

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592442

研究課題名（和文） 新規骨形成剤ペプチドによる歯周組織再生

研究課題名（英文） Periodontal tissue regeneration by
a novel bone-forming peptide

研究代表者

田中 昭男（TANAKA AKIO）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10121823

研究成果の概要（和文）：

歯周組織の再生を目指して作製した合成のオリゴペプチドが歯周組織欠損部の修復に対して有用かどうかを検討した。その結果、欠損部の象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されていた。また、欠損部の象牙質表面から外方向性に連続性に、多量の象牙質様あるいはセメント質様硬組織の形成も認められた。以上のことから、このオリゴペプチドは歯周組織の欠損部に硬組織形成を誘導する可能性があり、歯周組織再生に有用であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether synthesized oligopeptide is useful or not for periodontal tissue regeneration. Cementum-like tissues were observed in the removed surface of dentin in the tissue defect area. Moreover, formation of dentin-like or cementum-like hard tissues was observed in the dentin surface in the defect area toward the surface epithelium. Based on these results, it is suggested that oligopeptide has a potential to induce hard tissue formation in defects of the periodontal tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：歯学、再生医学、病理学、細胞・組織、生体分子

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は歯頸部に付着したバイオフィルム中の歯周病原細菌の影響によって、歯肉に炎症が生じ、それが波及して歯根膜の破壊や歯槽骨の吸収により、歯の支持組織が失われ、歯の喪失を来す疾患であり、殆どの人が罹患している国民病である。歯周治療として

はまず、ブラッシングやスクレーピング・ルートプレーニングが行われているが、失われた歯周組織を回復するためには歯周組織再生療法が必要になる。歯周組織再生療法としてGTR (guided tissue regeneration) 法 やエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) を用いるバイオリジェネレーション法が行

われている。市販の Emdogain®はブタの歯胚から抽出した EMD を加熱処理したものであるが、種々雑多な物質が含まれている可能性があり、生物に特有の物質の存在も否定はできない。我々は旧タイプの Emdogain®の作用機序を明らかにするためにラット背部皮下に接種し、組織反応を病理組織学的に観察している際に、好酸性の円形小体の存在を見出した。その物質の性質を明らかにするためにパラフィン切片を用いてマイクロダイセクションを行い、タンパクを抽出した。このタンパク質について matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) の結果、分子量約 1010 の箇所には複数のフラグメントを得た。その中のアミノ酸シーケンスの最長は 192 であった。複数のフラグメントの中に同じ 7 種のアミノ酸である WYQNMIR を含んでいた。このアミノ酸のシーケンスをデータベース解析したところ、ブタのアメロジェニン前駆物質と同一であった。これを基にペプチド（アミノ酸が 10 個以内であるのでオリゴペプチドになる）を合成し、ラット背部組織に注入し硬組織の形成を確認した（特願 2007-235789）。

2. 研究の目的

このオリゴペプチドに硬組織形成能が存在することが明らかになったので、この物質が歯周組織再生に有用であるかどうかを検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

7 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの upper 第一臼歯部の口蓋側の歯周組織に全層弁を形成して、ラウンドバーを用いて歯頸部に人工的欠損部を作製した。その部位にオリゴペプチド (WYQNMIR) を 1.5%プロピレングリコールアルジネート (PGA) 水溶液に 15 mg/mL の濃度になるように溶解した水溶液を 0.3 mL 貼布した。その後、全層弁を復位して 1 糸縫合し、術後 7 および 14 日にイソフルランによる吸入麻酔後、ペントバルビタールの腹腔内過剰投与によって安楽死させ、10%中性緩衝ホルマリン液で灌流固定し、上顎骨を切除し、同固定液でさらに 1 日間浸漬固定した。次いで 10%EDTA 水溶液で 4℃、2 週間、脱灰し、エタノールで脱水し、Hemo-De で透徹して、パラフィン包埋して、厚さ 4μm のパラフィン切片を作製し、スライドガラスに貼布して、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、Toluidine Blue (TB) 染色、PAS 染色、Masson Trichrome (MT) 染色をそれぞれ行った。また、電顕的には pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝 2%グル

タルアルデヒド・4%パラフォルムアルデヒド混液で 4℃、1 日前固定し、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄後、pH 7.2 の 0.1 M リン酸緩衝液で調整した 1%オスミウム酸で後固定し、アルコール脱水、プロピレンオキシドに浸漬してエポン 812 に包埋した。次いで超薄切片を作製した。歯周組織の変化を光顕的および一部、超薄切片を作製して酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施し、電顕的に観察した。対照として合成ペプチドを含まない 1.5% PGA 水溶液 0.3 mL を用いた。

