

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11652

研究課題名(和文) In situ 組織工学アプローチを応用した生体内完結型歯周再生療法の新たな試み

研究課題名(英文) The development of novel periodontal regenerative therapy using in situ tissue engineering approach

研究代表者

白方 良典 (Shirakata, Yoshinori)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：60359982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨・歯周組織再生治療において骨移植術、組織再生誘導法、生理活性物質の利用、細胞移植等が実践されている。特に、細胞移植療法は細胞採取の侵襲、幹細胞数、分化コントロール手法の確立等の課題と共に実用化に関わるコスト、チェアサイドまでの時間等、解決すべき点が少なくない。そこで細胞移植を行わず、最大限に宿主細胞の動員と賦活化、創傷治癒の安定化を計る in situ (欠損内での) 組織工学アプローチの確立を目的に実験動物を用い検証を行った。その結果、新たな生理活性物質 (rhBMP9)、物理刺激 (超音波パルス波) や欠損改変 (骨髄穿孔) を行うことで、安全かつ効果的に骨・歯周組織再生が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎は歯周組織の破壊や歯の喪失をきたす世界的に広く蔓延する細菌感染症である。これまで歯周組織の再生を目的に骨移植術、組織再生誘導法、生理活性物質の利用、これらの併用といった様々な治療法が実践されている。近年は体外からの細胞移植が試みられている。しかしこれらのアプローチによりもたらされる結果はばらつきが大きく、その限界も指摘されている。そこで今回、体外から細胞導入を行わず歯周組織欠損「その場：in situ」内で、新たな生理活性物質、欠損形態の改変、微弱な超音波パルス波等を用い宿主由来の前駆細胞/幹細胞を効率的に活性化し自己修復能を引き出すことで安全かつ効率的な骨・歯周組織再生療法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a globally prevalent inflammatory disease that causes destruction of periodontal tissues. In the past 4 decades, a variety of procedures, including bone grafting, guided tissue regeneration, and the use of growth factors (GFs) have been performed either alone or in combination to accomplish periodontal regeneration. More recently, tissue engineering technologies using scaffolds, GFs and cells have been reported for regenerative medicine. However, all current approaches have been shown to have variable outcomes and limitations. To obtain favorable periodontal healing, there is an ongoing need to develop more reasonable therapeutics based on self-repair capacity in injured periodontal defects where the progenitor/stem cells from neighboring tissues can be recruited for in situ periodontal regeneration. Thus, a novel periodontal regenerative therapy using rhBMP9, bone perforation, and low-intensity pulsed ultrasound that avoid cell transplantation was developed.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 シグナル分子 物理刺激 足場材 組織工学アプローチ 超音波パルス波

## 1. 研究開始当初の背景

人類史上、最も有病率の高い感染症の一つとされている歯周病により失われた歯周組織を回復し、咀嚼機能や審美性の向上を目的とした歯周組織再生療法が盛んである。これまで歯周組織再生療法として骨移植術、組織再生誘導法、各種シグナル分子（成長因子、エナメル蛋白）の応用等が為されている。さらに近年では足場材とシグナル分子の応用に加え、生体組織工学の概念を具現化し、積極的かつ多量の組織再生を目的とした細胞移植法が注目され、骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs）、iPS 細胞、脱分化脂肪細胞等を細胞ソースとした骨・歯周組織再生が報告<sup>1,2</sup>され期待が寄せられている。しかし細胞採取の侵襲、限られた幹細胞数、分化コントロール手法の確立、外来遺伝子の導入等の課題と共に実用化に関わるコスト、チェアサイドに至るまでの時間のコントロール等、解決すべき点が少なくない。

