

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791466
 研究課題名 (和文) 脳由来神経栄養因子と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生治療薬の開発
 研究課題名 (英文) Development of a newly medical device for periodontal tissue regeneration using brain-derived neurotrophic factor (BDNF) / hyaluronic acid complex
 研究代表者
 武田 克浩 (Katsuhiko Takeda)
 広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：10452591

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、BDNF を歯周組織再生治療に臨床応用することを目的として、安全性の高い高分子ヒアルロン酸複合体と BDNF の組み合わせが *in vivo* における歯周組織再生を促進するかどうかをビーグル犬Ⅲ級根分岐部歯周組織欠損モデルを用いて明らかにすることとした。

BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体充填群では、露出象牙質表面の大部分で新生セメント質が観察され、作成した欠損の半分程度まで歯槽骨が再生していた。本実験の結果から、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体は、歯周組織再生を促進する歯科材料となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we evaluated the efficacy of synthesized high molecular weight hyaluronic acid gel (HA) as a BDNF carrier in the class III furcation defects of beagle dogs.

In BDNF/HA groups, the denuded root surface was almost completely covered with new cementum and the periodontal ligament separated the regenerated bone from the cementum with an adequate width. The combination of BDNF and hyaluronic acid gel may have high potential for periodontal tissue regeneration in clinical usage.

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・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子の1つであるBrain-derived neurotrophic factor (BDNF) は中枢及び末梢神経系において神経細胞の発生、成熟、生存維持、分化、機能維持に重要な役割を果たしており、運動神経障害モデル、パーキンソン病モデル、アルツハイマー病モデルなど各種疾患モデルを用いた動物実験でその治療効果が検討されている。

これまで、BDNF が培養ヒト歯周靭帯由来線維芽細胞の増殖を促進し、alkaline phosphatase, osteopontin, bone morphogenetic protein-2 などの骨関連タンパク質の発現及びI型コラーゲンの産生を促進することが明らかにされている。さらにアテロコラーゲンをBDNFの担体として用いた動物実験で、歯槽骨、セメント質の再生が認められ、BDNFが歯周組織再生に有用であることが示された。本研究は、BDNFを歯周組織再生治療に臨床応用することを目的とし、安全性の高い合成高分子ヒアルロン酸（電気化学工業株式会社）を担体として用い、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体のin vivoにおける歯周組織再生能を検討することとした。

2. 研究の目的

BDNFを歯周組織再生治療に臨床応用することを目的として、安全性の高い高分子ヒアルロン酸複合体とBDNFの組み合わせがin vivoにおける歯周組織再生を促進するかどうかを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

雌ビーグル犬（12～20ヵ月齢、体重10～14kg）の下顎第2、3、4小白歯にⅢ級根分

岐部歯周組織欠損を作成し（図1A）、アルジネート印象材を填入することで実験的歯周炎を惹起させた（図1B）。一週間後、印象材を除去し、ルートプレーニングを行い、歯肉弁を元に戻して縫合した。その後ブラッシングを行うことで、炎症を軽度抑えた歯周組織を確立した。さらに一週間後、BDNF（5、50 µg/ml）/高分子ヒアルロン酸複合体を加えて欠損部に充填した（図1C）。コントロール群として高分子ヒアルロン酸のみを充填した。手術後6週間経過観察した後、灌流固定を行い、組織標本作製した。切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下にて組織観察を行った。



図1. BDNF/HA複合体投与術式

A : Ⅲ級根分岐部歯周組織欠損の作製
B : アルジネート印象材填入
C : BDNF/HA複合体充填

4. 研究成果

欠損のみを作製した欠損群では、歯周組織再生はほとんど観察されず、根分岐部直下上皮が侵入し炎症性細胞浸潤を伴う線維芽細胞、コラーゲン線維、血管を主体とした結合組織が観察された（図2A）。高分子ヒアルロン酸のみを移植したHA群は、ある程度の歯槽骨再生が観察されたものの、根分岐部直下上皮が侵入し、露出象牙質表面に再生セメント質は観察されなかった。また、欠損群と比較すると炎症性細胞浸潤は軽度であった（図2B）。

BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群はコントロール群と比較し、まだ完全ではないが、

明らかに歯周組織再生量が多かった(図2C, D)。根分岐部直下に上皮の侵入はなく、コラーゲン線維の埋入を伴ったセメント質が再生していた(図3A, B)。また、コントロール群に比べて多くの管腔が観察された(図3C)。再生歯槽骨と再生セメント質の間には一定の幅を維持した歯周靭帯の再生も観察された(図3D)。

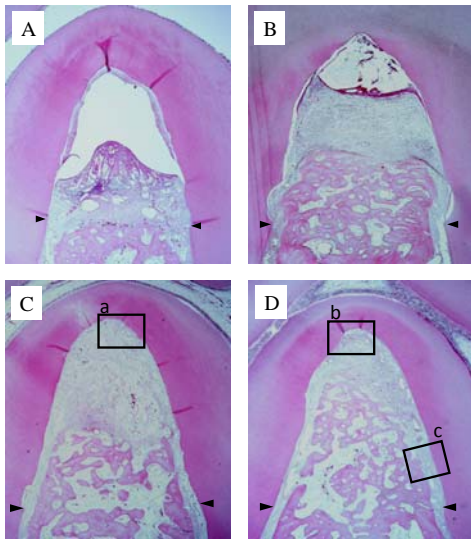


図2. BDNF/HA複合体投与後6週目の根分岐部のHE染色像

- A : 欠損作製のみ
- B : HAのみ
- C : BDNF/HA複合体 (BDNF 5 µg/ml)
- D : BDNF/HA複合体 (BDNF 50 µg/ml)

矢頭は歯周組織を除去した最根尖側寄りの部位、ノッチを示す。
a~cで示す四角の領域は図3に強拡大像を示す。

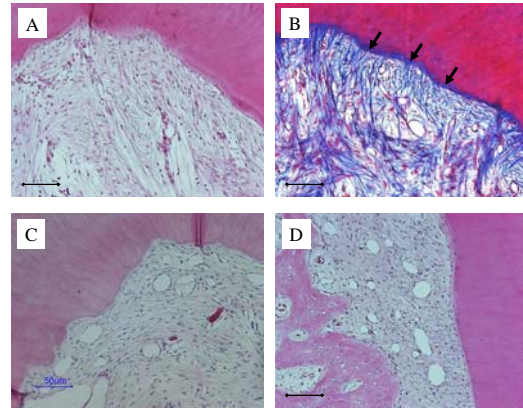


図3. BDNF/HA複合体投与後6週目の組織像(図2の強拡大像)

- (A) BDNF 5 µg/ml 投与群根分岐部直下のHE染色像 (図2Cのaで示す領域の強拡大像)
- (B) 図3AのAzan染色像
矢印 : 再生セメント質
- (C) BDNF 50 µg/ml投与群根分岐部直下のHE染色像 (図2Dのbで示す領域の強拡大像)
- (D) BDNF 50 µg/ml投与群欠損根尖側のHE染色像 (図2Dのcで示す領域の強拡大像)

Barはいずれも50 µmを示す。

歯槽骨再生率およびセメント質再生率を計測した(図4)。コントロール群として欠損群とHA群、またBDNF群としてBDNF 5, 50, 500, 2000 µg/mlについて、それぞれビーグル犬6匹からの6歯(欠損群のみ3歯)で、一歯につき3つの切片で評価した。歯槽骨再生率は、欠損群では 5.1 ± 5.2 (平均±標準偏差)%であり、HA群で $34.7 \pm 23.1\%$ 、BDNF 5 µg/mlで $58.1 \pm 19.0\%$ 、BDNF 50 µg/mlで $67.7 \pm 12.5\%$ 、BDNF 500 µg/mlで $56.1 \pm 15.4\%$ 、BDNF 2000 µg/mlで $64.2 \pm 5.3\%$ であった(図5A)。ただし、歯周靭帯の占める面積を差し引くと、歯槽骨が完全に再生した場合であっても、歯槽骨再生率は80%である。また、セメント質再生率は、欠損群では 19.0 ± 7.8 (平均±標準偏差)%であり、HA群で $34.0 \pm 26.7\%$ 、BDNF 5 µg/mlで $75.1 \pm 16.5\%$ 、BDNF 50 µg/mlで $89.6 \pm 18.3\%$ 、BDNF 500 µg/mlで $77.8 \pm 10.1\%$ 、BDNF 2000 µg/mlで $79.8 \pm 12.4\%$ であった(図5B)。