4. 研究成果

術後 7 日には欠損部付近のセメント質および歯根膜から線維性結合組織が上皮方向に向かって増生していた (図 1、2)。また、露出象牙質面には破歯細胞が存在し、象牙質を吸収している像が観察された。欠損部歯槽頂には立方形の細胞で縁どられた、不定型の骨様組織の小塊もみられた。また、電顕的に硬組織に接して細胞内小器官の比較的多い細胞も認められた (図 3、4)。術後 14 日には、欠損部の象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されていた (図 5、6)。他の例では、欠損部の象牙質表面から外方向性に連続性に、象牙質様あるいはセメント質様硬組織の形成が認められた (図 7)。術後 14 日の硬組織の認められない例では、対照群と同じ組織像を示した。以上のことから、合成したオリゴペプチドは歯周組織の欠損部に硬組織形成を誘導する可能性があることが示唆される。

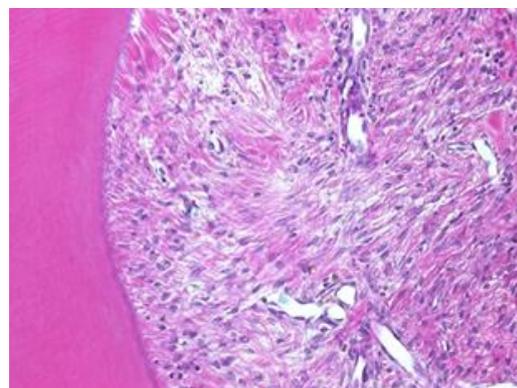


図 1 術後 7 日の病理組織像。露出象牙質から表層の上皮に向かって線維性結合組織がみられる (HE 染色)。

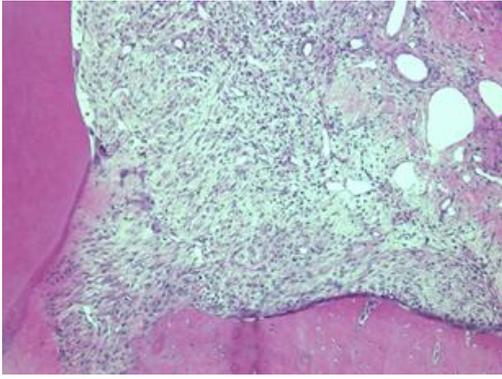


図2 術後7日の病理組織像。欠損部には幼弱な結合組織および形成された少量の硬組織がみられる（HE染色）。

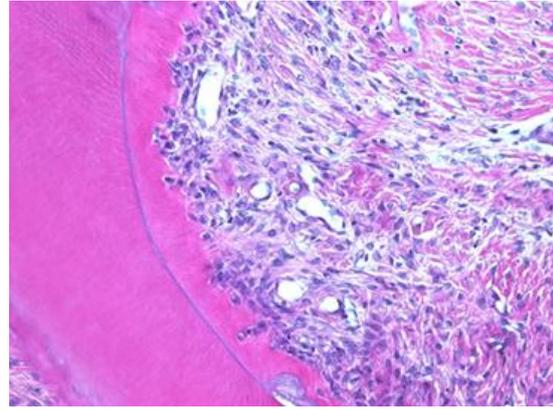


図5 術後14日の病理組織像。削除された象牙質表面に新生セメント質が形成されている（HE染色）。

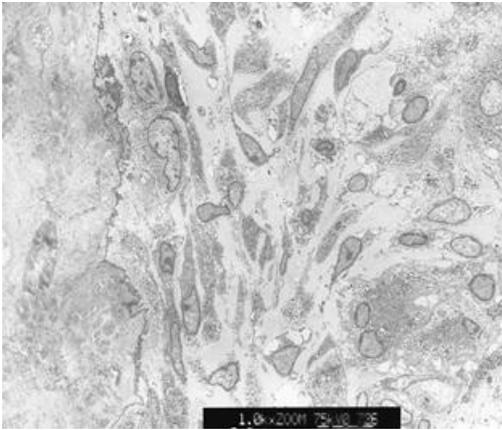


図3 術後7日の透過型電子顕微鏡像。左1/3にみられる歯の硬組織の表面にはセメント芽細胞様細胞がみられる（Original Mag. X2,000）。

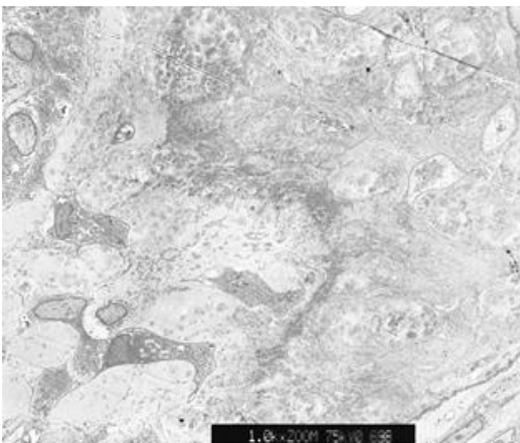


図4 術後7日の透過型電子顕微鏡像。右半側に認められる歯槽骨付近に rER の豊富な細胞みられる（Original Mag. X2,000）。

