

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390533

研究課題名（和文） 生理活性物質を用いた硬組織再生のトランスレーショナルリサーチ

研究課題名（英文） Translational research of hard tissue regeneration using physiologically active substances

研究代表者

別所 和久 (Bessho Kazuhisa)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90229138

研究成果の概要（和文）：

C型ナトリウム利尿ペプチドは軟骨細胞に直接作用し、軟骨の肥大化、軟骨基質の産生に影響をおよぼすことにより内軟骨骨化を促進する。さらに、骨芽細胞にも直接作用することにより骨分化促進作用を示す。

歯髄由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化誘導を行い、比較したところ、骨髄由来間葉系幹細胞がより強い骨分化能を有していた。

アドレノメデュリンは骨分化に影響をおよぼさなかった。

研究成果の概要（英文）：

C-type natriuretic peptide (CNP) promotes endochondral bone growth by acting chondrocytes directly to increase the size of chondrocytes and the space extracellular space. In addition, CNP affects bone formation by acting osteoblasts directly.

Adult dental pulp and exfoliated deciduous teeth pulp-derived mesenchymal stem cells compared with bone marrow-derived mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation potentials were high.

Adrenomedullin didn't affect on osteodifferentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	8,000,000 円	2,400,000 円	10,400,000 円
平成 22 年度	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円
平成 23 年度	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円
年度			
年度			
総計	14,300,000 円	4,290,000 円	18,590,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：軟骨、C型ナトリウム利尿ペプチド、骨形成、間葉系幹細胞、アドレノメデュリン

1. 研究開始当初の背景

口腔領域での歯牙あるいは顎骨の欠損は、自然治癒・再生が期待できず、しばしば摂食および審美障害をきたす深刻な問題となる。一方、高度先進医療として、臓器移植が医療として定着し、軟骨や皮膚などの組織再生が臨床応用され始めており、さらに今後 21 世紀

にもっとも期待される分野が器官再生である。以上の状況から口腔領域では種々の手法を応用した硬組織再生治療の研究が重要と考えられている。

2. 研究の目的

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) および骨形成因子といった生理活性物質を用いて、軟

骨・骨・歯牙といった硬組織再生を目指す。

3. 研究の方法

(1) CNP の骨分化促進の検討

生後1日目マウスの頭蓋冠を採取し、酵素処理を行い、骨芽細胞を採取し、その骨芽細胞を骨誘導培地で誘導を試みた。その際、CNP非添加群(生理食塩水)、CNP低濃度、中濃度、高濃度の4群に分け投与を施行した。培養7日、14日、21日にアリザリンレッド染色およびrealtime PCRにて、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、I型コラーゲンの発現の確認を行った。

(2) CNP の軟骨分化促進作用の検討

生後1日目マウス(野生型マウスおよびCNP-KOマウス)の肋軟骨を採取し、酵素処理を行い、軟骨細胞を採取した。培養方法は三次元培養(micromass culture)を用い軟骨分化誘導を試み、その際CNP非添加群、添加群(CNP 10^{-7} M)に分け投与した。21日目に組織学的検討を行った。

(3) 幹細胞を用いた骨の再生についての検討

10週齢の免疫不全マウスを使用し、 β -TCPとハイドロキシアパタイトの細粒の混和物を歯髄由来幹細胞 10^6 個、骨髄由来間葉系幹細胞 10^6 個と混和し、皮下に埋入する。埋入後8週目で採取し、骨形成の評価を行った。

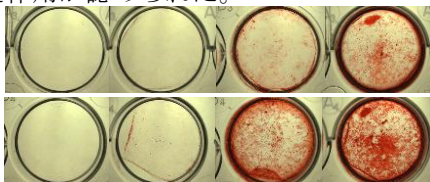
(4) アドレノメデュリンの骨誘導促進作用に対する検討

C2C12(筋芽細胞)にBMP-2発現ベクターで遺伝子導入を行い、アドレノメデュリンを低濃度、中濃度、高濃度の3群に分け投与しアルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシン濃度により評価をおこなった。また、rhBMP-2を $5\mu\text{g}$ と担体としてアテロペプチドタイプIコラーゲン 3mg とを混合し、ラットの筋肉内に埋入し、そのラットに対しアドレノメデュリンおよびCNPを全身投与した。埋入3週後に摘出し、軟X線撮影、重量測定の後、アルカリホスファターゼ活性、Ca含有量を測定、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

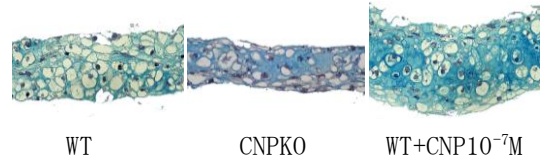
(1) CNP の骨分化促進の検討

骨誘導後、14日、21日にアリザリンレッド染色を行ったところ、14日、21日目のアリザリンレッド染色において、CNP濃度依存性に強く染色された。また、realtime PCRにて、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、I型コラーゲンの発現の確認を行ったところ、CNP濃度依存性にアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、I型コラーゲンの発現上昇を認め、骨芽細胞におけるCNPの骨分化促進作用が認められた。



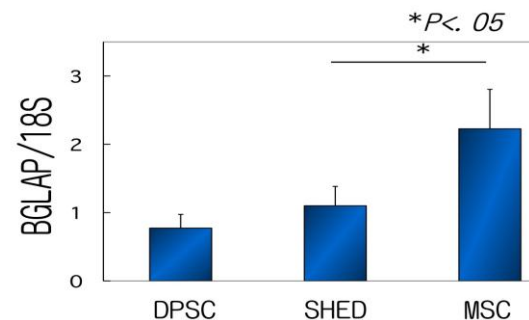
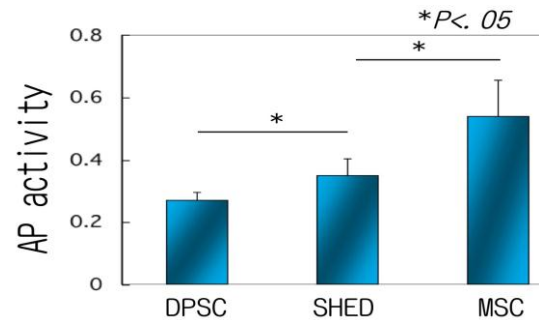
(2) CNP の軟骨分化促進作用の検討

21日目に組織学的検討を行ったところ、CNP添加群において軟骨細胞の肥大化の促進および基質産生の増大を認めた。反対に、CNP-KOマウスから採取した細胞を用いた培養組織では、野生型マウスから採取した軟骨細胞を用いたものに比べ、培養組織の厚みは薄く、基質産生も減少していた。



(3) 歯髄由来幹細胞(DPSC)、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の混和物はともに骨形成が認められたが、細胞組織学的検討(von Kossa染色)を行ったところ、歯髄由来幹細胞に比べ、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた混和物

がより強い骨形成能を有していた。アルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシンの発現についても、歯髄由来幹細胞に比べ、骨髄由来間葉系幹細胞が高値を示した。



(4) アドレノメデュリンの骨誘導促進作用に対する検討

C2C12 (筋芽細胞) に BMP-2 発現ベクターで遺伝子導入を行い、アドレノメデュリンを低濃度、中濃度、高濃度の3群に分け投与したところ、両者とも非投与群と比較してアルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシン濃度の有意な上昇は認めなかった。また、rhBMP-2 を 5 μ g と担体としてアデロペプチドタイプ I コラーゲン 3mg とを混合し、ラットの筋肉内に埋入し、そのラットに対しアドレノメデュリンを全身投与した。埋入 3 週後に摘出し、軟X線撮影、重量測定の後、アルカリホスファターゼ活性、Ca 含有量を測定、組織学的検討を行った。アドレノメデュリン添加群は非投与群と比較してアルカリフォスファターゼ活性および Ca 含有量の有意な上昇は認めなかった。また、組織学的検討、エックス線所見においてもコントロール群と比較して骨形成量に差を認めなかった。

