

令和元年5月12日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17345

研究課題名(和文) ナノアパタイトと低出力超音波パルスを基軸とした新規歯周組織再生療法の基盤構築

研究課題名(英文) A basic study of a new periodontal regenerative therapy with nanoparticles of hydroxyapatite and Low Intensity Pulsed Ultrasound

研究代表者

向阪 幸彦 (SAKISAKA, Yukihiro)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：10760457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代型歯周組織再生技術の開発のために骨補填材であるナノサイズハイドロキシアパタイト(nano-HA)と骨折治療で臨床応用されている低出力超音波パルス(LIPUS)の併用に着目した。nano-HA刺激により硬組織形成細胞の骨分化が誘導され、LIPUSは古典的Wntシグナルを誘導することが示唆された。一方で免疫細胞に対してはLIPUSが破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリンの発現を誘導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

骨置換性にすぐれ、その表面性状から薬物の徐放能を有するドラッグデリバリー材料であると同時に遺伝子デリバリーシステムとしての有用な材料であるnano-HAはそれ自体が硬組織形成を誘導することに加え、LIPUSが前セメント芽細胞と考えられている歯小囊細胞に対して古典的Wntシグナルを介して硬組織形成細胞への分化を誘導することが示唆された。またLIPUSは創傷治癒過程において司令塔の役割を果たすマクロファージに対しても破骨細胞の分化誘導を抑制する作用が示されたことから、歯周組織の再生に対しても有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Nano-sized hydroxyapatite (nano-HA) is known as a bone graft material, and low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) is used in clinical applications for fracture treatment. In this study, we evaluated the synergistic effect between nano-HA and LIPUS for a new periodontal regenerative technique.

Nano-HA induced osteopontin gene expression, osteogenic marker, in murine dental follicle cell line (SVF4), murine pluripotent mesenchymal cell line and murine preosteoblast cell line. LIPUS stimulated canonical Wnt signaling in SVF4.

We also assessed the effects of them in immune cells. LIPUS induced gene expression of osteoprotegerin, also known as osteoclastogenesis inhibitory factor, in murine macrophage-like cell line.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯科 再生医療 シグナル伝達 細胞・組織 メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生とは、歯周病で失われた歯周組織、すなわち、セメント質、骨、および歯根膜を形態的および機能的に再生させることである。歯根膜組織にはセメント芽細胞、骨芽細胞、および歯根膜線維芽細胞への多分化能を有する幹細胞が存在することから、この幹細胞の分化を誘導するサイトカインが注目され、現在はそのいくつかが医薬品として臨床応用されている。しかしながら、歯根膜細胞の分化を規定する因子は未だ明らかではなく、その臨床的効果は限定的である。加えて、硬・軟組織の3次元配置を伴う再生が要求される歯周組織に適したスキャフォールドについても模索が続いている状況であり、さらなる学術基盤の発展とそれに基づいた臨床開発が喫緊の課題と言える。

リン酸カルシウムの合成生体材料であるアパタイトは、高い生体適合性と骨伝導性を有するため骨補填材として広く使用されてきた。近年、ナノ粒子の再生医療への応用を目指した研究が注目されている中、粒子径をナノレベルまで縮小したナノサイズハイドロキシアパタイト (nano-HA) は骨置換性にすぐれ、薬物の徐放能を有するドラッグデリバリー材料であると同時に遺伝子デリバリーシステムとしての有用な材料であることが知られている。加えて、合成高分子生体吸収性材料と組み合わせることにより立体的な賦形が可能であることからスキャフォールドに適した生体材料とも考えられる。更に申請者は nano-HA 自体がセメント芽細胞の分化制御因子である Wnt シグナル誘導能を有していることを明らかにしている。また、nano-HA は、ヒト歯根膜細胞の骨形成蛋白 (BMP-2) 発現を誘導することも報告されており (Arch Oral Biol, 58:1021, 2013)、nano-HA は歯周組織再生療法のスキャフォールドの開発に最適な生体材料になりうると考えられる。

