

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 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791929

研究課題名（和文）脳由来神経栄養因子の受容体遺伝子多型が歯周組織再生能に及ぼす影響

研究課題名（英文）Influence of trkB gene polymorphism on BDNF-induced periodontal tissue regeneration

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）：

本研究は、BDNF による歯周組織再生における個体の感受性、さらにその再生のメカニズムを解明していくことを目的とした。In vivo において、術後 2 週の BDNF/HA 複合体充填群では、歯周組織再生はまだ十分でないものの、露出象牙質近傍や再生歯槽骨周囲に BDNF 受容体である trkB の陽性細胞が観察された。さらに、それらの細胞は、細胞増殖マーカー PCNA や骨分化マーカー OPN も発現しており、歯周組織再生早期において、BDNF は増殖や分化といった細胞機能を制御することで組織再生を促進していることが示唆された。さらに、アルツハイマー病との関係が示唆されている 3 つの trkB の SNP に関して、10 個体のゲノム DNA を用いて SNP 解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

We planned to clarify the characteristics of BDNF-induced periodontal tissue regeneration, and to investigate the genetic association of trkB with periodontal tissue regeneration by BDNF. In vitro study, two weeks after the BDNF application, periodontal tissue regeneration was insufficient, but invasion of epithelial cells to defects was not observed. TrkB, PCNA and OPN-positive cells were detected on the denuded root surface, around the regenerating alveolar bone and in the soft connective tissue of regenerating periodontal tissues. TrkB positive cells may quickly responded to applied BDNF and started to proliferate and differentiate for the periodontal tissue regeneration within 2 weeks. Furthermore, we investigated the trkB single nucleotide polymorphisms (SNPs) which are reported to have some relationships with Alzheimer's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

近年、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、骨形成タンパク質(BMP)などの成長因子を用いた歯周組織再生療法の開発が盛んに行われている。申請者らは、成長因子の1つである脳由来神経栄養因子(BDNF)に着目し、BDNFが歯周組織再生に有用であることを *in vitro* および *in vivo* の両面から検討し、明らかにしてきた(Takeda K et al. 2005)。

BDNF を歯周組織再生治療薬として臨床応用するにあたっては、安全、安価で、BDNFの徐放能を有する担体が必要である。そこで、合成高分子ヒアルロン酸(電気化学工業株式会社)に着目し、以下の結果を得た。①合成高分子ヒアルロン酸はBDNF徐放能を有していた。②合成高分子ヒアルロン酸は、歯周靭帯細胞の接着、増殖を促進した。③BDNF/合成高分子ヒアルロン酸複合体は、ビーグル犬を用いた動物実験で歯周組織再生を促進した(Takeda K et al. 2011)。

2. 研究の目的

BDNFによる歯周組織再生促進効果に関しては、手術時1回のBDNFの局所投与がトリガーとなって、一連の再生過程がカスケードとなって流れると考えられる。本研究は、BDNFによる歯周組織再生の詳細なカスケードを明らかにするとともに、BDNFによる歯周組織再生における個体の感受性を、BDNF特異的細胞応答、遺伝子多型という点から解析することを目的とした。

3. 研究の方法

①BDNFによる歯周組織再生のカスケードの解明

雌ビーグル犬(12~20ヵ月齢、体重10~14kg)の下顎第2、3、4小臼歯に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(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2、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、アザン染色、免疫染色を行い、光学顕微鏡にて組織観察を行った。

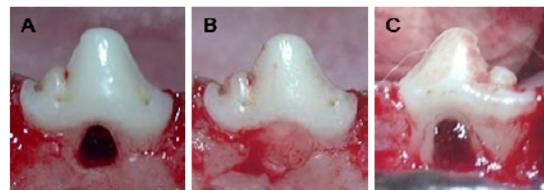


図1 BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与術式
(A)ビーグル犬Ⅲ級根分岐部歯周組織欠損の作製
(B)炎症を惹起するためにアルジネート印象材填入
(C)BDNF/高分子ヒアルロン酸充填

②BDNF受容体(trkB)のSNP解析

ヒト10個体の歯肉組織(HGF1~10)からDNAを抽出し、リアルタイムPCRシステムを用いて、BDNFの高親和性受容体trkBについてSNPを解析した。今回はアルツハイマー病との関連が示唆されているrs1624327、rs1443445、rs3780645について検討を行った。

