

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：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592495

研究課題名（和文） オン・デマンド型3Dカセット移植材による組織再生制御

研究課題名（英文） Regulation of periodontal tissue re-generation with combination use of FGF-2 and on-demand 3D shaped graft material.

研究代表者

野崎 剛徳（NOZAKI TAKENORI）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30263304

研究成果の概要（和文）：高度組織欠損モデルを用いた研究の結果、FGF-2と人工的移植材の併用によって良好な組織再生が得られることが示された。またインプラント植立モデルを用いた研究の結果、FGF-2がインプラント周囲の骨再生を促進し、インプラントを早期に安定させることが明らかとなった。これらの結果から、オン・デマンド型3Dカセット移植材にFGF-2をシグナル分子として用いることで、良好な組織再生が促進されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It is confirmed that the combination use of FGF-2 and beta-TCP has a significant potential to promote periodontal tissue regeneration in an animal model study. Additionally, it is revealed that FGF-2 promotes osteogenesis and initial osseointegration of implant with low primary stability. These results suggest that FGF-2 is a signaling molecule suitable for on-demand 3D shaped transplant material which promotes tissue regeneration effectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：組織再生、シグナル分子、インプラント、FGF-2

1. 研究開始当初の背景

再生医学は長足の進歩を遂げており、身体を構成する各組織の再生研究が臨床応用の域に近づいている。歯科領域もその例外ではなく、各種の幹細胞・歯周組織由来細胞の移入や細胞シートを利用した組織再生が試みられている。しかし顎口腔領域において再生医療を必要とするケースでは、高度な組織収縮を伴う実質欠損が生じている場合が多く、上皮系組織と間葉系組織を同時に、かつ3次

元的に再生する必要があることから、理想的な組織再生の実現には到っていない。この口腔組織のように、複数種の細胞によって構築される組織の三次元的な再生を実現するためには、移植材や細胞の複合的な利用と、シグナル分子を用いた再生制御の応用が必要であろうと考えられている。また移入する組織再生材料を安定的に被覆するために、上皮・結合織の不足を補う材料や手法の確立が求められている。

2. 研究の目的

歯周組織再生に際して必要とされる歯肉上皮、歯肉結合組織、歯槽骨の再生・再構築が、*in vivo*において調和をもって得られるよう、足場材や組織再生に関与する各種細胞が三次元的に配置された構造を有するとともに、シグナル分子を用いた再生プロセスの制御を可能とする移植材であるオン・デマンド型3Dカセット移植材を開発し、理想的な歯周組織再生を実現することを目的として、研究を実施した。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するために、以下の研究を実施した。

(1) 3Dカセット移植材の開発

理想的な最終治癒形態に則した三次元的形態が付与された骨再生足場材を作成し、その上層にシート状に培養した各種細胞を重層することにより、3Dカセット移植材の開発を行い、その安定性を組織学的に検討した。

(2) シグナル分子が3次元培養細胞に与える影響の検討

シグナル分子を用いて3Dカセット移植材の生物活性を最適な状態に制御する条件を検討するために、歯周組織由来細胞や血管内皮細胞を3次元培養し、シグナル分子による刺激を行った際の細胞増殖や骨形成、血管新生に関わる影響を検討した。

(3) シグナル分子と人工的足場材の併用効果の検討

高度組織欠損モデルを作成し、人工的足場材に各種の濃度のFGF-2溶液を含浸した移植材を移植して、足場材とFGF-2の併用が組織再生に与える効果を検討した。

(4) シグナル分子による組織再生制御が、インプラント周囲の組織再生に与える影響の検討

ビーグル犬に二回法インプラント植立モデルを作成するとともに、再生組織量の測定が可能なカスタムフィックスチャを作成して、シグナル分子による組織再生制御がインプラント周囲の組織再生に与える影響を検討した。

4. 研究成果

以下の研究結果から、オン・デマンド型3Dカセット移植材を開発・改良し、歯周組織再生を適切に制御することによって、より理想的な歯周組織再生の実現が可能になることが示唆された。

