

平成24年 5月13日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390527  
 研究課題名（和文） デュアルデリバリーシステムによる新規歯周組織再生医療の創生  
 研究課題名（英文） Creation of the new periodontal tissue engineering by dual delivery system  
 研究代表者  
 島内 英俊（HIDETOSHI SHIMAUCHI）  
 東北大学・大学院歯学研究科・教授  
 研究者番号：70187425

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、効率的かつ一般医療に普及可能な新規歯周組織再生医療の開発であり、その結果新規スキャフォールドの応用と細胞外微小環境のイオン制御により、各種細胞成長因子の発現と歯周組織細胞を含む硬組織形成細胞の分化・増殖応答の亢進が誘導されることが明らかとなった。本研究の成果は、細胞治療を応用しなくとも、スキャフォールドのトポグラフィーとイオン徐放性を工夫した上でサイトカイン投与を行うことで、高率に歯周組織再生が行える治療法が開発できる可能性を示すものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop the new concept of periodontal tissue regeneration which has a high-efficiency and is propagable to general dentistry. It was revealed that an application of newly-developed scaffold induced the proliferation and control of extracellular inorganic ion concentration induced the expression of a variety of cell growth factors, resulting in the enhanced proliferation and differentiation of periodontal component cells, as well as other hard tissue forming cells. Our study strongly suggested a possibility for the development of periodontal tissue engineering by applying controlled release of inorganic ions and surface topography of scaffold combined with cytokines, without using cell therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：歯科・歯周治療系歯学

キーワード：歯周組織再生、スキャフォールド、サイトカイン、細胞外微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における歯周病の罹患率は、平成17年の厚生労働省歯科疾患実態調査でも中年

以降の成人の約70%を超え、歯牙喪失の最大の原因となっている。しかし進行した歯周炎に対する治療効果は症状安定にとどまり、破

壊された歯周組織を完全に元の健康な状態に回復するものではないため非常に再発率が高い。これを打破すべく歯周組織再生療法が導入されているが、効果はいまだ限定的で完全に歯周炎再発を阻止する手段になり得ていなかった。この理由としては再生医療の3大要素である①再生を担う細胞供給、②サイトカイン、③スキヤフォールドに関する技術が完成をみていないことが上げられる。そのうちサイトカインについては血小板由来成長因子 (PDGF) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) については実用化がほぼなされたが、硬・軟両組織の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ヤフォールドについては模索が続いている状況である。一方、細胞治療についてはiPS細胞や組織幹細胞の研究が行われ、一定の成果が得られているが、そのコストや実施場所の制限から、広く臨床の場に普及する医療とはなり得ないと考えられる。本研究はこの制限を打破するために、サイトカインが作用する細胞外環境とスキヤフォールドを歯周組織再生に最適化することで、その効率を最大限に引き上げる医療の開発を目指したものである。

## 2. 研究の目的

本研究においては、①硬組織形成に重要とされる細胞外Ca濃度が歯周組織由来細胞の増殖・分化に及ぼす影響とそのメカニズムの解析、②歯周組織細胞の増殖・分化を誘導できる機能性スキヤフォールドの開発を目指すこととし、これらのコンビネーションによる新規再生用デバイスを応用した歯周組織再生療法実用化の基盤を作ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 無機イオン濃度制御による細胞外微小環境の変化が歯周組織由来硬組織形成細胞の増殖・分化に及ぼす影響の検討

骨代謝の活発化によってCa<sup>2+</sup>やPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>などの無機イオン濃度が上昇し、それが骨芽細胞の増殖・分化に影響を与えると考えられている。そこで、これら無機イオン濃度の上昇が歯根膜 (PDL) 細胞やセメント芽細胞 (本研究では不死化細胞ライン OCCM30 を用いた) の増殖・分化に及ぼす影響を与えるのか、特に細胞増殖因子の発現とCa感受性レセプター (CaSR) を中心としたシグナリング機構に着目して *in vitro* での解析を行った。

(2) Octacalcium phosphate (OCP) の骨形成誘導能の最適化に関する検討

OCPは生体内分解性のリン酸カルシウム化合物であり、高い骨形成誘導能を有することが知られている。またOCPから骨を構成する

ハイドロキシアパタイト (HA) への転換に当たっては、Ca<sup>2+</sup>やPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>の無機イオンを放出する。そのためOCPは本計画の目的である細胞成長因子と無機イオンのデュアルデリバリーを達成するのに最適のスキヤフォールドであると期待される。本研究ではOCPのスキヤフォールドとしての能力を最大限に誘導することを目的として、気孔率に着目して粒子径の異なるOCPを合成して①*in vitro*における骨芽細胞並びに破骨細胞の誘導、②*in vivo*での骨形成誘導能を検討した。