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 12 件)

- ① H. Yamamoto, M. Kawai, N. Shiotsu, M. Watanabe, Y. Yoshida, M. Suzuki, H. Maruyama, J. Miyazaki, M. Ikegami, K. Bessho, T. Yamamoto: BMP-2 Gene Transfer under Various Conditions with in vivo Electroporation and Bone Induction; Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery IN PRESS 査読有
- ② C. M. Curtin, G. M. Cunniffe, F. G. Lyons, K. Bessho, G. R. Dickson, G. P. Duffy, F. J. O'Brien: Innovative Collagen Nano-Hydroxyapatite Scaffolds Offer a Highly Efficient Non-Viral Gene Delivery Platform for Stem Cell-Mediated Bone Formation.; Advanced Materials 2012;24:749-754 査読有 DOI:10.1002/adma.201103828
- ③ T. Sakata-Goto, K. Takahashi, H. Kiso, B. Huang, H. Tukamoto, M. Takemoto, T. Hayashi, M. Sugai, T. Nakamura, Y. Yokota, A. Shimizu, H. C. Slavkin, K. Bessho: Id2 Controls Chondrogenesis Acting Downstream of BMP Signaling during Maxillary Morphogenesis; Bone 2012;50:69-78 査読有 DOI:10.1016/j.bone.2011.09.049
- ④ 高藤洋之、藤村和磨、高橋克、家森正志、大久保康則、別所和久: 筋突起に生じた骨軟骨種の 1 例; 日本口腔外科学会雑誌 2012;57:25-29 査読有
- ⑤ N. Koyama, Y. Okubo, K. Nakao, K. Osawa, K. Bessho Experimental Study of Osteoinduction Using a New Material as a Carrier for Bone Morphogenetic Protein-2; Br J Oral Maxillofac Surg. 2011; 49(4): 314-8 査読有 DOI:10.1016/j.bjoms.2010.05.010
- ⑥ N. Koyama, Y. Okubo, K. Nakao, K. Osawa, K. Bessho: Pluripotency of Mesenchymal Cells Derived from Synovial Fluid in Patients with Temporomandibular Joint Disorder; Life Science 2011;89:741-5 査読有 DOI:10.1016/j.lfs.2011.09.005
- ⑦ B. Huang, K. Inagaki, C. Yoshii, M. Kano, P. V. Abbott, T. Noguchi, K. Takahashi, K. Bessho: Social Nicotine Dependence in Australian Dental Undergraduate Students.; International Dental Journal 2011;61:152-6 査読有 DOI:10.1111/j.1875-595X.2011.00032.x
- ⑧ T. F. Abdelrahman, K. Takahashi, K. Tamura, K. Nakao, K. M. Hassanein, A. Alsuity, H. Maher, K. Bessho: Impact of Different Surgery Modalities to Correct Class III Jaw Deformities on the Pharyngeal Airway Space.; The Journal of Craniofacial Surgery 2011;22:1598-1601 査読有 DOI:10.1097/SCS.0b013e31822e5fc2
- ⑨ H. Maezawa, K. Yoshida, M. Matsuhashi, Y. Yokoyama, T. Mima, K. Bessho, S. Fujita, T. Nagamine, H. Fukuyama: Evaluation Tongue Sensory Disturbance by Somatosensory Evoked Magnetic Fields Following Tongue Stimulation.; Neuroscience Research 2011;71:244-250 査読有 DOI:10.1016/j.neures.2011.07.1831
- ⑩ M. Yamori, M. Njelekela, J. Mtabaji, Y. Yamori, K. Bessho: Hypertension, Periodontal Disease, and Potassium Intake in Nonsmoking, Nondrinker African Women on No Medication.; International Journal of Hypertension 2011;査読有 DOI:10.4061/2011/695719
- ⑪ K. Fujimura, K. Bessho: Rigid Fixation of Intraoral Vertical-Sagittal Ramus Osteotomy for Mandibular Prognathism.; J Oral Maxillofac Surg. 2011;70:1170-3 査読有 DOI:10.1016/j.joms.2011.03.010
- ⑫ K. Osawa, Y. Okubo, K. Nakao, N. Koyama, K. Bessho Osteoinduction by Repeat Plasmid Injection of Human Bone Morphogenetic Protein-2; J Gene Med.

