

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19069

研究課題名（和文）FGF受容体シグナル阻害を用いたインプラント周囲炎骨欠損に対する骨再生療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of bone regeneration therapy for peri-implant inflammation bone defects using FGF receptor signal inhibition

研究代表者

横井 美有希（Yokoi, Miyuki）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：90826869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、インプラント周囲炎により生じた骨欠損に対して、局所的なシグナル阻害により骨再生を促進する組織再生療法を開発することを目的とした。これまで遺伝子組み換えマウスを用いて線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）2の阻害により上皮組織形成が抑制され、間葉系細胞の増殖が促進させることを報告した。本研究では、マウス大腿骨から採取し継代培養した間葉系幹細胞（P4-6）を用いて、投与の有無や投与時期などFGFR阻害剤投与の効果を検討した。結果として、FGFR阻害の投与により石灰化を促進し、投与時期により石灰化に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでの動物実験で明らかとなった線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）阻害が組織に与える影響のメカニズムを解析するために行われた。細胞実験では、FGFR阻害剤を投与することで骨増殖を促進させることを明らかとし、また投与時期により骨増殖促進効果に影響を与えることを明らかとした。以上の結果は、インプラント周囲炎などにより局所的な骨欠損を生じた場合に対する治療法確立の一端となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a tissue regeneration therapy that promotes bone regeneration through local signal inhibition for bone defects caused by peri-implantitis. We have previously reported that inhibition of fibroblast growth factor receptor (FGFR)2 suppresses epithelial tissue formation and promotes mesenchymal cell proliferation using genetically engineered mice. In this study, we investigated the effects of FGFR inhibitor administration, including whether and when to administer it, using mesenchymal stem cells (P4-6) that were collected from mouse femurs and subcultured. The results revealed that administration of FGFR inhibition promotes calcification, and that the timing of administration affects calcification.

研究分野：補綴学

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体 FGFR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎は、オッセオインテグレーション(骨結合)されたインプラントを取り巻く周囲組織に影響を与え、支持骨の喪失をもたらす慢性炎症である。現在のインプラント周囲炎に対する現在の治療法は、超音波スケーラーやキュレットによる機械的感染源の除去、殺菌剤(クロルヘキシジン)による洗浄/局所的・全身的抗菌薬の投与による消炎処置が主である¹⁾。しかしながら、炎症抑制後、喪失した骨欠損はほとんど回復しないため、歯肉退縮が起こりインプラント体の露出による審美性の低下や再感染のリスクが残存する。歯周病で喪失した骨に対しては、線維芽細胞増殖因子(FGF)治療薬であるリグロス[®]が2016年12月に保険収載されるなど、成長因子を用いた組織再生療法が多く用いられている²⁾が、インプラント周囲炎の骨欠損に対する治療法に関する報告は少ない。

申請者はこれまで、FGFR2シグナルが間葉系幹細胞(歯髄幹細胞)におけるFGFR2シグナルの阻害は、歯髄幹細胞の骨分化マーカーRunx2を促進させることを見出した³⁾。さらにFGFは他の成長因子やサイトカインと相互に作用し、発現時期により抑制的/促進的と反対の作用を示すことが明らかとなっている⁴⁾。

以上のことから、FGFR2シグナルを阻害することで、骨再生に関与する成長因子およびサイトカインの作用を増強し、インプラント周囲炎骨欠損に対する有用な骨再生治療が確立できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、局所的なシグナル阻害により骨再生を促進する組織再生療法の開発を目指している。再生医療分野において組織再生は、細胞成長因子担体(足場)の3要素が必要である⁵⁾。これまでの歯科分野における再生療法は、骨補填材料や成長因子/サイトカインなどの添加が主なアプローチであった。しかしながら、これらの材料を添加しても生体内で抑制的に働くシグナルがあった場合、これらの材料の効果は十分には発揮されないため、生体内で抑制的に働くシグナルを分子生物学的に解明し、その抑制的に働くシグナルを阻害することで、骨再生を促進することが期待できる。

本研究では、FGFR2シグナル阻害による間葉系幹細胞および骨芽細胞に対して及ぼす影響を分子生物学的に解明し、FGFRシグナル阻害を用いたインプラント周囲炎骨欠損に対する骨再生療法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス大腿骨から間葉系幹細胞の採取

動物: マウス(C57BL/6J) 12-24週齢 12匹

細胞: 大腿骨から細胞を採取し、継代培養して実験に使用

培地: MEM + 10%FBS

評価: 継代培養した細胞に対して骨および脂肪分化誘導培地を用いて培養、Alizarin Red S染色およびOil Red O染色を行い、多分化能を評価した。

(2) FGFR阻害剤の添加時期による骨分化能の変化

阻害剤: FGFR阻害薬(AZD4547, abcam) 100nM/Lで添加

細胞: 6wellプレートに(1)で継代した細胞(P4, 1.0×10^4 cells/well)を播種し、骨分化誘導培地を用いて2weeks培養後に評価を行った。

条件: FGFR阻害剤なし(Control群)

Day0-Day14 FGFR阻害剤添加(F0-14群)

Day0-Day7 FGFR阻害剤添加、Day7-Day14 FGFR阻害剤なし(F0-7群)

Day0-Day7 FGFR阻害剤なし、Day7-Day14 FGFR阻害剤添加(F7-14群)