低出力超音波パルス (Low intensity pulsed ultrasound; 以下 LIPUS) 療法は、1980 年代に骨折治癒促進効果が証明されて以来、国内においては 1995 年に難治性骨折超音波治療法の保険適応が新設され、現在整形外科領域における理学療法として広く用いられている。LIPUS の照射は骨関連細胞に対してメカニカルストレスとして作用し、骨芽細胞の分化を促し、骨形成を促進することが報告されている。歯根膜は咬合によるメカニカルストレスを日常的に受けている組織であり、細胞膜上のメカノセンサーを介して様々な細胞内シグナル伝達が活性化されている。これまでに、LIPUS 照射は培養歯根膜細胞の分化を促進すること (Inubushi ら, 2008)、BMP-2 シグナルの活性化を介してヒト歯根膜細胞の硬組織細胞系への分化を誘導すること (Gao ら, 2016; Yang ら, 2014) またビーグル犬の下顎大白歯分岐部病変への歯周外科処置に対して術後の骨形成を増強することも報告されている (Wang ら, 2014)。

これらの事実に基づき、nano-HA 刺激と LIPUS によるメカノセンサー刺激を基軸とすることで、高効率かつ高い予知性を持った次世代の歯周組織再生療法となり得るといふ仮説を立てた。本研究の目的は、nano-HA と LIPUS の併用による細胞分化促進効果を明らかにし、次世代型歯周組織再生治療に向けたデュアル組織再生誘導技術の開発のための研究基盤を確立することである。

2. 研究の目的

前セメント芽細胞と考えられている歯小囊細胞に対して nano-HA および LIPUS を作用させ、遺伝子発現およびタンパク発現によるセメント芽細胞への分化誘導を検証し、その分子メカニズムを解析する。また、歯周組織の炎症から再生までの一連の過程で関与する免疫系細胞に対しても nano-HA および LIPUS を作用させ、歯周組織再生に寄与する効果について検証する。

3. 研究の方法

nano-HA は Hydroxyapatite nanopowder (粒径<200 nm, Sigma Co.)を使用し、培地中に 200 µg/ml の濃度条件で添加し所定時間培養した。

LIPUS 照射は ST-SONIC (伊藤超短波 (株)) を用い、照射条件については、骨芽細胞の分化促進の至適条件とされている波長 1.5MHz, 出力 30 mW/cm², 時間 20 分を基準とした。LIPUS 装置は伊藤超短波 (株) との材料譲渡同意書の契約締結した上で貸与されている。照射後、所定時間培養を行い、以下の解析を行った。

(1) 硬組織形成細胞に対する nano-HA の分化誘導作用の解析

マウス歯小囊細胞株 SVF4、マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 およびマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を nano-HA 存在下で 6 時間培養後、その遺伝子発現をリアルタイム PCR を用いて解析した。

(2) 歯小囊細胞における LIPUS の硬組織誘導作用の解析

SVF4 に古典的 Wnt シグナルの代表リガンドである Wnt3a を 30ng/ml の条件で添加し、1 日 20 分間 LIPUS 照射を行った。3 日間培養後、比色法を用いて発現しているアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を解析した。

(3) 歯小囊細胞における LIPUS の古典的 Wnt 経路の活性作用の解析

SVF4 に所定濃度の Wnt3a を添加した上で 20 分間 LIPUS 照射を行い 6 時間培養した。培養後、古典的 Wnt シグナル経路の転写活性をレポーターアッセイ法を用いて解析した。