(3) 細胞賦活化作用を有する新規機能性スキヤフォールドの開発

スキヤフォールドによる細胞賦活化のメカニズムとしてその表面トポグラフィーの応用が上げられる。その作用を有しつつ、かつマルチレイヤーの細胞シートを作ることのできる新規歯周組織再生用スキヤフォールドとしてのハニカムフルムの可能性を検証した。PDL細胞を孔径の異なるハニカム (poly ε-caprolactone; PCL 製) 上で培養し、細胞増殖応答や細胞骨格に与える影響について検討を行った。

(4) ラット規格化骨欠損系の作製と定量性の検証

本計画で開発する新規歯周組織再生デバイスの歯槽骨再生に及ぼす効果を検証するためには動物実験モデルが不可欠である。一般にはイスが用いられるが、費用などの観点で問題がある。ラット歯槽骨に規格化した骨欠損を作製し、新規デバイスの骨修復能を検証できる系の開発を行った。結紮を用いた実験歯周炎モデルでは骨欠損の形態をコントロールできないため、顎骨に骨欠損の形成を外科的に行い自己修復できないサイズを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 無機イオン濃度制御による細胞外微小環境の変化が歯周組織由来硬組織形成細胞の増殖・分化に及ぼす影響

不死化マウスセメント芽細胞 OCCM30 培養系の培地中のCa濃度を増加させたところ、添加後6時間をピークにして濃度依存的にFGF-2 mRNAの発現が増強した。

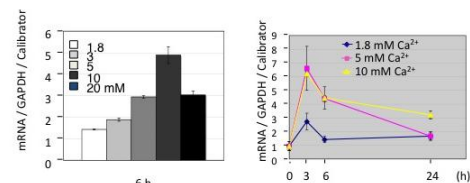


図1 細胞外Ca濃度の増加によるOCCM30のFGF-2 mRNA発現増強

ついでこの作用がどのような受容体を介しているかを調べるために各種CaSRアゴニ

ストを用いて調べたところ Gadlinium で同様の FGF-2 発現がみられ、Caionophore では誘導されないことから Ca チャネルではなく、CasR を介したものであることが示された。また Ca 濃度の上昇に伴い ERK1/2 のリン酸化を生じ、PKA 阻害剤と adenylate cyclase 阻害剤で阻害されることから PKA/cAMP 依存性の反応であることが明らかとなった。

一方同様に PDL 細胞培養系で細胞外 Ca 濃度を増加させると、BMP-2 発現の増強が誘導されることが明らかとなった。

PDL 細胞には CaSR を含む各種 7 回膜貫通型 G タンパク共役型レセプター (GPCR) が発現

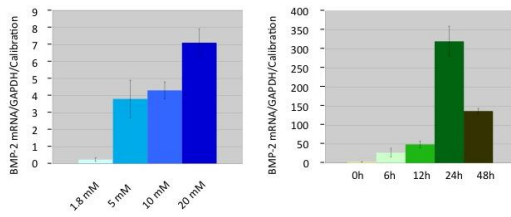


図2 細胞外Ca濃度の増加によるPDL細胞のBMP-2 mRNA発現増強

しており、OCCM30 の場合と同様にこれらが Ca 濃度の変化を感知していると考えられた。硬組織形成誘導作用を有する歯髓細胞で細胞外 Ca 濃度を上昇させると PDL 細胞同様に BMP-2 mRNA 発現を増強させるという結果が得られたが、これを詳細に解析すると Ca チャネルを介した Ca イオンの流入によるものであるが、OCCM30 の場合と同じく ERK1/2 がシグナル伝達に関与していることが示された。その一方で同じ細胞を用いてリン酸イオン濃度を上昇させると、Ca イオン同様に BMP-2 発現を増強させることが明らかとなった。この反応においては cAMP/PKA および ERK1/2 経路がシグナル伝達に関わっていた。PDL 細胞でも同じように PO4<sup>2-</sup>イオンの増加で BMP-2 発現が増強されることが明らかとなった。

骨芽細胞においてその分化を誘導するといわれている糖タンパクである Wnt の作用を OCCM30 で調べた。その結果、Wnt3a で OCCM30 を刺激すると、増殖応答が誘導されるのに対し、分化マーカーである OCN および RunX の発現が抑制されることから、骨芽細胞とは逆の方向の制御メカニズムが働いていることが明らかとなった。