評価: Alizarin Red S染色

(3) FGFR阻害が骨芽細胞に与える影響

阻害剤: FGFR阻害薬(AZD4547, abcam) 100nM/Lで添加

細胞: 96wellプレートに(1)で継代した細胞(P4, 1.0×10^3 cells/well)を播種し、骨分化誘導培地(FGFR阻害剤添加有/無)を用いて7days培養後に測定を行った。

評価: TRACP & ALP Assay Kit (Takara) を使用してアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。

測定: 吸光度測定(405nm)

(4) FGFR阻害剤の添加が破骨細胞に与える影響

阻害剤: FGFR阻害薬(AZD4547, abcam) 100nM/Lで添加

細胞: 96wellプレートに(1)で継代した細胞(P4, 1.0×10^3 cells/well)を播種し、標準培地(FGFR阻害剤添加有/無)を用いて7days培養後に評価を行った。

評価: TRACP & ALP Assay Kit (Takara) を使用して酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRACP)活性を測定した。

測定：吸光度測定（405nm）

(5) 統計解析

(3)と(4)で得られたデータは Mann Whittney 検定を用いて統計解析を行った($p < 0.05$)。

4. 研究成果

(1) 多分化能の評価

マウス骨髄から採取した細胞を骨分化誘導培地で培養後に Alizarin Red S 染色を行い、染色されることを確認した。脂肪分化誘導培地を用いて培養後に Oil Red O 染色を行い、脂肪滴が形成されていることを確認した。

以上のことから、多分化能を確認し、採取した細胞が間葉系幹細胞であることを確認した。

(2) FGFR 阻害剤の添加時期による骨分化能の変化

骨分化誘導培地により間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化したことを確認するために、金属基に結合する赤色素である Alizarin Red S 染色を用いて細胞の石灰化度を評価した。

結果は、FGFR 阻害剤を添加していない Control 群よりも、分化誘導時に FGFR 阻害剤を添加した F0-14 群において石灰化度が高くなることが明らかとなった。また、FGFR 阻害剤の添加時期を変えた F0-7 群と F7-14 群を比較したところ、分化誘導開始時から添加した細胞において石灰化度が高い値となる事が明らかとなった。F7-14 群の石灰化度は FGFR 阻害剤を添加していない Control 群と同等の石灰化度を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、骨分化誘導時の FGFR 阻害は細胞の分化誘導を促進するが、骨芽細胞の分化後に FGFR 阻害を行っても石灰化度に影響を与えない可能性が示唆された。

(3) FGFR 阻害による骨芽細胞への影響

骨分化誘導時に FGFR 阻害を行った結果、Control と比較して ALP 活性に有意な差は認められなかった ($p = 0.49$) もの、骨分化誘導時の FGFR 阻害 (Anti-FGFR 群) により、ALP 産生が増加する傾向が見られた (図 1)。

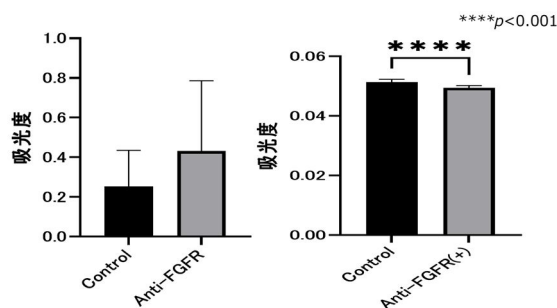


図 1 : ALP 活性

(4) FGFR 阻害が破骨細胞に与える影響

標準培地で培養した間葉系幹細胞の FGFR 阻害を行い、TRACP 活性について調べた結果、FGFR 阻害を行った (Anti-FGFR 群) において有意に TRACP 活性が抑制されることが明らかとなった ($p < 0.001$ 、図 2)。

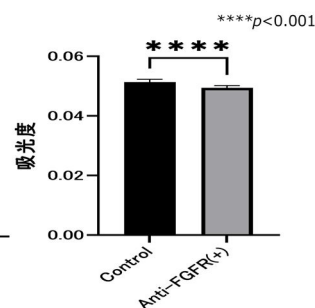


図 2 : TRACP 活性

(5) まとめ

上記(2)、(3)の実験結果から、FGFR 阻害は骨分化を促進するものの、骨芽細胞の石灰化の促進には影響を与えない可能性が示唆された。また、(4)の間葉系幹細胞の FGFR 阻害により TRACP 活性が抑制された結果から、FGFR 阻害により破骨細胞の活性が抑制される可能性が示唆された。現在、医学分野では分子標的薬やシグナル阻害剤が治療に利用されており、特に FGFR 阻害薬は子宮体癌や胆管癌に有用とされている。インプラント周囲炎などの炎症により生じた骨欠損部分に局所的に使用することで骨造成を促進することが可能であると考えられる。

<引用文献>

- 1) 口腔インプラント治療指針 2016, 公益社団法人日本口腔インプラント学会編.
- 2) Kitamura M, Akamatsu M et al., Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intrabony Defects. J Bone Miner Res. 2016, Apr;31(4):806-14.
- 3) Yokoi M, Kuremoto K et al., Effect of attenuation of fibroblast growth factor receptor 2b signaling on odontoblast differentiation and dentin formation. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 2019; 2: 211-219.
- 4) Mansukhani A, Bellosta P et al., Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. J Cell Biol, 2000, Jun 12;149(6):1297-308.
- 5) Lenza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering (3rd edition), ed by Lenza R, Langer R, Vacanti J. Academic press, Waltham, 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------