4. 研究成果

①BDNFによる歯周組織再生のカスケード

の解明

術後 2 週において、高分子ヒアルロン酸のみを移植した HA 群、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群ともに歯周組織再生は十分ではなかった(図 2 A, B)。HA 群は根分岐部直下に上皮が侵入していたが、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体投与群では、上皮の侵入は観察されなかった(図 3A,C)。欠損底部の象牙質表面では再生セメント質が観察された(図 3B,D)。

図 2 HE 染色 (術後 2 週)

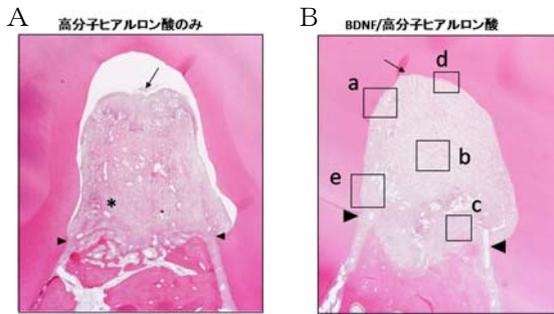


図 3 HE 染色 (術後 2 週)

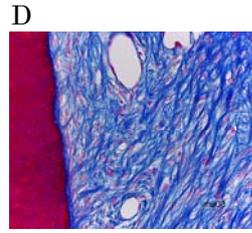
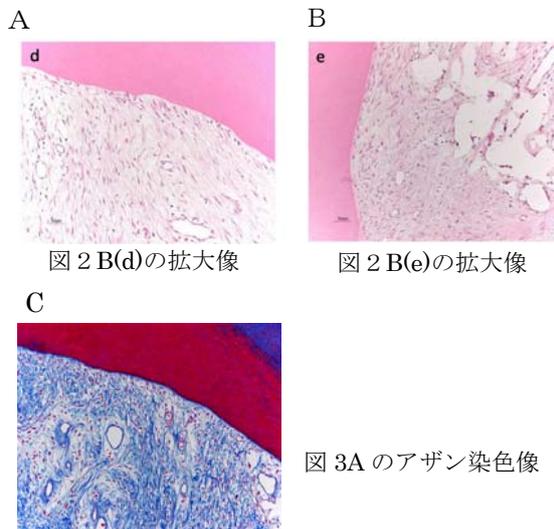
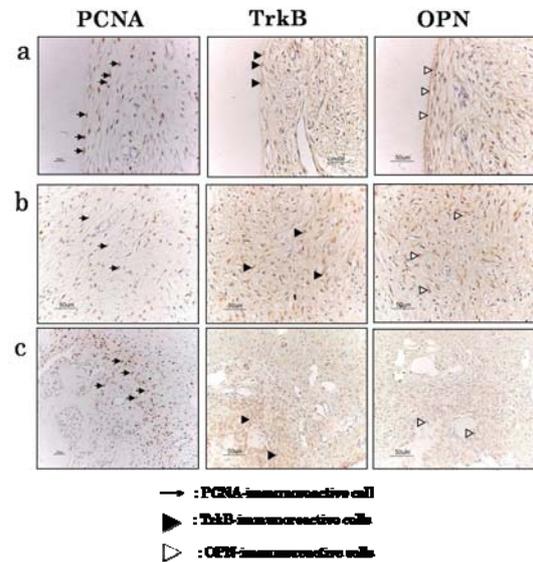


図 3B のアザン染色像

欠損底部の既存の歯槽骨周囲、欠損部の露出象牙質近傍の結合組織中に *trkB* 陽性細胞、PCNA 陽性細胞が多く認められた。露出象牙質表層に OPN の沈着が見られた(図 4)。

図 4 HE 染色 (術後 2 週)



術後 6 週において、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、根分岐部直下に上皮が侵入し、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 5A)。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 5B)。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 6A,C)。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 6A)。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 6B)。

図 5 HE 染色 (術後 6 週)