(4) 免疫系細胞における LIPUS の骨形成誘導作用の解析

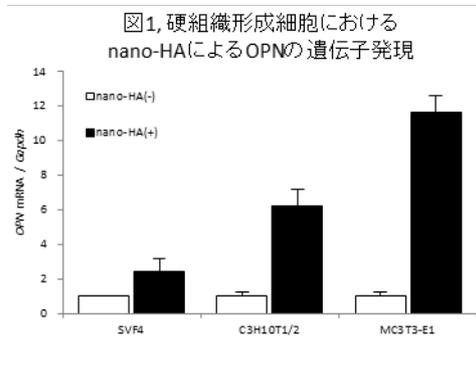
マウスマクロファージ細胞株 J774.1 に nano-HA を添加し、1.5MHz, 60 mW/cm², 1 時間の条件で LIPUS 照射を行った。刺激から 24 時間後、その遺伝子発現をリアルタイム PCR 法

を用いて解析した。

4. 研究成果

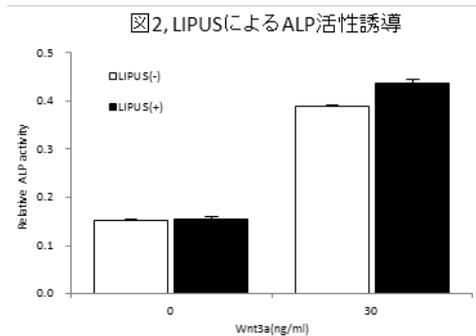
(1)硬組織形成細胞に対する nano-HA の分化誘導作用の解析

歯小嚢細胞に対して nano-HA を添加することで中期骨分化マーカーであるオステオポンチン (OPN) の遺伝子発現の誘導を認めた。また間葉系幹細胞および前骨芽細胞においても同様の発現誘導を確認した (図 1)。



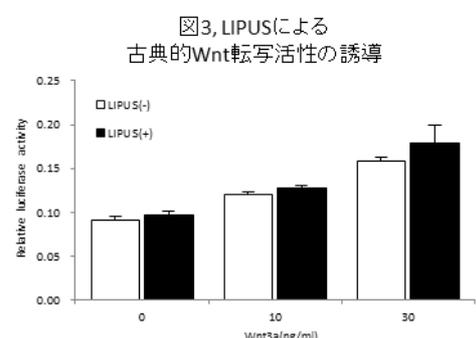
(2)歯小嚢細胞における LIPUS の硬組織誘導作用の解析

歯小嚢細胞に Wnt3a 存在下にて LIPUS 照射を行ったところ、ALP 活性の誘導を認めた。Wnt3a 非存在下では ALP 活性の誘導を確認できなかったことから、LIPUS は Wnt3a 誘導性 ALP 活性に特異的に作用するものであり古典的 Wnt シグナル経路に参与していることが示唆された (図 2)。



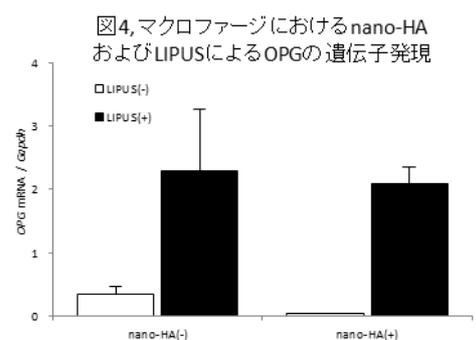
(3)歯小嚢細胞における LIPUS の古典的 Wnt 経路の活性作用の解析

歯小嚢細胞に LIPUS 照射を行ったところ、古典的 Wnt シグナル経路の転写活性の亢進を認めた (図 3)。



(4)免疫系細胞における LIPUS の骨形成誘導作用の解析

マクロファージに LIPUS 照射を行うことで破骨細胞形成抑制因子であるオステオプロテグリン (OPG) の遺伝子発現の誘導を認めた。同細胞に nano-HA を添加することで OPG の遺伝子発現誘導は抑制されるが、LIPUS は nano-HA による OPG 遺伝子発現の抑制を阻害する方向に作用することが示唆された (図 4)。



