

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791614

研究課題名（和文） レプチンを用いた歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of periodontal tissue regeneration using leptin

研究代表者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60325181

研究成果の概要：間葉系幹細胞を実験的 3 壁性骨欠損に投与し、歯周組織再生過程における leptin の発現動態を免疫組織化学的に調べた結果、leptin は歯槽骨再生初期過程における骨芽細胞およびその周辺の間葉系幹細胞が分化したと考えられる細胞に強く発現していることが示された。マイクロアレイ解析によって leptin 500 ng/ml をヒト間葉系幹細胞に作用させると Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1(Smurf 1)の発現が約 10 分の 1 と有意に低下することが明らかとなった。レプチンによって Smurf1 の発現が低下することが、ヒト間葉系幹細胞におけるレプチンの骨文化促進の一端をになっている可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

レプチンは脂肪細胞から分泌され、視床下部に存在するレプチン受容体に結合し、節食抑制やエネルギー亢進に関与する肥満抑制ホルモンとして同定された。近年、その作用は骨代謝、血圧調節等、広範囲に及び、間葉系幹細胞、骨芽細胞および血管内皮細胞の機能制御に関わることが明らかにされている。しかし、レプチンの歯周組織における発現や

役割は国内外でもほとんど解明されておらず、歯周組織においても骨代謝等の重要な役割を担っている可能性がある。申請者は免疫染色法を用いて培養ヒト歯周靭帯細胞およびラット歯周靭帯においてレプチン受容体の発現が認められること、また、培養ヒト歯周靭帯細胞を骨分化誘導培地で培養すると、培養開始から 15 日でレプチンの発現が約 70 倍に増加することを明らかにした。さらに培養ヒト歯周靭帯細胞を骨分化誘導培地で培

養し、ヒトリコンビナントレプチン(600ng/ml)を添加すると骨分化が促進することも明らかにした。よってレプチンはヒト歯周靭帯細胞に発現するレプチン受容体を介して硬組織分化を調節し歯周組織再生に関与する可能性があることから本研究を着想した。

2. 研究の目的

レプチンがヒト間葉系幹細胞およびヒト歯周靭帯細胞に及ぼす影響を明らかにするとともに、レプチンが歯周組織再生に有用な調節因子であるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) レプチンが培養ヒト歯周靭帯細胞の硬組織関連タンパク質発現に及ぼす影響

レプチンを 0,100,300,600 ng/ml の濃度で培養ヒト歯周靭帯細胞に作用させ、以下の硬組織関連タンパク質発現に及ぼす影響を real-timePCR 法および ELISA 法を用いて調べる。

硬組織関連タンパク質

RUNX2, osterix, osteopontin, osteocalcin, alkalinephosphatase, bone sialoprotein, collagen type I, bone morphogenetic protein 2

(2) ビーグル犬を用いた実験的歯周組織欠損に対するレプチンおよび細胞外基質の移植

① 実験的歯槽骨欠損の作成

ビーグル犬の下顎第2、第3、第4小白歯に歯槽頂から約4mmの3級根分岐部病変を作製。

② 実験的歯槽骨欠損へのレプチンの移植

コラーゲンあるいはポリ乳酸を scaffold として用いる。

control(生理食塩水)、レプチン 100, 300, 600 µg/ml を骨欠損部に移植する。

2、4、8、16週後に歯周組織の再生状態を評価する。

③ 歯周組織再生の評価

骨再生量およびセメント質再生量を組織学的に計測し評価する。

(3) マイクロアレイ法を用いて、レプチン作用時に培養ヒト間葉系幹細胞において発現が変化する遺伝子群の網羅的解析

AFFYMETRIX 社 Human Genome U133 Plus 2.0 Array (47000 遺伝子)を用いて、レプチン作用時に培養ヒト歯周靭帯細胞で 1) 発現が 1.5 倍以上増加する遺伝子および 2) 発現が 1.5 倍以上減少する遺伝子群を網羅的に解析する。

RNA の抽出、精製後、蛍光色素で標識、基盤状の DNA とハイブリダイゼーション
発現の変化する遺伝子群の情報処理

マイクロアレイ解析ソフト Signet Viewer を用いてデータベースの構築

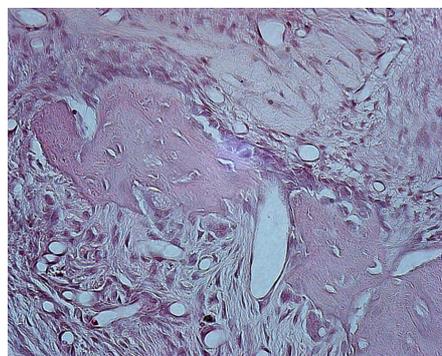
(4) 免疫染色法を用いた歯周組織再生過程における leptin および osteopontin 発現の解析