これまで申請者は上記因子の検討を行ってきたが、1) 吸収の遅い足場材料は骨再生を遅延させる可能性があること<sup>3,4</sup>、2) 骨髄穿孔（IMP）による血液供給の促進が骨再生に有効なこと<sup>5</sup>、残存骨壁の少なく再生効果の低い歯周組織欠損においても 3) 意図的な欠損形態の改変とシグナル分子を効果的に用いることで無細胞性セメント質、機能的な歯根膜再生が得られること<sup>6</sup>を明らかとした。これらのことから細胞移植を用いずに、歯周組織欠損内（*in situ*）でシグナル分子を吸収性の高い足場材と併用し、戦略的に歯周組織欠損の環境整備と宿主細胞の賦活化を計ることさらに簡便にかつ効率的に歯周組織再生を誘導すると考えられた。歯周組織には元来、内在性の歯根膜幹細胞が存在し BMSCs よりはるかに高い増殖能があり<sup>7</sup>、メカニカルストレスを受けるとそれは6倍になる<sup>8</sup>こと、さらに多分化能を有する<sup>9</sup>ことが知られている。また難治性の骨折等に対して微弱な超音波パルス波（LIPUS）で刺激することで骨修復の過程に関わる種々の細胞の遊走・増殖・分化が誘導され創傷治癒に関わるシグナル分子の発現が増加すること<sup>10</sup>が知られ、整形外科領域を中心に近年、研究報告が多くなされている。

## 2. 研究の目的

本研究では骨・歯周組織再生治療において、生体外から細胞移植を行うことなく新たなシグナル分子としてリコンビナントヒト BMP9（rhBMP9）に着目し、生体材料（吸収性コラーゲンスポンジ：ACS）さらにメカニカルストレスとして LIPUS や欠損の改変（IMP）を用いることで最大限に宿主細胞の動員と賦活化、創傷治癒の安定化を計る *in situ*（欠損その場での）組織工学アプローチの有用性を検証し、低侵襲かつ効率的な生体内完結型の骨・歯周組織再生療法の確立を目的に以下の実験を行った。

## 3. 研究の方法

骨再生評価として ラット頭蓋骨欠損モデル、歯周組織再生評価として イヌ 2 壁性骨内欠損モデルを用いて *in situ* 組織工学アプローチの有用性を検証した。

### (1)

実験系 ではラット（12 匹）の頭頂骨に径 2.7mm の骨欠損を外科的に作製（4 欠損/匹）し、LIPUS 非照射群として 1) コントロール（骨欠損のみ）：a 群、2) ACS 移植のみ（ACS）：b 群、3) ACS/rhBMP9（1.0 $\mu$ g/部位）移植：c 群を施術し、LIPUS 照射群として超音波出力値（30 mW/cm<sup>2</sup>）、パルス周波数 1000 Hz、超音波プローブ（M・1.5MHz・平型）の条件で 4) コントロール+LIPUS：d 群、5) ACS 移植+LIPUS：e 群、6) ACS/rhBMP9 移植+LIPUS：f 群に分け週に 5 回（20 分/回）の LIPUS 照射を行い 4 週観察を行った。

### (2)

実験系 だがイヌ（4 匹）の下顎第 2 前臼歯遠心と第 4 前臼歯近心に外科的に作製した 2 壁性骨内欠損（4 欠損/匹）の一方には骨髄穿孔（IMP 群）を施し、もう一方は無処置（OFD 群）とした後、歯肉弁を復位縫合し片側を LIPUS 非照射群とし、実験系（1）と同様の照射条件で対側は LIPUS 照射群（IMP+LIPUS 群、OFD+LIPUS 群）とし、術後 1 週より 3 週間 LIPUS を毎日照射し 4 週観察を行った。

## 4. 研究成果

(1) 組織形態計測の結果、f 群で a 群、b 群、d 群、e 群に対して欠損閉鎖率において、また a 群、b 群、c 群、d 群、e 群に対して新生骨面積率において統計学的に有意に高い値が認められた。この結果より rhBMP9 の効果が LIPUS を併用することで骨再生により効果的に働くことが示唆された。LIPUS 刺激によって骨吸収因子である IL-6 ならびに血管内皮細胞成長因子である VEGF を骨芽細胞様細胞より放出する事が報告されている。また BMP9 は BMP2 と同等もしくはそれ以上の骨誘導能を有することが示されている。今回の結果は rhBMP9 の骨誘導能が LIPUS の血管新生亢進ならびにリモデリングの活性化により増強されていたことに起因するものかもしれない。

