

平成22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791455

研究課題名 (和文) 徐放キャリアとしての高分子多糖の有用性

研究課題名 (英文) Efficacy of polysaccharide polymers as sustained-release carrier

研究代表者

川本章代 (KAWAMOTO AKIYO)

大阪歯科大学・歯学科・助教

研究者番号：50368156

研究成果の概要 (和文)：歯周組織の新生・再生のために高分子多糖を徐放キャリアとして使用可能かどうか *in vitro* にて検索を行った。細胞の活性と接着、増殖には CD44 の関連が考えられるが、細胞の遊走には CD44 を介さずに HA が関与しているものと思われる。HA 溶液へのキャリアとして成長因子の混合は可能と考えるが、少しずつ長期間に渡って放出する徐放に関しては、粘稠性のある HA 溶液である程度は期待できるが、現在も検討を重ねているところである。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this study was to examine the efficacy of polysaccharide polymers as a sustained-release carrier for recovery and regeneration of periodontal tissue *in vitro*. Osteoblast-like cells were cultured with hyaluronan for examining the osteoblast activity, cell attachment, proliferation and migration with or without anti-CD44mAb. Effect of HA on osteoblast activity, cell attachment and proliferation was related to CD44 but cell migration was not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般

1. 研究開始当初の背景

高分子多糖とくにヒアルロン酸の生物学的特性は多岐にわたり、既に他の細胞での効果が認められ、整形外科分野などでは臨床応用されている。しかし、歯周組織新生・再生を

念頭においた骨芽細胞ならびに線維芽細胞に対するこれらの応用については報告がない。再生を期待する部位への徐放キャリアとしての活用もこれから発展していく可能性が高い。また、昨今、めざましい進歩を遂げ

ている歯周組織の再生分野であるが、応用可能なのは主に健常者が多く、これを必要とする有病者ならびに多数の薬剤を服用している高齢者には適応出来ない場合もある。人工歯根植立や抜歯後の歯周組織の欠損部に対して、また頻発する口腔粘膜の義歯性潰瘍に対して、それを保護し創傷治癒へスムーズに向かわせる補助的な役割の組織誘導因子は、高齢者のQOLの向上につながる。さらに、一般歯科医師が特殊な技術なしに患者に提供できることを念頭に置き、簡便かつ侵襲の少ない方法で、しかも安全性が確立されている物質を局所に組織誘導因子をデリバリー出来ないかを考えた。

2. 研究の目的

- ・歯周組織の新生・再生に高分子多糖（ヒアルロン酸など）が有効か検索する。
- ・成長因子をデリバリーする徐放キャリアとしての高分子多糖の可能性を探る。
- ・簡便な方法で局所に作用でき、なおかつ高齢者にも適応できることを目的とする。

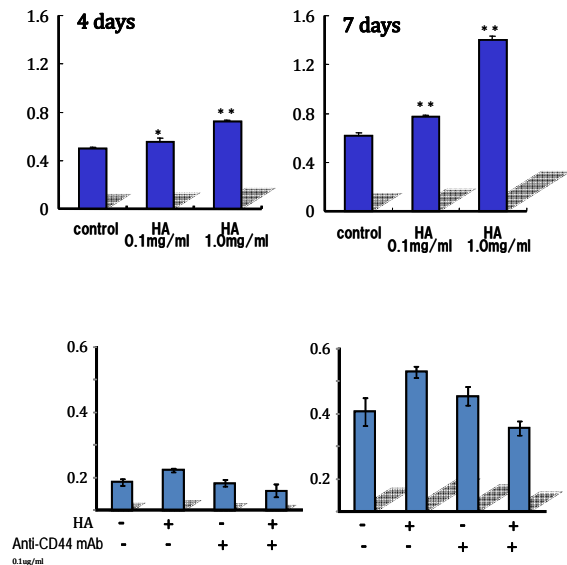
3. 研究の方法

- ・培養骨芽細胞・線維芽細胞(株細胞)に高分子多糖を作用させたときの遺伝子・タンパク発現をPCR法・ウェスタンブロッティングにて検索
- ・同じく細胞をコラーゲンゲル中にて培養し、高分子多糖を作用させた時の遺伝子発現・タンパク発現を同様に検索
- ・高分子多糖に成長因子を添加し、上記の効果が亢進されるか検討

4. 研究成果

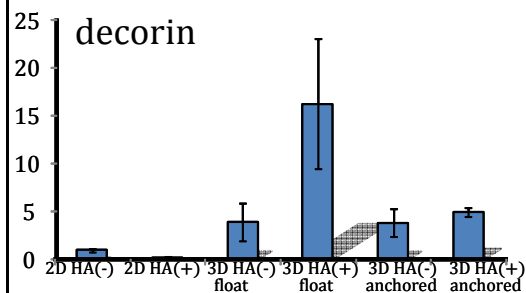
培養骨芽細胞 MC3T3-E1 を用い、ヒアルロン酸 (HA) 存在下における骨芽細胞の増殖について検索した結果、4, 7日後いずれも HA 1.0mg/mL 存在下において著明に亢進さ