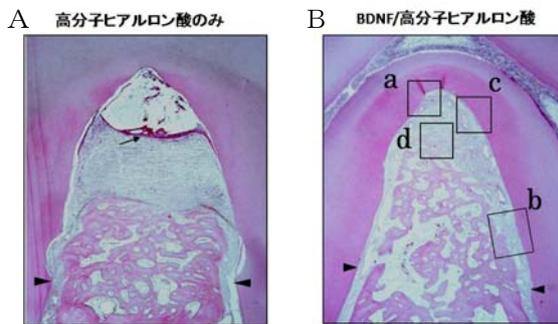


図 6 HE 染色 (術後 6 週)

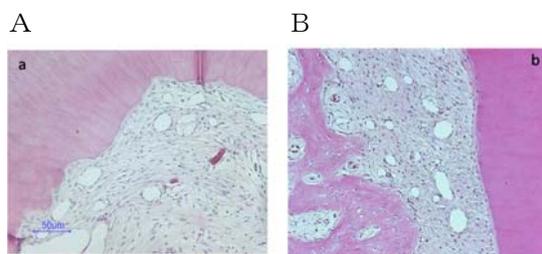


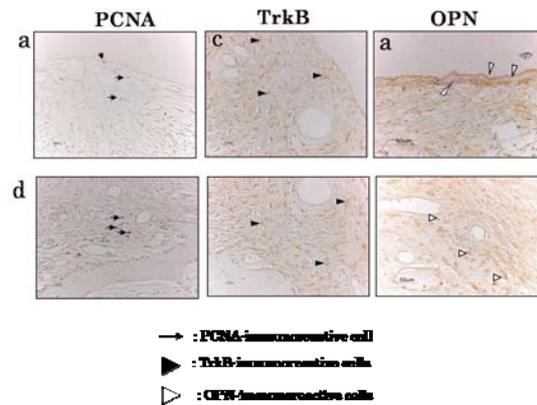
図 5B(a)の拡大像 図 5B(b)の拡大像
 図 6(A)のアザン染色像

2 週モデルと比較し、再生歯槽骨上部をはじめ欠損部全体で PCNA 陽性細胞の発現は減少している。再生セメント質と象牙質の界面、再生セメント質表層には OPN の沈着が認められた (図 7)。

免疫染色の結果から、BDNF が投与後早期に歯周靭帯細胞や未分化な間葉系幹細胞などの内在性細胞の増殖を *trkB* を介して促進させると示唆される。さらに、それらの細胞の象牙質表面におけるセメント芽細胞、歯槽骨周囲における骨芽細胞への分化にも関与

していると考えられる。

図 7



②BDNF 受容体 (*trkB*) の SNP 解析

rs1624327 に関しては、*HGF3* のみ A/A のホモで、他のゲノム DNA はすべて G/G のホモであった(図 8)。

rs1443445 は *HGF1* と 9 が G/G のホモ、*HGF2*, 6, 7, 10 は A/G のヘテロ、*HGF3*, 4, 5, 8 は A/A のホモであった(図 9)。

rs3780645 は *HGF10* のみ C/T のヘテロで、他は C/C のホモであった(図 10)。

今回ピックアップした 3 つの *trkB* SNP に関してだけでも、個体によって多様なパターンを示した。今後 *trkB* 受容体の SNP と BDNF に対する各種細胞の応答性との相関を調べることで、歯周病患者への BDNF の選択基準の基礎データを得ることができると考えられる。