作製した組織切片を用いて歯周組織再生過程における骨・セメント質関連タンパク質発現を免疫染色法によって調べる。

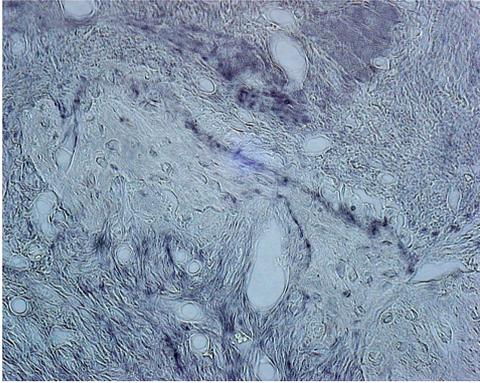
4. 研究成果

Leptin は濃度依存的にヒト歯周靭帯細胞の osteopontin, osteocalcin の mRNA 発現を増加させた。

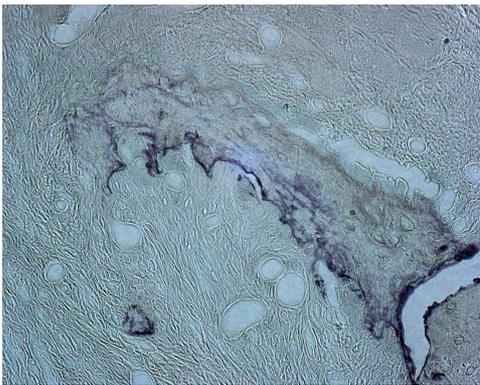
Leptin 500mg/ml をビーグル犬に作成した実験的3壁性骨欠損に投与したところコントロール群に比べて若干歯周組織の再生は認められたが、統計学的に有意差の認められる歯周組織再生は認められなかった。leptin の濃度の問題および生体における leptin の分解等が考えられる。しかし間葉系幹細胞を実験的3壁性骨欠損に投与し、歯周組織再生過程における leptin の発現動態を免疫組織化学的に調べた結果、leptin は歯槽骨再生初期過程における骨芽細胞およびその周辺の間葉系幹細胞が分化したと考えられる細胞に強く発現していることが示された。(図1~6)



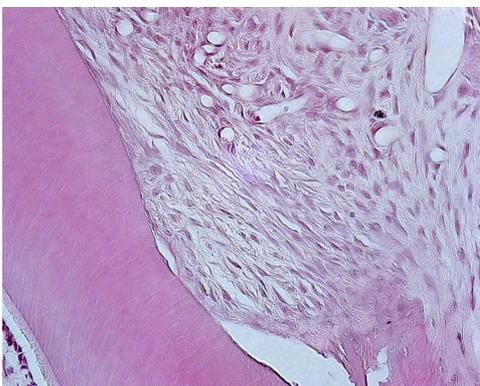
(図1) 歯槽骨再生部付近の HE 染色像



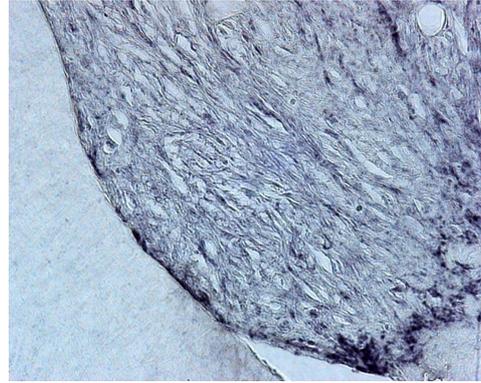
(図 2) 歯槽骨再生部付近の leptin 免疫染色像



(図 3) 歯槽骨再生部付近の osteopontin 免疫染色像



(図 4) 裸出象牙質付近の HE 染色像



(図 5) 裸出象牙質付近の leptin 免疫染色像



(図 6) 裸出象牙質付近の osteopontin 免疫染色像

また、骨分化能を有すると考えられているヒト歯周靭帯線維芽細胞の培養上清をヒト間葉系幹細胞に 8 日間作用させると leptin の mRNA 発現が約 8 倍上昇することがマイクロアレイ解析および real time PCR 解析によって示された。(20000 の探索遺伝子群の中で最も発現が増加した。)

同様にマイクロアレイ解析によって leptin 500 ng/ml をヒト間葉系幹細胞に作用させると Smad Ubiquitin Regulatory Factor 1 (Smurf 1) の発現が約 10 分の 1 と有意に低下することが明らかとなった。(20000 の探索遺伝子群の中で最も発現が減少した。) Smurf1 は Bone Morphogenetic Protein のシグナルを抑制することから、レプチンに

よって Smurf1 の発現が低下することが、ヒト間葉系幹細胞におけるレプチンの骨文化促進の一端をになっている可能性がある。

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 1 件)

① N.Mizuno, Y,Ozeki, H,Shiba et al. Humoral factors released from human periodontal ligament cells influence calcification and proliferation in human bone marrow mesenchymal stem cells. Journal of periodontology. 査読有 79(12): 2008 : 2361-2370

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 智仁 (MIZUNO NORIYOSHI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 60325181

(2)研究分担者

(3)連携研究者