(2) 組織形態計測の結果、OFD+LIPUS 群と IMP+LIPUS 群の新生骨形成量は OFD 群より有意に多く、新生セメント質形成量は OFD+LIPUS 群が OFD 群、IMP 群より有意に多かった。これらのことから LIPUS は 2 壁性骨内欠損においても歯周組織再生を効果的に促進することが示唆された。

実験系(1)および(2)においていずれの実験系の個体においても術後(処置後)の術野の治癒遅延・発赤・腫脹等は認められず、rhBMP9, ACS, IMP, LIPUS に生体為害作用はなく効果的に骨再生・歯周組織再生を促したことからシグナル分子、生体材料および機械的・物理化学的的刺激を効果的に組み合わせることで、生体外から細胞移植を行うことなく *in situ* 組織工学アプローチが有効であることが示された。

#### 引用文献

Duan X et al., Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration, J Cell Physiol, 26, 2011, 150-157

Yan XZ et al., Cell-Based Approaches in Periodontal Regeneration: A Systemic Review and Meta-Analysis of Periodontal Defect Models in Animal Experimental Work, Tissue Eng Part B Rev, 21, 2015, 411-426

Yoshinuma N et al., Ankylosis of nonresorbable hydroxyapatite graft material as a contributing factor in recurrent periodontitis, Int J Periodontics Restorative Dent, 32, 2012, 331-336

Sato S et al., Removal of infected nonresorbable hydroxyapatite graft material in recurrent periodontitis: a report of two cases, J Oral Sci, 51, 2009, 659-663

Crea A et al., Intrabony defects, open-flap debridement, and decortication: a randomized clinical trial, J Periodontol, 85, 2014, 34-42

Shirakata Y et al., Effects of EMD in combination with bone swaging and calcium phosphate bone cement on periodontal regeneration in one-wall intrabony defects in dogs, J Periodontal Res, 48, 2013, 37-43

Tamaki Y et al., In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow, Odontology, 101, 2013, 121-132

Gould TR et al., Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding, J Periodontal Res, 15, 1980, 20-42

Seo BM et al., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, Lancet, 364, 2004, 149-155

Padilla F et al., Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects, Ultrasonics, 54, 2014, 1125-1145

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Shirakata Y, Nakamura T, Shinohara Y, Nakamura-Hasegawa K, Hashiguchi C, Takeuchi N, Imafuji T, Sculean A, Noguchi K, Split-mouth evaluation of connective tissue graft with or without enamel matrix derivative for the treatment of isolated gingival recession defects in dogs, Clin Oral Investig, 査読有, 2018, doi: 10.1007/s00784-018-2750-1

Saida H, Fukuba S, Miron R, Shirakata Y, Efficacy of flapless intensional replantation with enamel matrix derivative in the treatment of hopeless teeth associated with endodontic-periodontal lesions: A 2-year prospective case series, Quintessence Int, 査読有, Vol. 49, No. 9, 2018, pp. 699-707 doi: 10.3290/j-qi.a40782

Takeuchi N, Shirakata Y, Shinohara Y, Sena K, Noguchi K, Periodontal wound healing following reciprocal autologous root transplantation in class furcation defects, J Periodontal Implant Sci, 査読有, Vol. 47, No. 6, 2017, pp. 352-362 doi: 10.5051/jpis.2017.47.6.352

Shirakata Y, Miron RJ, Shinohara Y, Nakamura T, Sena K, Horai N, Bosshardt DD, Noguchi K, Sculean A, Healing of two-wall intra-bony defects treated with a novel EMD-liquid A pre-clinical study in monkeys, J Clin Periodontol, 査読有, Vol. 44, No. 12, 2017, pp. 1264-1273 doi: 10.1111/jcpe.12825

Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K, Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects, Clin Oral Investig, 査読有, Vol. 21, No. 9, 2017, pp. 2671-2679 doi: 10.1007/s00784-017-2069-3

Shirakata Y, Miron RJ, Nakamura T, Sena K, Shinohara Y, Horai N, Bosshardt DD, Noguchi K, Sculean A, Effects of EMD liquid (Osteogain) on periodontal healing in class furcation defects in monkeys, J Clin Periodontol, 査読有, Vol. 44, No. 3, 2017, pp. 298-307 doi: 10.1111/jcpe.12663

Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Zhang Y, Sculean A, Pippenger B, Shirakata Y, Kandalam U, Hernandez M, Osteogain loaded onto an absorbable collagen sponge induces attachment and osteoblast differentiation of ST2 cells in vitro, Clin Oral Investig, 査読有, Vol. 21, No. 7, 2017, pp. 2265-2272

〔学会発表〕(計 4 件)

Y Shirakata, T Nakamura, Y Shinohara, K Nakamura-Hasegawa, C Hashiguchi, N Takeuchi, T Imafuji, A Sculean, K Noguchi, Healing of gingival recessions treated with coronally advanced flaps and subepithelial connective tissue grafts with or without an enamel matrix derivative: A comparative study in dogs *Europero*9 2018

白方良典 Critical issues in periodontal tissue regeneration - 歯周組織再生療法の予知性向上を目指して -、平成 30 年度日本歯周病学会九州 5 大学・日本臨床歯周病学会九州支部共催合同研修会、2018

白方良典 野口和行、広汎型慢性歯周炎患者に歯周外科処置と自家歯牙移植により天然歯と咬合の保全に努めた一症例、第 60 回春季日本歯周病学会学術大会、2017

Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, Richard J Miron, Kozue Nakamura-Hasegawa, Kazuyuki Noguchi, A comparative study of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical size defects *Osteology* Japan 2017

〔図書〕(計 4 件)

Richard J. Miron, Anton Sculean, David L. Cochran, Nikos Donos, James Deschner, Michel Dard, Yufeng Zhang, Adrian Kasaj, Yoshinori Shirakata, Dieter D. Bosshardt, Quintessence Publishing Co, Inc, Next-Generation Biomaterials for Bone and Periodontal Regeneration Chapter 14 Enamel Matrix Derivative: Preclinical Biologic Background、2019、197-210

Richard J. Miron, Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Nikola Saulacic, Kazuyuki Noguchi, Yufeng Zhang, Masako Fujioka-Kobayashi, Quintessence Publishing Co, Inc, Next-Generation Biomaterials for Bone and Periodontal Regeneration Chapter 18 Next-Generation Bone Morphogenetic Protein 9: The Future of Bone Regeneration?、2019、255-264

Richard J. Miron, Yoshinori Shirakata, Yufeng Zhang, Benjamin Pippenger, Toshiaki Nakamura, Kazuyuki Noguchi, Anton Sculean, Quintessence Publishing Co, Inc, Next-Generation Biomaterials for Bone and Periodontal Regeneration Chapter 19 Osteogain: The Next Generation of Enamel Matrix Derivative、2019、265-282

Nikolaos Donos, Iro Palaska, Elena Calciolari, Yoshinori Shirakata, Anton Sculean, John Wiley & Sons Ltd, Diagnosis and treatment of furcation-involved teeth Chapter 6: Regenerative therapy of furcation involvements in preclinical models: What is feasible?、2018、105-135

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100004960\\_ja.html?k=白方](http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100004960_ja.html?k=白方)

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 利明

ローマ字氏名：Toshiaki Nakamura

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：60381183

研究分担者氏名：瀬名 浩太郎

ローマ字氏名：Kotaro Sena

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：60701117

(2)研究協力者

研究協力者氏名：リチャード・マイロン

ローマ字氏名：Richard Miron

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。