以上の結果から、歯小嚢細胞においては nano-HA による分化誘導と LIPUS による古典的 Wnt シグナル経路の賦活化によって硬組織形成を誘導することが示唆された。一方でマクロファージにおいては LIPUS が nano-HA による破骨細胞への分化誘導を抑制する方向に作用することが示唆された。上記により nano-HA と LIPUS の併用が歯周組織再生に有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kentaro Maruyama, Yukihiko Sakisaka, Mizuki Suto, Hiroyuki Tada, Takashi Nakamura, Satoru Yamada, Eiji Nemoto
Cyclic stretch negatively regulates IL-1 β secretion through the inhibition of NLRP3 inflammasome activation by attenuating the AMP kinase pathway
Front Physiol. 9:802. 2018 (査読有)
DOI: 10.3389/fphys.2018.00802

Sousuke Kanaya, Binlu Xiao, Yukihiko Sakisaka, Mizuki Suto, Kentaro Maruyama, Masahiro Saito, Eiji Nemoto
Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells
J Appl Oral Sci. 26:e20170231. 2018 (査読有)
DOI: 10.1590/1678-7757-2017-0231

池野修功、根本英二、金谷聡介、須藤瑞樹、向阪幸彦、島内英俊、山田 聡
ヒト歯根膜細胞の分化・増殖に対する Berberine の作用
日本歯周病学会誌 60(1):13-25. 2018 (査読有)
DOI: <https://doi.org/10.2329/perio.60.13>

〔学会発表〕(計8件)

向阪幸彦、丸山顕太郎、張井玉、石幡浩志、根本英二、佐々木啓一、初澤毅、山田聡
Serial cultivation of osteogenic cells by automatic transfer between culture substrate of microperforated titanium membrane
第3回生体医歯工学共同研究拠点国際シンポジウム、2018/11/8-9、広島

Eiji Nemoto, Kentaro Maruyama, Yukihiko Sakisaka, Mizuki Suto, Hiroyuki Tada, Takashi Nakamura, Satoru Yamada
Cyclic stretch inhibits IL-1 β secretion by attenuating NLRP3 inflammasome activation
The 104th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Canadian Academy of Periodontology, 2018/10/27-30, Vancouver

Mizuki Suto, Eiji Nemoto, Kentaro Maruyama, Yukihiko Sakisaka, Satoru Yamada
LIPUS inhibits IL- β secretion through NF- κ B signaling pathway in macrophages
The 104th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Canadian Academy of Periodontology, 2018/10/27-30, Vancouver

Yukihiko Sakisaka, Kentaro Maruyama, Jingyu Zhang, Hiroshi Ishihata, Eiji Nemoto, Keiichi Sasaki, Takeshi Hatsuzawa, Satoru Yamada
Application of microperforated titanium mesh for tissue engineered regeneration
The 104th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Canadian Academy of Periodontology, 2018/10/27-30, Vancouver

須藤瑞樹、石幡浩志、向阪幸彦、山田聡、長谷川博
新規 GBR 用純チタン製メンブレンの有用性について： β TCP を用いた in vivo での評価
第61回秋季日本歯周病学会学術大会、2018/10/26-27、大阪

石幡浩志、須藤瑞樹、向阪幸彦、小松秀裕、丸山顕太郎、山田聡、長谷川博
骨補填材を用いた GBR における純チタン製メンブレンの有効性について
第61回秋季日本歯周病学会学術大会、2018/10/26-27、大阪

向阪幸彦、石幡浩志、須藤瑞樹、小松秀裕、丸山顕太郎、山田聡、長谷川博
in vivo での新規 GBR 用純チタン製メンブレンの有効性について
第61回秋季日本歯周病学会学術大会、2018/10/26-27、大阪

向阪幸彦、丸山顕太郎、張井玉、石幡浩志、根本英二、佐々木啓一、初澤毅、山田聡
チタン製メンブレンを用いた新規細胞培養法の開発
平成29年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会、2018/3/9-10、横浜

〔その他〕

<http://www.dent.tohoku.ac.jp/field/biology/04/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

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。