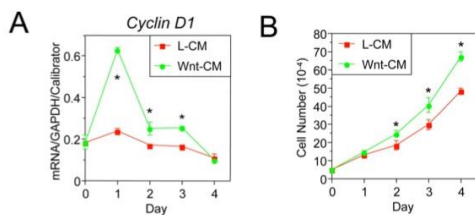


図3 Wnt刺激はOCCM30の増殖応答を誘導する

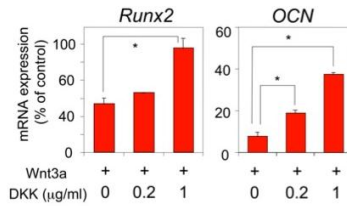


図4 Wnt刺激はRunx2とOCN発現を抑制することから、OCCM30の硬組織形成細胞への分化を阻害する

以上得られた結果をまとめると、PDL 細胞やセメント芽細胞などの再生に関わる歯周組織構成細胞には Ca<sup>2+</sup>や PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>などの細胞外無機イオン濃度を感知するメカニズムが備わっており、種々の成長因子発現を誘導して細胞の増殖や分化を制御できることが明らかとなった。興味深い知見として、同じ口腔由来細胞で硬組織形成に関わるとはいえ、細胞外無機イオンに対する応答やその感知機構は細胞間で多様性があることが示唆された。

## (2) Octacalcium phosphate (OCP) の骨形成誘導能の最適化

歯周組織再生のためのスキャフォールドとして OCP を最適化するために、気孔率の違いが骨形成誘導に与える影響を in vitro ならびに in vivo で検討した。そのため粒子径が異なる 3 種の OCP ; s-OCP (53-300 μm), i-OCP (300-500), L-OCP (500-1000) を合成した。Pi イオン濃度を基に各 OCP の溶解率を調べたところ s-OCP>i-OCP>L-OCP の順で高くなるのに対し、気孔率は逆の順に高かった。In vivo において 3 種の OCP の骨形成誘導能を検討した結果、L-OCP による骨形成は埋入後 10 週目で s-OCP の 2 倍であり、気孔率が骨形成誘導に与える影響が大きいことが示された。

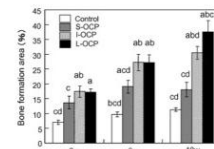


図5 粒子径の違いによるOCPのin vivoにおける骨形成誘導

## (3) 細胞賦活化作用を有する新規機能性スキャフォールドの開発

歯周組織再生では軟組織と硬組織の 3 次元配置が求められるため、新たに開発されたハニカムフィルム (HF) を用いて歯根膜細胞の 3 次元培養を行い、かつトポグラフィによって細胞の増殖・分化をコントロールすることを試みた。同フィルムはミクロンレベルの均一な小孔で構築された膜状スキャフォールドで、従来の多孔質素材より空孔率が格段に高く、細胞体が絡み易いピラー構造および内部の交通路が豊富である。



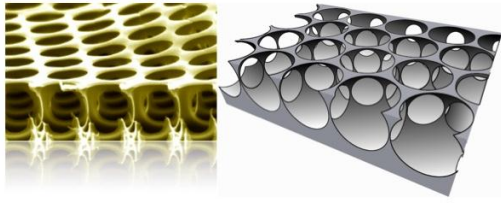


図6 ハニカムフィルムの電顕写真と構造の模式図

ポアサイズが  $5\text{--}15\ \mu\text{m}$  の HF 上で PDL 細胞の培養を行ったところ、平膜では細胞の形態が紡錘形を保ったままなのに対し、HF では多数の偽足を伸展しながら増殖した。ポアサイズが  $10\ \mu\text{m}$  の HF では CLSM による断層像観察の結果、HF 内に多数の細胞が侵入し、フィルム内部の横孔を通じて樹状に細胞体を伸展するという所見が観察された。また HF 上では PDL 細胞の多層化がみられ細胞シート状の構造を形成するとともに、平膜と比べて良好な増殖応答を示した。

#### (4) ラット規格化骨欠損系の作製と定量性の検証

規格化骨欠損の作製には 12 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いて、右側下顎第一臼歯部の近心側から頰側に渡る歯槽骨を規格化して除去し、遠心根と頰側中央根の頰側歯根

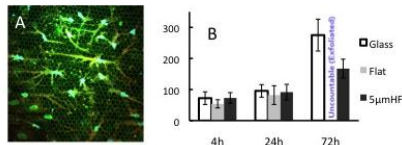


図7 HF内に侵入したPDL細胞 (A)およびHF上でのPDL細胞の増殖 (B)

面、近心根の頰側および近心歯根面を根尖まで露出させた。マイクロ CT による検討で、修復骨量は経時的に増大したが、術後 1 2 週以降では変化しなかった。ISH では、術後 3 週で欠損部周囲の骨芽細胞と骨細胞は type I collagen および osteocalcin を発現していたが、術後 1 2 週以降、これらの骨基質タンパクの発現は著しく低下した。以上の結果から、本研究で開発する新規再生システムによる歯周組織再生効果の定量的検証が可能実験系が開発された。