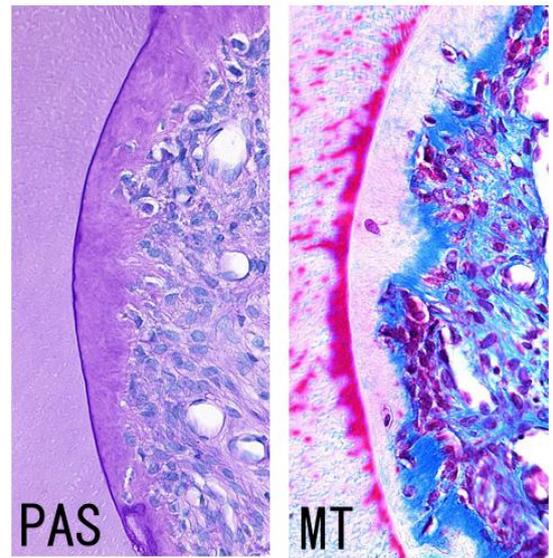
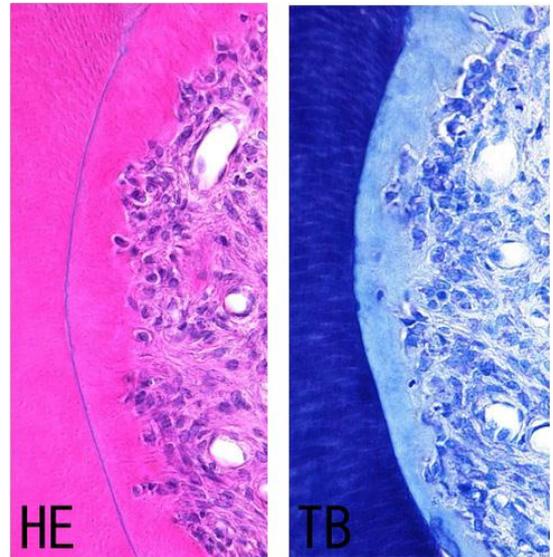


図6 図5の拡大像（HE染色、Toluidine Blue (TB) 染色、PAS 染色、Masson Trichrome (MT) 染色）。

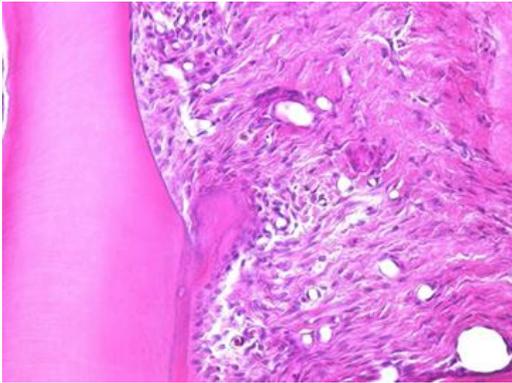


図7 術後14日の病理組織像。削除された象牙質とセメント質の境界からセメント質様硬組織の形成が認められる（HE染色）。

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)

[学会発表] (計3件)

①富永和也、国分麻佑、岡村友玄、益野一哉、和唐雅博、西川哲成、田中昭男、エナメルマトリックスデリバティブ (EMD) に対する組織反応の免疫組織化学的研究、日本歯周病学会第4回近畿地区臨床研修会、2010年12月5日、大津市

②Noguchi M、Tominaga K、Tanaka A、Ueda M、Effect of oligopeptide in rat periodontal tissue defects、88th General Session & Exhibition of the IADR、2010年7月14日、Barcelona、Spain

③野口三智子、富永和也、田中昭男、上田雅俊、合成ペプチドによるラット歯周組織における硬組織形成、第53回春季歯周病学会、2010年5月14日、盛岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 昭男 (TANAKA AKIO)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：10121823

(2) 研究分担者

富永 和也 (TOMINAGA KAZUYA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：80278572