(1) 3Dカセット移植材の開発：

フィブリンゲル中で 1×10^6 cell/well のマウス由来間葉系幹細胞株の3次元培養を行い、均一な細胞配置を持つ厚さ約 60 μm の間葉系幹細胞シートを作成した。この細胞シートを、多孔性 HAp/ZrO₂ composite を用いて

立体構造を付与した足場材上に重層することによって3Dカセット移植材を作成し、マウス頭蓋骨に作成した直径5mmの骨欠損に移植した。その結果、移植後の移植材表面に多層構造の細胞シートが残存していることが、組織学的に確認された。

(2) シグナル分子が3次元培養細胞に与える影響の検討

硬組織形成能を有する歯根膜由来クローン細胞 (MPDL22) を培養し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) もしくは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を用いて種々の濃度で単独もしくは共刺激を行い、細胞増殖と骨形成に関わる変化を検討した。その結果、VEGF が低濃度の FGF-2 と協調的に働いて細胞増殖に関与する一方で、高濃度の FGF-2 が存在する条件ではその働きを抑制すること、また VEGF が細胞の石灰化に著明な影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、血管内皮細胞を3次元培養して VEGF もしくは FGF-2 による刺激を同様にを行い、これらの刺激が血管管腔形成に及ぼす影響を検討した。その結果、低濃度の VEGF が存在する条件下では FGF-2 の添加によって血管管腔形成が促進される一方で、高濃度の VEGF が存在する条件下では FGF-2 添加によって管腔形成が抑制される傾向があることが、明らかとなった。さらに、FGF-2 刺激が MPDL22 の VEGF 産生と、その受容体発現に与える影響を検討した。その結果、VEGF の産生が mRNA レベルとタンパクレベルのいずれにおいても、FGF-2 濃度依存的に増加することが明らかとなった。また VEGF 受容体に関しては、FGF-2 濃度依存的に VEGFR-1 の mRNA の発現が誘導されることが明らかとなった。

(3) シグナル分子と人工的足場材の併用効果の検討：

高度組織欠損モデルにおけるシグナル分子と人工的足場材の併用効果を検討するために、ビーグル犬の下顎第3、第4前臼歯を抜歯し、同抜歯窩の治癒後に顎骨を高さ6mm、長さ5mmの大きさに削合して、高度組織欠損を作成した。そして組織欠損部に、 β -TCP を基剤として各種の濃度の FGF-2 溶液を含浸した移植材を移植し、術後6週で組織切片を作成して、足場材とシグナル分子の併用が組織再生に与える効果を組織学的に検討した。その結果、 β -TCP を単独で移入した群の再生骨高さが $3.5 \pm 1.0 \text{ mm}$ であったのに対し、 β -TCP と 0.3% FGF-2 を併用した群では $4.1 \pm 0.4 \text{ mm}$ と有意に高い値を示した。このことから、足場材とシグナル分子の併用によって、各々を単独で用いた場合よりも良好な組織再生が得られることが示唆された。

(4) シグナル分子による組織再生制御が、インプラント周囲の組織再生に与える影響の検討

FGF-2 をシグナル分子として用いた場合の組織再生制御の効果を検討するために、ビーグル犬の下顎第1～第4前臼歯を抜歯して二回法インプラント植立モデルを作成し、組織の充足率・充足速度を計測するためのチャンパーを付与したカスタムフィクスチャ（インプラント）を埋入して、シグナル分子による組織再生制御がインプラント周囲の組織再生に与える影響を組織学的に検討した。その結果、FGF-2 投与群では術後早期から、新生骨梁面積と骨結合面長がともに有意に増加することが明らかとなった。また FGF-2 投与群では、既存骨から離れた場所においても、獲得しうる骨結合面長が有意に高くなることが明らかとなった。すなわち、インプラント埋入時に FGF-2 を投与することで創傷治癒早期の新生骨形成が促進され、良好な初期固定を得ることができない高度骨欠損症例においても、良好なオステオインテグレーションが得られることが示された。

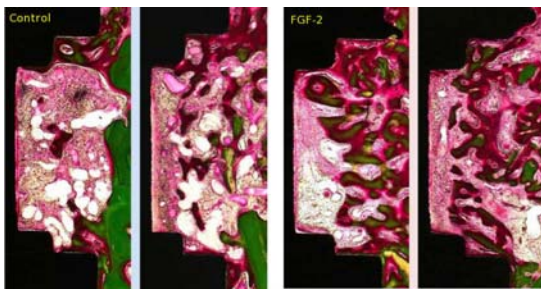


図1：FGF-2による新生骨再生促進作用
左2例に对照群、右2例に FGF 群の術後4週
の組織像を示す。

新生骨梁面積

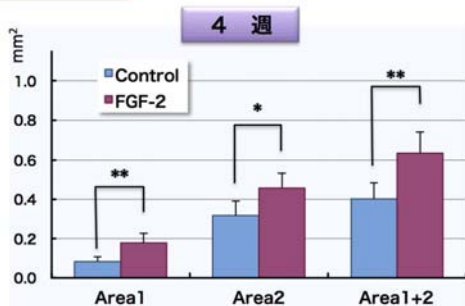


図2：FGF-2による新生骨促進作用（新生骨梁面積）
FGF-2 の使用により、新生骨量面積の有意な増加が認められた。

骨性結合長さ

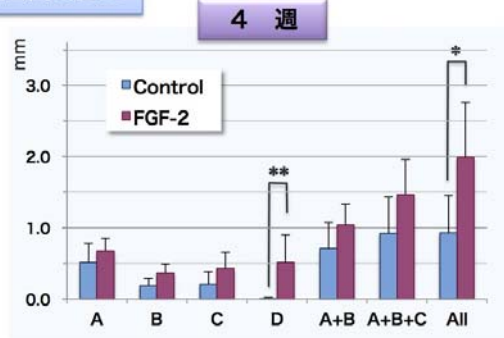


図3：FGF-2による新生骨促進作用（骨性結合長さ）

FGF-2 の使用により、既存骨から離れた場所におけるオステオインテグレーション長の有意な増加が認められた。

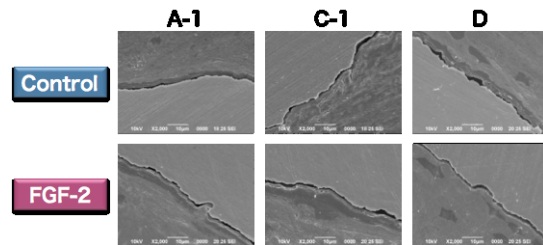


図4：FGF-2による新生骨促進作用（電子顕微鏡像）

対照群と FGF-2 使用群で、オステオインテグレーション獲得部の電子顕微鏡象に相違は認められない。

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1件）

①Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, Murakami S、Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model、Biochem Biophys Res Commun、403 巻、(2010)、p345-350、査読有

〔学会発表〕（計3件）

①Hanaki N, Nozaki T, Dziak R, Cho M, Murakami S, Genco R、Effects of a Combination of Beta-tricalcium Phosphate and Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 on Periodontal Regeneration in the One-wall

Intrabony Defect Model in Dogs、第 97 回
米国歯周病学会、2011 年 11 月 13 日、米国フ
ロリダ州マイアミビーチコンベンションセ
ンター

②野崎剛徳、市川朋生、寺倉まみ、岩山智明、
大原廣之、粟田敏仁、松本 航、安齋 純、
永安利江、高木 崇、寺嶋昭夫、北村正博、
村上伸也、初期固定不良インプラントモデル
を用いた FGF-2 のオッセオインテグレーショ
ン促進効果の検討、第 54 回日本歯周病学会
秋季学術大会、平成 2011 年 9 月 24 日、山口
県下関市海峡メッセ下関

③兒嶋由子、柳田 学、森 健太、野崎剛徳、
山田 聡、北村正博、村上伸也、FGF-2 によ
り誘導される血管新生へのマウス歯根膜細
胞の関与、第 54 回日本歯周病学会秋季学術
大会、2011 年 5 月 28 日、福岡県福岡市福岡
国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30263304

(2) 研究分担者

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：10243247

佐保 輝之 (SAHO TERUYUKI)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：10263295