#### 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 7 件)

- ① Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein

kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. Bone. 2011 Mar 23. [印刷中 ; 電子出版済]. (査読有)

- ② Kanaya S, Nemoto E, Ebe Y, Somerman MJ, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 gene and protein expression levels via a cAMP/PKA dependent pathway in cementoblasts. Bone. 2010; 47(3): 564-572. (査読有)
- ③ Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. Biochem Biophys Res Commun. 2010;394(4):1093-1097. (査読有)
- ④ Murakami Y, Jonda Y, Anada T, Shimauchi H, Suzuki O. Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes. Acta Biomaterialia. 2010; 6: 1542-1548. (査読有)
- ⑤ Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. Bone. 2009; 44(5):805-812.
- ⑥ Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y. Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electronmicroscopy. J Electron Microsc (Tokyo). 2009; 58(6):363-373. (査読有)
- ⑦ T Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. Oral Dis. 2009; 15(4):273-280. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Iwama N, Ishihata H, Kawano T, Shimauchi H, Shimomura M. Preparation and Biomedical application of self-organized honeycomb-patterned polymer films. The 4<sup>th</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, March 8, 2011, 仙台, 宮城.
- ② Nemoto E, Tada T, Shimauchi H. Extracellular phosphate increases bone

morphogenic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. The 4<sup>th</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, March 8, 2011, 仙台, 宮城.

- ③ Iwama N, Ishihata H, Shimauchi H, Shimomura M. Behavior of Human Periodontal Ligament Cells Cultured on Micro-arrayed Honeycomb-Patterned Film. Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology Joint Conference with RIKEN-Asian Research Network Symposium. November 1, 2010, 東京, 日本.
- ④ 石幡浩志, 岩間張良, 下西 充, 下村政嗣, 島内英俊. マイクロプレジジョンハニカムスキャフォールドにより生成される歯根膜培養細胞グラフトを用いた歯周組織再生. 日本機械学会 2010 年度年次大会, 平成 22 年 9 月 6 日, 名古屋市, 愛知.
- ⑤ Iwama N, Ishihata H, Ara M, Shimonishi M, Shimomura M, Shimauchi H. Microtopographic Effect of Honeycomb Film on the Periodontal Ligament Cells. IADR General Session, July 16, 2010, Barcelona, Spain.
- ⑥ 金谷 聡介, 根本 英二, 後藤 和宏, 島内 英俊. セメント芽細胞におけるプロテインキナーゼ C 依存性 Fibroblast Growth Factor-2 発現増強作用. 日本歯科保存学会平成 22 年度春季学術大会 (第 132 回), 平成 22 年 6 月 4 日, 熊本市, 熊本.
- ⑦ Shimauchi H, Tanaka M, Iwama N, Ishihata H, Ara M, Murakami Y, Nemoto E, Shimomura M. Proliferations of periodontal membrane cells on the unified topographic pattern of the honeycomb pored scaffold. The 92<sup>nd</sup> AAP Annual Meeting, September 15, 2009, Boston, USA.
- ⑧ 江部 由佳梨, 根本 英二, 金谷 聡介, 多田 浩之, 島内 英俊. Non-Canonical WNTシグナルが骨芽細胞の分化に与える影響について. 第52回春季日本歯周病学会学術大会, 平成21年5月14日, 盛岡市, 岩手.
- ⑨ 金谷 聡介, 根本 英二, 江部 由佳梨, 島内 英俊. セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は cAMP/PKA 依存性に Fibroblast growth factor 2 の発現を誘導する. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成 21 年 5 月 14 日, 盛岡市, 岩手.
- ⑩ 岩間 張良, 田中 賢, 石幡 浩志, 荒 雅浩, 下西 充, 長峰 勝, 村上宜央, 金谷 聡介, 根本 英二, 下村 政嗣, 島内 英俊. 細胞外マトリクス様ハニカムフィルム上におけるヒト歯根膜由来線維芽細胞の接着挙動

に関する研究, 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会, 平成 20 年 10 月 19 日, 四日市, 三重.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等 : なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島内 英俊 (HIDETOSHI SHIMAUCHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号 : 7 0 1 8 7 4 2 5

### (2) 研究分担者

根本 英二 (EIJI NEMOTO)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号 : 4 0 2 9 2 2 2 1  
金谷 聡介 (SOSUKE KANAYA)  
東北大学・病院・医員  
研究者番号 : 8 0 3 7 5 0 9 7  
鈴木 治 (OSAMU SUZUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号 : 6 0 3 7 4 9 4 8  
笹野 泰之 (YASUYUKI SASANO)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号 : 3 0 1 9 6 1 9 1  
鎌倉 慎司 (SHINJI KAMAKURA)  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号 : 8 0 2 2 4 6 4 0

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：