 3**).



**Fig 3. (a) Micro-CT images at 4 weeks. (b) Quantitative analysis of micro-CT images by a 3-D structural analysis software (TRI/3D-BON). Data shown as the mean  $\pm$  SD (n = 5). \*p < 0.05 by ANOVA with Tukey's post-hoc test.**

##### (3) 接着細胞における VEGF 発現の観察

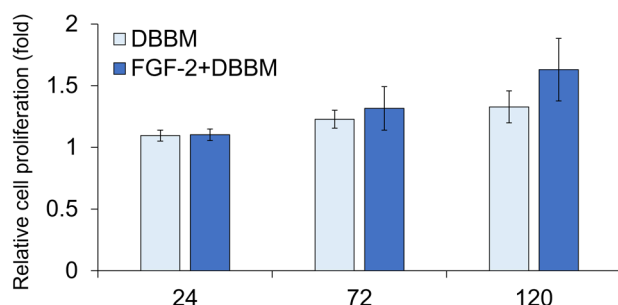
**FGF-2+DBBM 群** : **DBBM** 群と比較し, **VEGF** の発現を示す細胞が多く認められる傾向を示した (**Fig. 4**).



**Fig 4. CLSM images of BMSCs on the DBBM with/without FGF-2. CLSM images show cells stained for actin (green) and expressing a positivity for VEGF (purple) at 72 h (original magnification  $\times 200$ ; bar = 25  $\mu\text{m}$ ).**

##### (4) 細胞生存・増殖率 (WST-8 assay)

**FGF-2+DBBM 群** : **DBBM** 群と比較し, **120 時間**において有意に高い値を示した (**Fig. 5**).



**Fig 5. Viability/proliferation of BMSCs. The reference absorbance at 450 nm was subtracted from the absorbance for each sample, and the values relative to those at 0 h were shown. Data shown as mean  $\pm$  SD (n = 5). \*p < 0.05 by Mann-Whitney U test.**

以上の結果より, **FGF-2+DBBM** 群において, **DBBM** が足場および **FGF-2** の担体として機能し, 細胞増殖および血管新生を促すことにより, 新生骨形成を促進す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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Tasuku Murakami, Naoki Miyata, Daisuke Matsugami, Takahiro Bizenjima, Kentaro Imamura, Fumi Seshima, Atsushi Saito
2 . 発表標題 Combined effects of FGF-2+DBBM on periodontal healing of poorly-contained defects
3 . 学会等名 第108回アメリカ歯周病学会共催日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会2022年大会（国際学会）
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 村上侑, 松上大亮, 今村健太郎, 勢島典, 齋藤淳
2 . 発表標題 FGF-2とDBBMの併用がpoorly-contained型歯周組織欠損の治癒に及ぼす影響
3 . 学会等名 日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会（第157回）
4 . 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------