

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23038

研究課題名(和文)新規中性自己組織化ペプチドを用いたnon-contained型骨欠損再生の試み

研究課題名(英文) Investigating the regeneration using novel neutral self-assembling peptide in non-contained bone defect

研究代表者

吉田 航 (Yoshida, Wataru)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30875703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラットnon-contained型歯周組織欠損に対する副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇的全身投与と中性自己組織ペプチド(SPG-178)の局所応用による治癒効果を検討した。PTH/SPG-178群の新生骨様構造は、Unfilled群と比較し多く認められた。さらに、SPG-178内でラット歯根膜細胞が網目状に広がり増殖を示したことで、SPG-178は、新生骨形成促進の足場として機能する可能性が示された。以上より、PTHの間歇的全身投与とSPG-178の局所応用の併用は、歯周組織治癒を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、重度歯周炎モデルにおける副甲状腺ホルモンの投与と足場材としての自己組織化ペプチドの応用が歯周組織治癒に及ぼす影響を比較・検討した。歯周炎の進行によって生じる骨吸収において、3壁性骨欠損よりも重篤なnon-contained型骨欠損モデルを人工的に作製し、成長因子と足場材の併用した歯周組織再生療法を行った。今回の結果から、non-contained型欠損における歯周組織再生療法において自己組織化ペプチドは足場材として十分に機能すると示唆された。本研究で得られた知見を基とし、さらに効率的な歯周組織再生療法が確立されれば重篤な歯周組織に対する治療戦略の足掛かりになるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the effect of systemic intermittent administration of parathyroid hormone (PTH) and local application of a neutral Self-assembling peptides (SAP) hydrogel on the healing of surgically created non-contained periodontal defects in rats. The amount of new bone formation in the PTH/SPG-178 group was greater than that in the saline administration and unfilled group. In addition, rat periodontal ligament cells behavior in the SPG-178 showed multicellular network and cell proliferation. Therefore, SPG-178 could provide an environment as a scaffold to promote new bone formation. These findings suggest that the intermittent systemic PTH administration and local SPG-178 application enhance periodontal healing.

研究分野：医師薬学

キーワード：歯周組織再生療法 non-contained型欠損 副甲状腺ホルモン 自己組織化ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生は、歯周治療の最大の目標であり、現在までに多くの歯周組織再生への試みがなされてきたが、より予知性の高い治療法の開発が必要とされる。組織工学の概念において、細胞・足場・シグナル因子の三要素が重要とされており、歯周組織再生療法の足場材には、生体由来材料よりも感染リスクの低い合成材料への転換が望まれている。そこで、自己組織化ペプチド(SAP)ハイドロゲルは、三次元的足場材料として注目されており(Zhang S et al., Biomaterials 1995)、我々の研究グループでは、SAP ハイドロゲルの一つである RADA16 がラットの歯周組織欠損の治癒を促進したという知見を報告した(Takeuchi T et al., J Clin Periodontol 2016)。しかし、RADA16 は pH3 ~ 4 の酸性であり、生体に使用する上ではその影響が懸念される。そこで、pH が中性領域である中性自己組織化ペプチド(SPG-178)が新規に開発され、細胞の三次元培養や止血剤としての研究が行われてきた(Nagai Y et al., Biomaterials 2012)。さらに、実験的マウス頭蓋骨欠損への SPG-178 の応用が、生体組織修復に効果的であったことが報告されている(Tsukamoto J et al., Tissue Eng Part A 2017)。

一方、骨粗鬆症の治療薬である副甲状腺ホルモン(PTH)は、全身投与でアナボリックな作用を発揮し、骨のリモデリング中のリンおよびカルシウムレベルを調節する上で重要な役割を果たしている。PTH は医科領域では骨粗鬆症の治療薬として使用されており、骨形成促進作用がすでに明らかにされている(Metcalf et al., Bone 2017)。歯科領域では、PTH の間歇的全身投与がラットの歯周組織治癒を促進することが報告され(Vasconcelos DF et al., J Periodontol 2014)、臨床研究においても歯周外科治療と PTH の間歇的全身投与の併用で臨床パラメーターの有意な改善が報告されている(Bashutski JD et al., N Engl J Med 2010)。

これまでの研究で申請者らは、ラットに外科的に作製した 3 壁性歯周組織欠損モデルに PTH の間歇的全身投与と SPG-178 の局所応用を併用し、治癒に及ぼす影響を形態学的、組織学的、免疫組織化学的に解析を行った (Yoshida W et al., J Clin Periodontol 2019)。その結果、PTH と SPG-178 の併用は、細胞増殖を活性化させ、新生血管形成や骨のリモデリングを促すことで、それぞれの単独応用よりも歯周組織の治癒を促進したと報告した。実際に歯周組織再生療法において足場材料が必要とされるのは、重度に骨吸収が起きているケースであり、骨欠損形態としては 1, 2 壁性骨欠損、いわゆるある「non-contained」欠損である。そこで今回はより臨床に即した non-contained 欠損を用いた研究を行うことが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