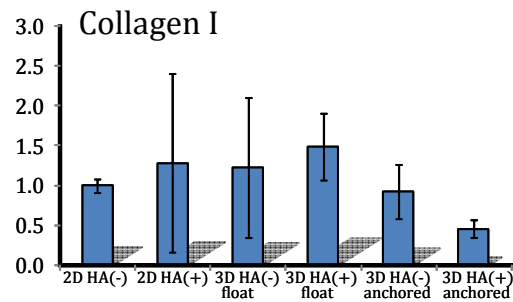
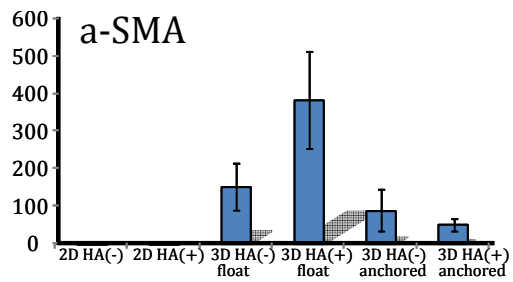
れた。また、抗 CD44 抗体にて処理した骨芽細胞を使用して同様に増殖能を検索すると、HA 存在下により亢進した増殖能は抗体の存在により抑制がみられた。



また、以前の研究において培養骨芽細胞 MC3T3-E1 を用い、ヒアルロン酸 (HA) 存在下における骨芽細胞のコラーゲンゲル収縮能を検討し、HA 1.0mg/mL 存在下において収縮が著明にみられたことを踏まえ、コラーゲンゲル培養を行い HA 存在下における骨芽細胞の mRNA を単離し、リアルタイム PCR 法にて ECM 成分の発現を確認した。コラーゲンゲル培養の際には、プレートから浮かせた浮遊ゲルと剥がさずに培養した固定ゲルとに分けて培養を行った。

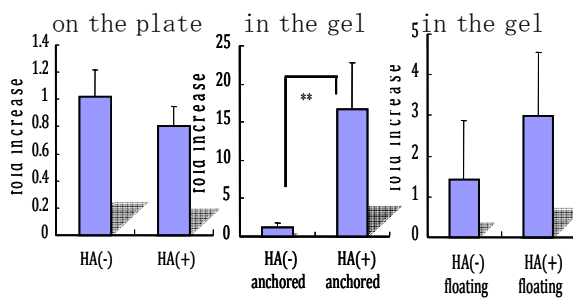
Effect of HA on mRNA expression





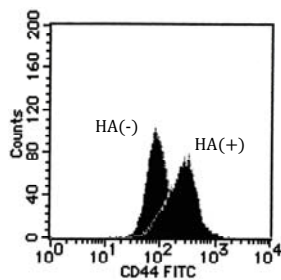
Effect of HA on expression of CD44

• Expression of mRNA

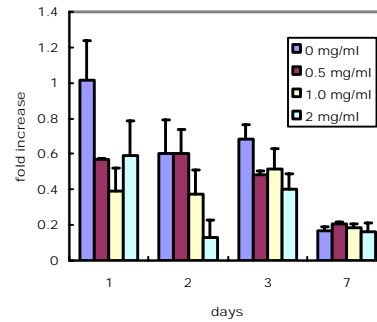
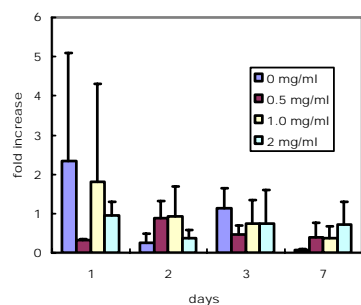


Expression of CD44 on cell surface

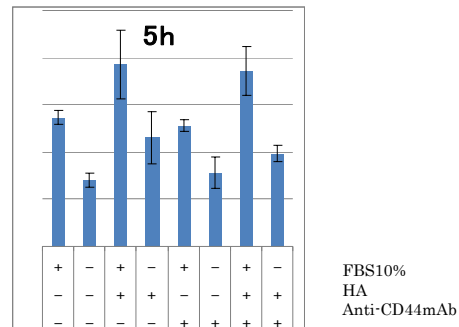
• Expression of protein



Effect of HA on expression of HAS1 and HAS2



Effect of HA on cell migration



HA 添加時における骨芽細胞の接着能について検索した結果、HA 添加群では差は認められなかったが、抗 CD44 抗体添加で接着能は低下した。また

生体と同じ3次元を in vitro にて再現したコラーゲングル培養は、創傷治癒過程における創の収縮を模倣しているとされているが、細胞を包埋したコラーゲンを HA 添加の下で培養したところ有意に収縮が見られ、抗 CD44 抗体添加時には収縮率は減少した。同条件の細胞をゲルから抽出し遺伝子解析を試みたが、細胞の回収が通法と異なるため手技の均一化を検討中である。(上記に ECM 成分の mRNA 発現の結果を示す。追実験で再現性確認中)。