図 8

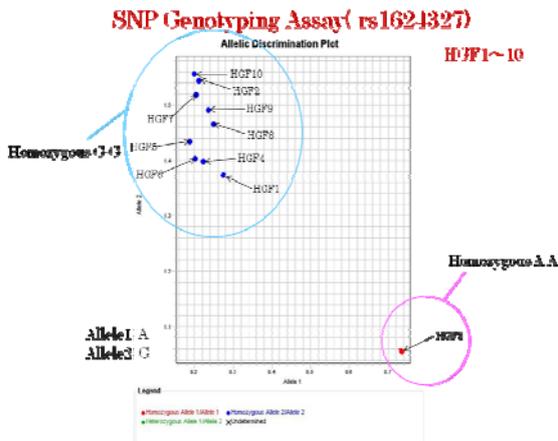


図 9

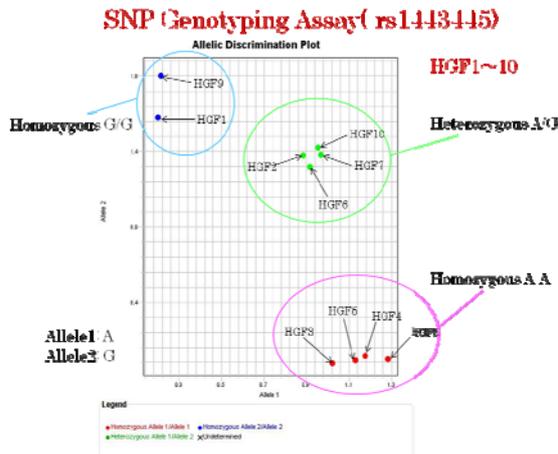
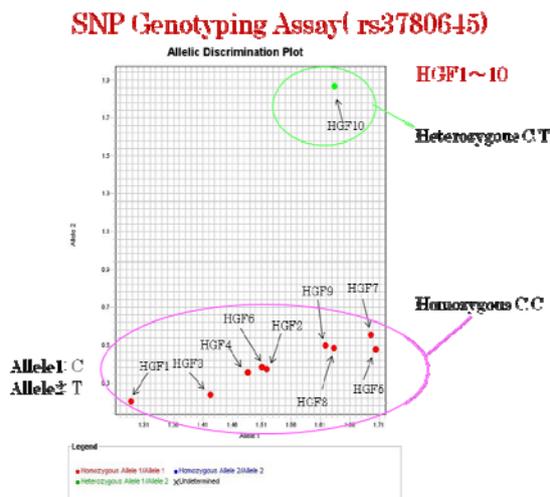


図 10



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 4 件)

1. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin $\alpha(V) \beta(3)$ -FAK cascade. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Shiba H, Kawaguchi H, Kurihara H. J Cell Physiol. (査読有)2011 Jul 18. [Epub ahead of print]
2. Characteristics of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid as a Brain-Derived Neurotrophic Factor Scaffold in Periodontal Tissue Regeneration. Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, Iwata T, Matsuda S, Kawahara K, Kawaguchi H, Kurihara H. Tissue Eng Part A. (査読有)2011 Apr;17(7-8):955-67
3. The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics. Kajiya M, Shiba H, Komatsuzawa H, Ouhara K, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Mizuno N, Kawaguchi H, Kurihara H. J Endod. (査読有)2010 Jun;36(6):1009-13.
4. The expressions of claudin-1 and E-cadherin in junctional epithelium. Fujita T, Hayashida K, Shiba H, Kishimoto A, Matsuda S, Takeda K, Kawaguchi H, Kurihara H. J Periodontal Res. (査読有)2010 Aug;45(4):579-82.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 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：武田克浩、柴 秀樹、藤田 剛、松田真司、小西昭弘、片桐菜穂子、河口浩之、栗原英見；第 10 回日本再生医療学会総会（2011 年 3 月 1 日；東京）

2. Brain-derived Neurotrophic Factor / Hyaluronic Acid Complex Enhances Periodontal Tissue Regeneration: K. Takeda, H. Shiba, H. Kawaguchi, H. Kurihara; The Korean Academy of Periodontology. The 50th Anniversary and International Congress of Scientific Meeting (2010 年 11 月 28 日、ソウル、韓国)

3. 脳由来神経栄養因子(BDNF)はヒト歯肉線維芽細胞の TrkB を介してヒアルロン酸合成酵素発現を促進する：片桐菜穂子，武田克浩，柴 秀樹，小西昭弘，橘高瑞穂，藤田剛，松田真司，河口浩之，栗原英見；第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会（2010 年 9 月 19 日、香川）

4. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は血管内皮細胞遊走過程における integrin の発現、及び Focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を制御する：松田真司，藤田 剛，加治屋幹人，武田克浩，柴 秀樹，河口浩之，栗原英見；第 53 回日本歯周病学会学術大会（春季）（2010 年 5 月 14 日、岩手）

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－根面処理併用効果の検討－：小西昭弘、武田克浩、柴秀樹、林田浩一、橘高瑞穂、藤田剛、松田真司、河口浩之、橋本正道、辻絃一郎、栗原英見；第 9 回日本再生医療学会（2010 年 3 月 18 日；広島）

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)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：