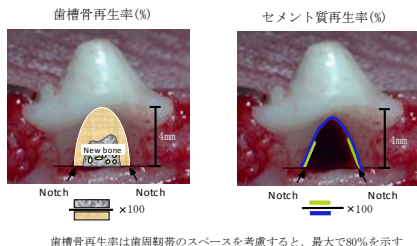


図4. 歯槽骨再生率、セメント質再生率の算出方法

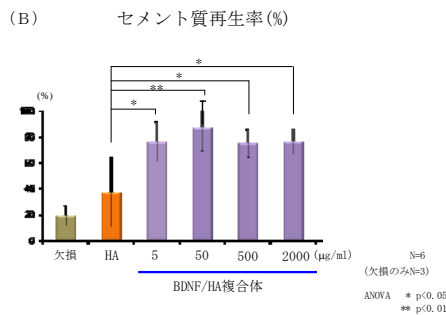
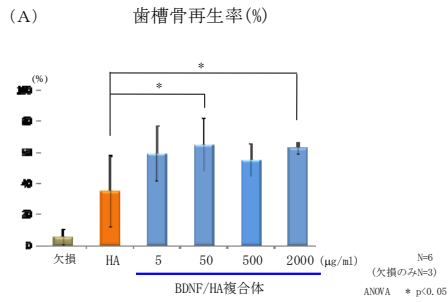


図5. 歯槽骨再生率とセメント質再生率

以上の結果から、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体は、歯周組織再生を促進する歯科材料となりうる可能性が示唆された。

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 2 件)

① Brain-derived neurotrophic factor protects cementoblasts from serum starvation-induced cell death. :Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Kurihara H. :J Cell Physiol. 2009 Dec;221(3):696-706. (査読有)

② Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts.: Kajiya M., Shiba H., Fujita T.,

Ouhara K., Takeda K., Mizuno N., Kawaguchi H., Kitagawa M., Takata T., Tsuji K., Kurihara H.: J Biol Chem., 2008 Jun 6;283(23):16259-67. Epub 2008 Apr 3 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① Brain-derived Neurotrophic Factor / Hyaluronic Acid Complex Enhances Periodontal Tissue Regeneration

K. TAKEDA, N SAKAI, H. SHIBA, H. KAWAGUCHI, K TSUJI, H. KURIHARA

87th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (Miami), USA, 2009.Apr.3

② 脳由来神経栄養因子(BDNF)と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発—高分子ヒアルロン酸のヒト歯周靭帯細胞に及ぼす影響—

武田克浩、永原隆吉、柴 秀樹、藤田 剛、松田真司、河口浩之、橋本正道、辻紘一郎、栗原英見 第 131 回秋季日本歯科保存学会 (仙台), 2009 年 10 月 29 日

③ BDNF/hyaluronic acid enhances periodontal tissue regeneration: Sakai, N., Kurihara, H., Takeda, K., Shiba, H., Kawaguchi, H.: 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (Toronto), Canada, 2008.July2-5

④ 脳由来神経栄養因子(BDNF)と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発: 坂井宣之, 武田克浩, 柴 秀樹, 河口浩之, 橋本正道, 辻紘一郎, 栗原英見: 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会 (大宮), 2008 10 月 19 日

⑤ 脳由来神経栄養因子(BDNF)と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発: 坂井宣之, 武田克浩, 柴 秀樹, 河口浩之, 橋本正道, 辻紘一郎, 栗原英見: 日本歯科医学会総会 (横浜), 2008 年 11 月 14 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 克浩 (Katsuhiko Takeda)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10452591

(2) 研究代表者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: