

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16986

研究課題名（和文）エナメルプロテインを用いた多機能性メンブレンの歯周組織再生への応用

研究課題名（英文）Application of multifunctional membrane using enamel protein for periodontal tissue regeneration

研究代表者

池田 裕一（Yuichi, Ikeda）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：30736179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯周炎は炎症性の骨吸収により、歯の動揺、喪失が引き起こされる慢性疾患である。申請者らは歯周組織再生用材料のメンブレンにエナメルマトリクスタンパク質を付与することにより、疑似体液中で数時間でメンブレン表面に石灰化物を形成し、2倍以上の象牙質への接着強さをもつメンブレンを作成した。

生体内での歯槽骨再生に対する効果を調べるため、ブタを使った実験を行った。最大12週間での歯周組織の変化を観察した結果、有意な差を得ることはできなかったが、当該メンブレンにおいて、通常のメンブレンよりも大きな骨の再生や、歯肉退縮の抑制、長い上皮付着の抑制などの効果をもとめることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎は、炎症性の骨吸収により、歯の動揺、喪失が引き起こされる慢性疾患であり、これまで、様々な歯周組織再生材料が開発され、使用されてきた。今回作成した申請者らのメンブレンは、メンブレン自体が石灰化し、象牙質にメンブレンが接着する性質を持ち、通常のメンブレンよりも骨の再生の促進や、歯肉退縮の抑制、長い上皮付着の抑制などの効果を得られる可能性が示された。このことは、このメンブレンが将来、歯周組織再生治療へ応用できる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a chronic disease caused by inflammatory bone resorption resulting in tooth mobility and loss. By adding enamel matrix protein to the membrane of a periodontal tissue regenerative therapy, the applicants created a new membrane which formed calcification on the membrane surface in a few hours in simulated body fluid buffer and had more than twice the adhesive strength to dentin than a conventional membrane. To investigate the effect on alveolar bone regeneration in vivo, experiments were performed in pigs. Although no significant differences were observed in this experiment due to the experimental design, the placement of the membrane in bone defects resulted in greater bone regeneration, suppression of gingival retraction, and suppression of long epithelial attachments than did the regular membranes over a period of up to 12 weeks.

研究分野：歯周治療学

キーワード：エナメルマトリクスタンパク質 歯周組織再生

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯槽骨や結合組織など、歯周組織の破壊を伴う炎症性疾患であり、その進行により歯の動揺や歯の進行を伴う生活習慣病であり、**QoL** の低下を招く疾患である。日本国民の約 **8** 割が歯周疾患に罹患しているといわれている。進行した歯周炎の症例では、歯周組織再生治療が行われることがあり、様々な材料が開発、使用されている。その一つの治療法である **Guided Tissue Regeneration (GTR)** 法は **GTR** メンブレンと呼ばれる保護膜で歯槽骨欠損部を覆い、歯肉と歯槽骨の間に介在させることで、治癒過程での上皮組織の侵入を防ぎ、歯周組織を再生させる治療法である。この **GTR** メンブレンは歯を固定原として糸で固定、もしくはそのまま留置させるため、歯や骨にしっかりと密着・固定されているわけではない。そのため、メンブレンは歯・骨の間に隙が生じていたり、メンブレンの脱離や安定性の低下などが生じたりし、閉鎖が不安定な状態で安定性が低い。また、**GTR** 法では歯肉弁の退縮による膜露出が報告されており、その確率は約 **6** 割から **9** 割程度と言われている (**Tonetti 1993, Murphy 1995, Cortellini 1995**)。そのため、感染の危険性の上昇や再生量の減少が生じる。さらにメンブレン自体には、歯周組織再生を直接誘導する機能は備わっていない。つまり **GTR** メンブレンには改善の余地が多く残されていた。

申請者は、これまで **GTR** メンブレンの片面にエナメルマトリクスタンパク質であるアメリロン (**AMTN**) を付着させたコラーゲンメンブレン (**AMTN** メンブレン) を用いて、マウス頭蓋骨欠損モデルを用いて骨治癒への効果を検討し、**AMTN** メンブレンを用いた欠損の方が有意に頭蓋骨の欠損の治癒を促進することを明らかにした。また、**AMTN** がマウス骨芽細胞様細胞株 (**MC3T3 - E1** 細胞) の石灰化を有意に誘導することを明らかにした。

### 2. 研究の目的

以上のことから、この **AMTN** メンブレンの歯周組織再生治療への応用を目指し、さらに **AMTN** メンブレンの機能を解析し、歯周組織への **AMTN** メンブレンの効果を検討するため以下の実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* での検討

**AMTN** を含有したコラーゲンゲルと通常のコラーゲンゲルを作成し、疑似体液中で培養し、石灰化の様子を観察した。**AMTN** メンブレンも同様に作成し、通常のコラーゲンゲルと共に疑似体液中で培養し、石灰化の様子を観察した。ベースとなるメンブレンには **Cytoplast RTM** コラーゲンメンブレンと **Vicryl (polyglactin 910) woven mesh** メンブレンを用いた。**AMTN** メンブレンを **PBS** 中に保存し、時系列でのメンブレンからの **AMTN** の溶出を観察した。さらに、メンブレンを象牙質の上に密着させたうえで疑似体液中で培養し、メンブレンと象牙質の接着強さを計測した。

#### (2) *in vivo* での検討

**3** カ月齢、体重 **30** キロのオスのヨークシャーブタ **12** 頭を用いて、実験を行った。全身麻酔を施したのちに、上下顎の第 **2**、第 **3** 小臼歯の歯肉を全層弁剥離し、ラウンドバーで頬側面の歯槽骨を削除し、歯根面のセメント質をキュレットを用いて除去した。セメント-エナメル境と骨底部の歯根面にはノッチを付与し、歯根面の上に、**Vicryl (polyglactin 910) woven mesh** メンブレン (コントロール)、**Fibronectin** を含んだメンブレン、**IGF-1** を含んだメンブレン、**IGF-1** を含んだメンブレンをカルシウムリン酸セメント (**CPC**) で接着させたメンブレン、**AMTN** メンブレン、コントロールのメンブレンを **CPC** で接着したメンブレンを留置し、縫合糸を用いて歯肉弁を復位した。(図 1)



図 1 手術の術中写真

歯周ポケットの深さ、アタッチメントレベルは術前と **4** 週目、**12** 週目に測定した。また、**4** 週目に **6** 頭を、**12** 週目に **6** 頭を安楽殺したのちに、マイクロ **CT** での観察と組織学的観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro*での検討

AMTN を含んだコラーゲンゲルを疑似体液中で培養すると僅か 5 時間で石灰化したが、AMTN を含まないコラーゲンゲルは 24 時間培養しても石灰化しなかった。AMTN を含んだコラーゲンゲルの石灰化はゲル表面で起こっており、ゲル内部に石灰化物は認められなかった。また、石灰化物を走査型電子顕微鏡で観察すると針状石灰化物が認められた(図 2)。

次に AMTN メンブレンの性質を調べるため、AMTN メンブレン (AMTN 量 8.0 $\mu$ g) を PBS 中に放置し、PBS 中に溶出した AMTN 量を ELISA 法を用いて、測定した。AMTN は PBS に浸漬 5 分で急激に溶出し、それ以降ほぼ一定であったが、その溶出量はメンブレンに含まれる総 AMTN 量の約 1% であり、AMTN メンブレン中で多くの AMTN はメンブレンに結合していることが示唆された。さらに、AMTN メンブレンを象牙質に設置し疑似体液中で培養し、通常のメンブレンを設置したもの、もしくは象牙質表面をアメリチン処理し通常のメンブレンを設置したものと比較を行った。結果、AMTN メンブレンは 5 時間、24 時間の時点で象牙質に有意に強く接着することが明らかになった(図 3)。

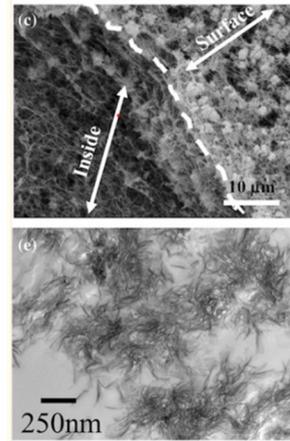


図 2 石灰化した AMTN ゲル

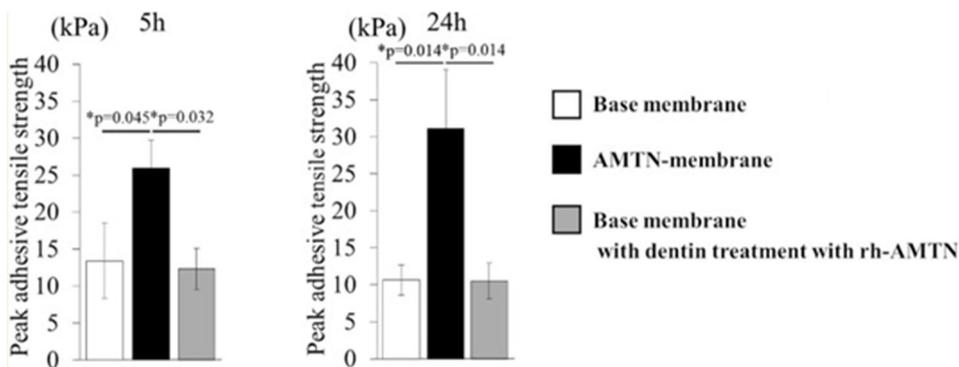


図 3 AMTN メンブレンと象牙質の接着強さ

##### (2) *in vivo*での検討

術後 4 週、12 週での歯周ポケットの深さはすべての群で減少したものの、有意差は認められなかった。またアタッチメントレベルは、4 週目ではすべての群で有意差は見られず、12 週目では IGF-1 を含んだメンブレンの群だけアタッチメントロスが見られた(表 1)。