実際の臨床では、重度に骨吸収を引き起こしている non-contained 型歯周組織欠損における歯周組織再生療法は治癒が難しいとされており、成長因子や足場材などの併用が望まれている。そこで本研究ではラットの non-contained 型・2 壁性歯周組織欠損モデルを確立し、PTH の全身投与と SPG-178 の局所応用による歯周組織治癒の効果およびメカニズムを検討することとした。

3. 研究の方法

In vivo においては、ラットの上顎第一臼歯近心に 2 壁性歯周組織欠損を作製後、SPG-178 を応用し、PTH を 2 日に 1 回のタイムポイントで投与する(図 1)。術後 2 週で安楽死させ、検体を採取し、マイクロ CT 及び H-E 染色にて形態学的な評価を行う。PTH と SPG-178 の併用療法における欠損部の歯周組織治癒効果の検討を行う。

In vitro においてはラット歯根膜由来細胞(rPDL cells)をラット切歯から分離・培養する。SPG-178 上に rPDL cells を播種し、BrdU・ELISA を用いて細胞増殖能を評価し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による SPG-178 内への rPDL cells の遊走の評価を行う。増殖能や遊走能を解析することで、歯周組織再生に適した宿主細胞に対する SPG-178 の作用について検討する。

図1 2壁性歯周組織欠損の作製

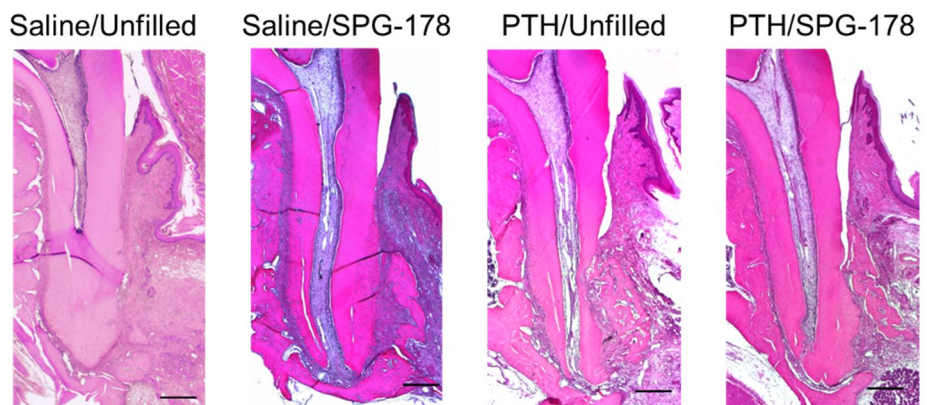


4. 研究成果

(1) 組織学的観察(H-E 染色)

術後 2 週において各群ともに著明な炎症性細胞様細胞は認めず、欠損部は新生結合組織で満たされた。PTH/SPG-178 群は、Saline/Unfilled 群と比較して、より多くの新生骨様構造を認めた(図 2)。

図2 H-E染色(矢状断) ×25 bar = 500 μm



(2) マイクロ CT による骨梁構造解析

マイクロ CT の矢状・水平断像において PTH/SPG-178 群では、術後 2 週で著明な新生骨の形成が観察された。(図 3)

骨梁構造解析の結果 Saline/Unfilled 群と比較し、Saline/SPG-178 群、PTH/SPG-178 群は骨体積率において有意に高い値を示した。骨梁幅、骨梁数、骨梁間隙で有意差は認められなかった。(図 4)

図3 マイクロCT画像(矢状断・水平断)

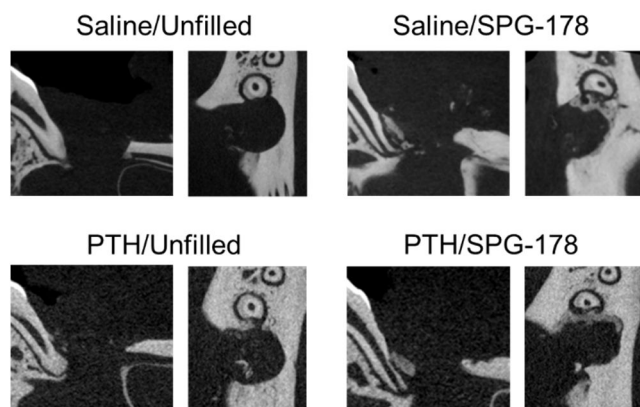
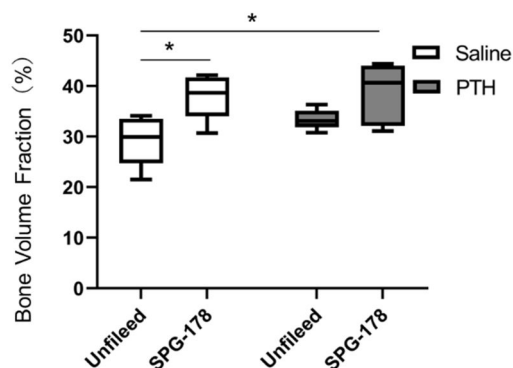


図4 骨梁構造解析(骨体積率)



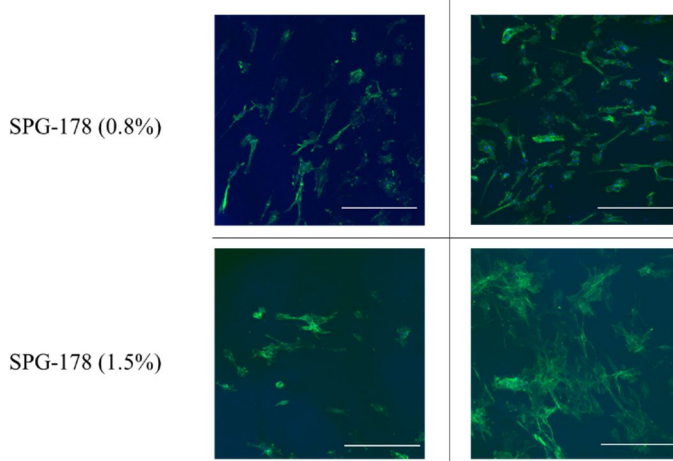
Data shown as mean \pm SD (n = 6). * p < 0.05 by two - way ANOVA with Tukey post hoc test.

(3) CLSM による細胞形態の観察

rPDL cells を SPG-178 に播種後 1 週間の観察では, SPG-178 (1.5%) 群では SPG-178 (0.8%) 群と比較し, 伸長した細胞を多く認める傾向があった。

(図 5)

図5 CLSM $\times 100$ bar = 500 μ m



(4) Cell proliferation assay (BrdU)

BrdU で培養後 72 時間では, SPG-178 (1.5%) 群の細胞増殖率は, Control 群と比較し, 有意に大きい値を示した。

本研究の結果から, PTH 投与/SPG-178 応用群は Saline/Unfilled 群と比較し, H-E 染色で新生骨様構造は多く認められ, 骨梁構造解析の結果, 骨体積率で有意に大きな値を示した。SPG-178 (1.5%) は細かな網目状構造を持ち, 細胞の増殖傾向を示したことから足場材として適していると示唆された。さらに, non-contained 型・2 壁性欠損において, SPG-178 の存在により血餅が保持され, 足場材として機能したことで新生骨形成が促された可能性がある。以上より, PTH の間歇的全身投与と SPG-178 の局所応用の併用は, 歯周組織治癒を促進することが示唆された。

< 引用文献 >

Zhang, S., Holmes, T. C., DiPersio, C. M., Hynes, R. O., Su, X., & Rich, A. (1995). Self complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials*, 16, 1385–1393.

Takeuchi, T., Bizenjima, T., Ishii, Y., Imamura, K., Suzuki, E., Seshima, F., & Saito, A. (2016). Enhanced healing of surgical periodontal defects in rats following application of a self assembling peptide nanofiber hydrogel. *Journal of Clinical Periodontology*, 43, 279–288.

Nagai, Y., Yokoi, H., Kaihara, K., & Naruse, K. (2012). The mechanical stimulation of cells in 3D culture within a self assembling peptide hydrogel. *Biomaterials*, 33, 1044–1051.

Tsukamoto, J., Naruse, K., Nagai, Y., Kan, S., Nakamura, N., Hata, M., ...Matsubara, T. (2017). Efficacy of a self assembling peptide hydrogel, SPG 178 gel, for bone regeneration and three dimensional osteogenic induction of dental pulp stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 23, 1394–1402.

Metcalf, L. M., Aspray, T. J., & McCloskey, E. V. (2017). The effects of parathyroid hormone peptides on the peripheral skeleton of postmenopausal women. A systematic review. *Bone*, 99, 39–46.

Vasconcelos, D. F. P., Marques, M. R., Benatti, B. B., Barros, S. P., Nociti Júnior, F. H., & Novaes, P. D. (2014). Intermittent parathyroid hormone administration improves periodontal healing in rats. *Journal of Periodontology*, 85, 721–728.

Bashutski, J. D., Eber, R. M., Kinney, J. S., Benavides, E., Maitra, S., Braun, T. M., ... McCauley, L. K. (2010). Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *The New England Journal of Medicine*, 363, 2396–2405.

Yoshida, W., Matsugami, D., Murakami, T., Bizenjima, T., Imamura, K., Seshima, F. & Saito, A. (2019) Combined effects of systemic parathyroid hormone (1 - 34) and locally delivered neutral self assembling peptide hydrogel in the treatment of periodontal defects: an experimental in vivo investigation *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 1030–1040.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 航, 松上大亮, 村上 侑, 備前島崇浩, 今村健太郎, 勢島 典, 齋藤 淳
2. 発表標題 Non-contained 型歯周組織欠損に対する中性自己組織化ペプチドとPTHを併用した歯周組織再生の試み
3. 学会等名 第311回東京歯科大学学会例会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------