2010; 12(12): 937-44. 査読有
DOI:10.1002/jgm.1515

〔学会発表〕(計13件)

- ① 別所和久 喫煙・ニコチンの歯槽骨再生治療に対する影響、第26回喫煙科学研究財団助成研究会、2011/7/22、東京
- ② 別所和久 ビスフォスフォネート製剤投与患者に発症する顎骨壊死・顎骨骨髓炎、久留米骨粗鬆症研究会、2011/7/2、久留米市
- ③ 別所和久 再建から美容治療へ：歯科インプラントを利用した顎顔面矯正・再建手術と口腔顎顔面再生医療、香川県保険医協会医科歯科合同セミナー、2011/3/27、高松市
- ④ T. Sakata-Goto, K. Takahashi, H. Kiso, B. Huang, H. Tukamoto, K. Bessho: Morphogenetical Analysis of Maxillary Deformity in Id2 KO mice; I. A. D. R 2011/3/15-19 U. S. A
- ⑤ K. Osawa, K. Nakao, N. Koyama, K. Bessho: Osteoinduction by Ultrasound-mediated Gene Transfer of Bone Morphogenetic Protein-2; I. A. D. R 2011/3/15-19 U. S. A
- ⑥ 別所和久 オーラルケア・マネジメントとオーラルヘルス・マネジメント、京都西部化学療法研究会、2011/3/12、京都市
- ⑦ 別所和久 医療安全管理・歯科インプラントを利用した口腔外科手術、西京歯科医師会学術講演会、2010年12月4日、京都市
- ⑧ 別所和久 抗血栓薬・ビスフォスフォネート製剤投与患者に対する歯科治療と歯科再生医療、第14回「空穂の会」学術講演会、2010年11月13日、新潟市
- ⑨ 別所和久 再生医療の現状と歯科領域への応用、第40回日本口腔インプラント学会学術大会、2010年9月18日、札幌市
- ⑩ 別所和久 歯科インプラントを利用した口腔外科手術と歯科再生医療、KIDS研究会学術講演会、2010年8月28日、京都市
- ⑪ 別所和久 硬組織再生医療を目指して、松本歯科大学学会特別講演会、2010年5月28日、塩尻市
- ⑫ 別所和久 ビスフォスフォネート製剤投与患者に対する歯科治療・歯科領域の再生医療の可能性、南口腔ケアセンター記念講演会、2010年4月24日、京都市
- ⑬ 別所和久 抗血栓療法中患者の歯科治療・医療安全管理・歯科再生医療、福井県歯科医師学術講演、2010年4月18日、福井市

〔図書〕(計1件)

K. Osawa, Y. Okubo, K. Nakao, N. Koyama, K. Bessho: Feasibility of BMP-2 Gene Therapy Using an Ultra-Fine Needle, Targets in Gene Therapy

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：歯の切削方法及び装置

発明者：別所和久、松久寛、高橋克、東郷由弥子

権利者：別所和久、松久寛、高橋克、東郷由弥子

種類：特許

番号：特願2011-060967

出願年月日：2011/3/18

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/%7Eoral_surg/Oral_Surg_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別所 和久 (BESSHO KAZUHISA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90229138

(2) 研究分担者

藤村 和磨 (FUJIMURA KAZUMA)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30252399

大久保 康則 (OKUBO YASUNORI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50378618

園部 純也 (SONOBE JUNYA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50464219

小山 典昭 (KOYAMA NORIAKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30599931

中尾 一祐 (NAKAO KAZUMASA)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：40599932