Implant	4 Weeks		12 Weeks	
	PD $\pm$ St Dev	RAL $\pm$ St Dev	PD $\pm$ St Dev	RAL $\pm$ St Dev
IGF	-0.7 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.7	-1.5 $\pm$ 0.5	-0.7 $\pm$ 0.8
AMTN	-0.9 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 1.3	-1.4 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.4
FN	-1.2 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 1.0	-1.6 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.7
CPC+IGF	-0.9 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.7	-1.6 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 1.0
CPC	-1.1 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 1.1	-1.5 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 1.2
C	-1.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.5	-1.1 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.8

表 1 ポケット深さとアタッチメントレベルの変化

また  $\mu$ CT を用いた骨再生量の計測では、AMTN メンブレンは 4 週目、12 週目ともに明らかな骨再生を認めたが、有意差を得ることはできなかった(表 2)。

Implant	Recovered Bone Height (mm)			
	4 Weeks		12 Weeks	
IGF	0.70	± 0.95	0.58	± 0.65
AMTN	1.00	± 1.01	0.41	± 0.45
FN	0.57	± 1.03	-0.72	± 1.23
CPC+IGF	1.05	± 0.70	-0.09	± 1.02
CPC	0.96	± 1.13	0.94	± 1.03
C	0.13	± 1.04	0.01	± 1.18

表2 骨再生量の計測結果

さらに組織学的解析を行ったところ、有意差を得ることはできなかったが、AMTN メンブレンの群では、4 週、12 週では歯肉退縮の抑制、歯根膜が接着している長さがほかの群に比べて優れていた（表3）。また、12 週では AMTN メンブレンにおいて、上皮の接着が明らかに少なく、セメント質の再生量は CPC セメントと共に明らかに多かった。

Group	Gingival Height (μm)	CEJ to Apex of Epithelial Attachment (μm)	Gingival Fiber Attachment (μm)	Bone Height (μm)	Exposed Root Length (μm)	Epithelial Attachment (μm)	Cementum Recovery (μm)
<b>4 Weeks</b>							
IGF	-410 ± 319	2178 ± 332	1635 ± 412	718 ± 407	4821 ± 332	855 ± 240	2285 ± 654
AMTN	96 ± 408	2684 ± 410	2499 ± 336	473 ± 472	5183 ± 454	1120 ± 365	1953 ± 384
FN	-194 ± 525	2002 ± 534	1969 ± 456	85 ± 339	4610 ± 308	1041 ± 345	2469 ± 469
CPC	-519 ± 210	1728 ± 337	1971 ± 251	890 ± 191	4199 ± 511	1233 ± 285	2449 ± 192
Control	144 ± 419	1250 ± 309	2175 ± 395	913 ± 645	4371 ± 267	874 ± 144	3102 ± 399
<b>12 Weeks</b>							
IGF	-530 ± 279	3107 ± 377	1389 ± 147	401 ± 285	4965 ± 328	847 ± 174	1863 ± 205
AMTN	675 ± 412	2616 ± 351	2114 ± 172	166 ± 408	4718 ± 393	487 ± 92	2182 ± 199
FN	273 ± 583	3054 ± 630	1328 ± 621	-650 ± 522	4480 ± 617	815 ± 165	888 ± 302
CPC	1267 ± 705	3490 ± 787	1440 ± 204	973 ± 564	5894 ± 612	1110 ± 443	2392 ± 505
Control	-782 ± 320	3139 ± 282	1317 ± 383	238 ± 495	5003 ± 294	943 ± 203	1804 ± 503

表3 組織学的解析の結果

ブタを用いた *in vivo* の実験は、有意差は得られなかったものの、AMTN メンブレンの歯周組織再生に対する良好な効果を示唆するものであった。今回のブタを用いた *in vivo* の実験は、個体差が大きかったこと、使用したブタの頭数の制限や、手術野を上下顎に定めなかったことなど、様々な改善点がある。しかし、ブタを用いた歯槽骨欠損モデルの足掛かりとなったと考えている。

以上の *in vitro*、*in vivo* の実験から、様々な特性を持つ AMTN メンブレンは歯周組織再生治療へ将来的に用いられる可能性を秘めており、未ださらなる検討が必要なものの、将来的な臨床現場での応用が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda Yuichi, Holcroft James, Ikeda Eri, Ganss Bernhard	4. 巻 15
2. 論文標題 Amelotin Promotes Mineralization and Adhesion in Collagen-Based Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Bioengineering	6. 最初と最後の頁 245 ~ 254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12195-022-00722-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Quan Bryan D., Sadeghi Rokhsareh, Ikeda Yuichi, Ganss Bernhard, Hamilton Douglas W., McCulloch Christopher A., Sone Eli D.	4. 巻 29
2. 論文標題 Screening of functionalized collagen membranes with a porcine periodontal regeneration model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 2845 ~ 2853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------