細胞移動能を検討するために蛍光色素で標識した細胞をカルチャーインサート (ポアサイズ 8 ミクロン) 上層へ入れ、下層に HA 添加培地を入れ、ポアを通過した細胞の蛍光を検出した。HA 添加群はポジティブコントロールと比較して優位に移動がみられ、抗 CD44 抗体添加に

よっても変化は見られなかった。また、HA存在下における骨芽細胞分化の影響について検討するためにALP活性を行ったが、有意差は見られなかった。

創傷治癒をモデルにした場合、HAは骨芽細胞の遊走や増殖に関しては有意に亢進がみられるが、治癒過程の後期に起こる分化や石灰化などでは影響は及ぼさないことが分かった。これは、HAの性状が液状もしくは粘稠な性状のため治癒過程でアプライしても短時間しか効果を及ぼさないことが考えられることから、実際の効果の時期とも一致する。また、細胞の活性と接着、増殖にはCD44の関連が考えられるが、細胞の遊走にはCD44を介さずにHAが関与しているものと思われる。HA溶液へのキャリアとして成長因子の混合は可能と考えるが、少しずつ長期間に渡って放出する徐放に関しては、粘稠性のあるHA溶液である程度は期待できるが、現在も検討を重ねているところである。ただ、臨床におけるアプライ方法のイメージとして含嗽や貼薬など簡便な方法が当初の目的であるため、最も効果が発揮できるアプライ方法が見つかれば様々な場面に応用できると考える。

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2件)

- ① A Kamada, T Ikeo, Y Yoshikawa, E Domae, S Goda, I Tamura, H Kon-I, J Okazaki, A Kawamoto, Y Komasa, I Toda, F Suwa. Influence of adipocytokines on differentiation of pro-osteoblastic cells. J Oral Tissue Engin. 6(1) 17-23. 2008.
- ② M Nomura, A Kawamoto, Y Komasa. Effect of combined use of daidzein and raloxifene on osteoblast-like cells. J Osaka Dent Univ. 43(2) 135-141. 2009.

[学会発表] (計7件)

- ① 岡崎 定司、松村 和明、玄 丞俣、坂井 大吾、野村 昌代、川本 章代、柿本 和俊、小正 裕、ポリマーを介したハイドロキシアパタイト固定化チタンインプラントのラット下顎前歯抜歯窩への埋入、第51回日本歯科理工学会学術講演会、2008.4.27. 横浜市
- ② A Kawamoto, Y Yoshikawa, A Takeyama, Y Umeyama, N Katayama, A Kamada, J Okazaki, T Ikeo, Y Komasa. Development of the efficient turbine grip. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008.7.5. Toronto
- ③ T Ikeo, A Kamada, Y Yoshikawa, E Domae, S Goda, I Tamura, A Kawamoto, J Okazaki, Y Komasa, Y Takaishi, T Miki, T Fujita. Various roles of syndecan family in osteoblastic cells. The 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.13. Montreal
- ④ A Kamada, T Ikeo, Y Yoshikawa, E Domae, S Goda, I Tamura, A Kawamoto, J Okazaki, Y Komasa, Y Takaishi, T Miki, T Fujita. Heparan sulfate proteoglycans modulate osteogenic differentiation through heparan sulfate chains. The 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2009.9.15. Montreal
- ⑤ A Kamada, T Ikeo, Y Yoshikawa, E Domae, S Goda, I Tamura, A Kawamoto, J Okazaki, Y Komasa, I Toda, F Suwa. Adipocytokine influences differentiation of osteoblasts. The 4th Sino-Japanese Conference on Stomatology 2008. 2008.9.29. 西安
- ⑥ M Nomura, A Kawamoto, Y Komasa. Effect of daidzein together with raloxifene in osteoblast-like cells. The 56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2008.11.30. 名古屋市
- ⑦ 川本 章代、野村 昌代、吉川 美弘、鎌田 愛子、池尾 隆、岡崎 定司、浅井 加雄、小正 裕、骨粗鬆症治療薬と大豆イソフラボンの併用が骨芽細胞の分化に及ぼす影響、第118回日本補綴歯科学会学術大会、2009.6.6. 京都市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本章代 (KAWAMOTO AKIYO)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50368156

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし