

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390452

研究課題名(和文) 分子間クロストークを応用した FGF-2 の歯周組織再生効果の増強と適応拡大への挑戦

研究課題名(英文) A Challenge to the expansion of indications in periodontal tissue regeneration using FGF-2 by analyzing cross talk between signal molecules

研究代表者

北村 正博 (KITAMURA, Masahiro)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10243247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000 円、(間接経費) 4,440,000 円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を用いた歯周組織再生の適応拡大の可能性を探索するため、FGF-2の臨床投与における長期予後、ビーグル犬を用いた重度歯周炎モデルを対象にしたFGF-2と脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)併用時における再生効果および歯根膜細胞におけるFGF-2刺激がもたらすシグナル伝達機構を検討した。その結果、FGF-2投与の臨床における長期安全性、FGF-2とADSCとの併用時における再生効果の増強に加え、血管内皮細胞増殖因子や骨形成タンパクとFGF-2とのクロストークにより制御される細胞内シグナル機構が歯周組織再生過程において存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the possibility to the expansion of indications in the periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2 (FGF-2), we examined the longitudinal prognosis of FGF-2 application in the clinical trials. Furthermore, we evaluated the efficacy combining FGF-2 and adipose tissue-derived stem cells (ADSC) for periodontal tissue regeneration in the severe periodontal tissue defects of beagle dogs, and investigated the signal transduction following the FGF-2 stimulations in mouse periodontal ligament cells.

In result, the long-term safeties of FGF-2 application in human and the expansion of efficacy combining FGF-2 and ADSC for periodontal tissue regeneration in the severe periodontal tissue defects of beagle dogs were showed. In addition, it was clear that there were the intracellular signaling mechanisms governed by the cross talk between FGF-2 and vascular endothelial growth factor or bone morphogenetic protein 2 in the periodontal tissue regeneration.

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：FGF-2 歯周組織 再生療法

1. 研究開始当初の背景

1982年に歯周組織再生誘導法(GTR法)が紹介されて以来、術式の簡便性や安全性の向上を目指し国内外で新規歯周組織再生療法の開発競争がなされてきた。その結果、エナメルマトリクスタンパクが我国をはじめ世界十数カ国で、そして血小板由来増殖因子とリン酸3カルシウム(-TCP)の合剤が米国で、歯周組織再生用“材料”として実用化されている。一方、我国では、1990年代初頭から我々のグループが塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)による歯周組織再生療法の開発に着手し、世界初の歯周組織再生“薬”としての臨床応用を目指し第II、第III相臨床試験を展開して、3、2壁性骨欠損に対する0.3%FGF-2の歯周組織再生能と完全性を現在までに確認している。このように、FGF-2が新規歯周組織再生薬となり得ることを示唆するデータがほぼ集積した現状においては、FGF-2の歯周組織再生作用を如何に増強し、水平性骨吸収を含む広範囲の歯周組織欠損部に適応拡大するかが今後の重要な研究課題と言える。

2. 研究の目的

歯周組織再生薬としてのFGF-2のポテンシャルを最大限に活用し歯周組織再生効果を増強するためには、幹細胞、足場材、シグナル分子といった再生医工学的なアプローチが必要であると考えられる。そこで、本研究では、FGF-2を用いた歯周組織再生療法の重度歯周組織欠損への適応拡大の可能性を探索するため、臨床治験における歯周組織再生“薬”FGF-2投与の長期予後を検討するとともに、ビーグル犬を用いた重度歯周組織欠損モデルを対象にFGF-2と脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)や足場材併用時におけるFGF-2の歯周組織再生効果の増強について検討した。そして、歯根膜細胞におけるFGF-2刺激がもたらす様々なシグナル分子のシグナル伝達機構のクロストークを*in vitro*で解析して、これらの分子の制御がFGF-2の効果増強をもたらす可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 3、2壁性歯周組織欠損におけるFGF-2投与の長期予後の検討

FGF-2を用いた新規歯周組織再生薬の開発に関わる早期第II相臨床試験(2001年12月1日~2003年11月30日実施)に参加した歯周炎患者79名を被験者とし、上記臨床治験を実施した大阪大学歯学部附属病院および協同実施施設の協力のもと、診療録等から治験終了後に治験薬投与部位にみられた(1)抜歯、(2)歯周組織再生療法の実施、(3)歯周組織再生療法を除く歯周外科手術の実施、(4)積極的な介入を目的とした非外科的歯周治療の実施、(5)歯周炎の進行が原因となって生じた事象、および(6)異常な歯周組織

の治癒などのイベントの発現を調査した。そして、FGF-2(0.01%、0.1%、0.3%)およびプラセボ投与部位の術後におけるイベント発現率をもとに各部位の生存時間解析を行い、歯周炎に対するFGF-2投与の長期効果と安全性について解析した。

(2) ビーグル犬の裂開状歯周組織欠損モデルにおけるFGF-2の歯周組織再生能の検討

ベントバルビタール麻酔下で通法に従い歯肉弁を形成し、ビーグル犬の上顎両側犬歯唇側に人工的裂開歯周組織欠損(近遠心径3mm、歯軸方向径5mm)を作製した。そして、作製したビーグル犬の人工的裂開歯周組織欠損モデルにおいて、左側(試験側)にはFGF-2含有HPC(ハイドロキシプロピルセルロース)製剤を、右側(対照側)にはHPCのみを投与する。そして、両部位の治癒状態を経時的に観察するとともに、欠損作製から6週間後に同様の麻酔下でと殺し被験部のマイクロCTによる骨組織の評価と組織学的検索を行い、ビーグル犬裂開モデルにおけるFGF-2の歯周組織再生効果を検討した。

(3) 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)の硬組織形成分化能の検討

ビーグル犬ADSCの硬組織形成細胞への分化誘導は、10mMβ-グリセロリン酸、50μg/mlアスコルビン酸、0.1μMデキサメタゾンを添加した石灰化誘導培地(M-Med)を用い、3日ごとに培地交換することにより行った。そして、培養細胞からの全RNA抽出した後、逆転写反応を行いcDNAを作製し、石灰化関連遺伝子であるRunx2、Col1a、BSP mRNAおよび歯根膜特異的遺伝子であるPLAP-1 mRNAの発現をReal-time PCR法にて解析し、コントロール培地で培養したADSCが発現する各遺伝子のmRNA発現と比較した。また、ADSCを硬組織形成細胞へと分化誘導した後、細胞を100%エチルアルコールにて固定(4℃、10分間)した後、1%アリザリンレッドSにて染色し、カラーイメージスキャナGT-X750と画像解析ソフトウェアを用いて、石灰化ノジュール形成能を検討した。

(4) 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬の下顎両側第4前臼歯の抜去し、治癒後に第1後臼歯の近心頬側部に2壁性歯周組織欠損(近遠心径5mm、頬舌径3mm、歯軸方向径4mm)を作製し、試験側にはADSC含有フィブリンゲルを、対照側にはフィブリンゲルのみを投与する。そして、両部位の治癒状態を経時的に観察するとともに、と殺後マイクロCT解析により、ADSCの歯周組織再生効果を解析した。

(5) 脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)とFGF-2併用時の歯周組織再生効果の検討

前記(4)と同様に、ビーグル犬に2壁性歯周組織欠損を作製し、試験側にはADSC含有フィブリンゲルとFGF-2含有HPCを、対照側にはADSC含有フィブリンゲルを投与した。そして、同様にマイクロCT解析を行うこと

により、ADSC と FGF-2 併用時の歯周組織再生効果を解析した。

(6) マウス歯根膜細胞における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体発現に及ぼす FGF-2 の影響の検討

歯周組織再生における重要な要素と考えられる血管新生において中心的な役割を演じていると考えられる VEGF 産生に対する FGF-2 の影響を明らかにするため、高い硬組織形成能を有するマウス歯根膜細胞 (MPDL22) を種々の濃度の FGF-2 で刺激し VEGF および VEGF 受容体の mRNA 発現を各遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR 法で検出した。また、各種濃度の FGF-2 で刺激した MPDL22 の培養上清中の VEGF 量を ELISA 法で測定した。

(7) FGF-2 存在下におけるマウス歯根膜細胞の増殖能に対する VEGF の効果の検討

MPDL22 を 10% FCS 含有培地に播種し 24 時間培養後、VEGF および FGF-2 添加あるいは無添加の 10% FCS 含有培地にて 12 時間培養を行った。その後、培養上清を除去し、培地 100 μ l と WST-1 試薬 10 μ l を各 well に加え 2 時間培養し、波長 450nm の吸光度を測定し生細胞の代謝活性を呈色反応にて比較することで細胞の増殖能を評価した。

(8) マウス歯根膜細胞の骨形成タンパク (BMP-2) 誘導硬組織形成過程における石灰化関連遺伝子発現に対する FGF-2 の影響

MPDL22 を硬組織形成培地にて BMP-2、FGF-2 および FGF-2 受容体阻害剤 (SU5402) 存在下あるいは非存在下で培養を行い、アリザリン染色にて石灰化物形成能を観察するとともに、Osteocalcin、骨シアロタンパク質 (BSP)、アルカリフォスファターゼ (ALPase)、Mx2 などの石灰化関連遺伝子を RT-PCR 法で検出した。

(9) マウス歯根膜細胞における FGF-2 の骨形成タンパク (BMP) シグナルの調節機構の解析

MPDL22 を無処理あるいは FGF-2 (250ng/ml) で 1 時間前処理した後、BMP-2 (25ng/ml) を作用させ、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により Smad 1 の C 末端およびリンカー部位のリン酸化を検出した。そしてさらに、MPDL22 を BMP-2、FGF-2、FGF-2 受容体阻害剤 (SU5402) および BMP-2/SU5402 で刺激し、同様に Smad 1 の C 末端とリンカー部位および Erk のリン酸化を検出し、BMP-2 シグナル伝達系への FGF-2 刺激の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 3、2 壁性歯周組織欠損における FGF-2 投与の長期予後の検討

FGF-2 を用いた歯周組織再生薬の開発に関わる早期第 II 相臨床試験の長期予後を観察し、イベント発生や打ち切りを基に生存時間解析を行った。その結果、0.3% FGF-2 投与が歯周病の再発等による生じるイベント発生とその発生までの期間を延長させることが

示された (図 1)。また、臨床試験後 8 年以上の観察期間に悪性腫瘍や歯肉の異常増殖などの発生例は認められず、FGF-2 投与に関する安全性に関する問題も認めなかった。

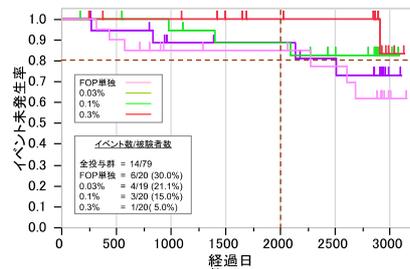


図1 生存時間解析 (Kaplan-Meier 曲線)

(2) ビーグル犬の裂開状歯周組織欠損モデルにおける FGF-2 の歯周組織再生性能の検討

ビーグル犬の上顎両側犬歯における人工的歯周組織裂開状欠損モデル (近遠心径 3mm、歯軸方向径 5mm) を用いて、FGF-2 の歯周組織再生効果を検討した。その結果、0.3% FGF-2 投与により、有意な歯槽骨再生が認められた (図 2) が、個体によりばらつきが大きく FGF-2 投与による歯根膜およびセメント質の再生効果は明確に確認できなかった。

(3) 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の硬組織形成分化能の検討

ビーグル犬 ADSC を石灰化誘導培地 (M-Med) を用い硬組織形成細胞へ分化誘導し、石灰化関連遺伝子および歯根膜特異的遺伝子発現と石灰化ノジュール形成能を検討した。その結果、M-Med 群は対照群と比べ、有意な石灰化ノジュールの形成を認め、石灰化関連遺伝子である *Runx2*、*Col1a*、*BSP* mRNA と歯根膜遺伝子である *PLAP-1* 特異的 mRNA の有意な発現上昇を示したことから、ADSC が骨芽細胞、歯根膜細胞などの前駆細胞となりうる可能性が示唆された。

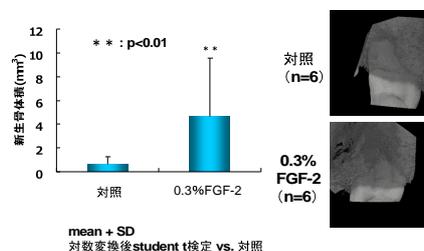


図2 FGF-2投与後6週目における新生骨体積 (ビーグル犬裂開モデル)

(4) 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬の 2 壁性歯周組織欠損モデルを用いて、ADSC 移植の歯周組織再生効果を検討した。その結果、ADSC 含有フィブリンゲルを移植した試験側は、対照側に比べ有意な歯槽骨体積の増加が観察され (図 3)、ADSC の歯周組織再生効果が確認できた。

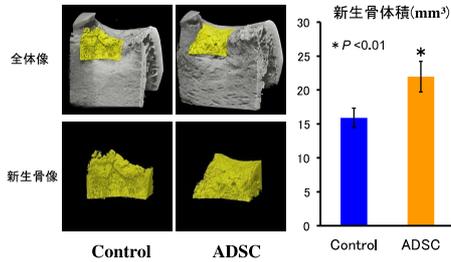


図3 μCT解析による新生骨体積の定量的評価 (ビーグル犬2壁性欠損モデル)

(5) 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) と FGF-2 併用時の歯周組織再生効果の検討

ビーグル犬の2壁性歯周組織欠損モデルを用いて、ADSCとFGF-2併用時の歯周組織再生効果を検討した。その結果、ADSCとFGF-2併用部位ではADSC単独移植部位に比べ有意な歯槽骨体積の増加が観察され(図4)、ADSCとFGF-2併用時における歯周組織再生効果の増強が確認できた。

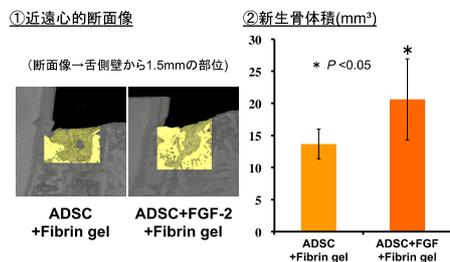


図4 μCT解析によるADSCとFGF-2の併用効果 (ビーグル犬2壁性欠損モデル)

(6) マウス歯根膜細胞における血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体発現に及ぼす FGF-2 の影響の検討

MPDL22 における VEGF mRNA 発現は FGF-2 により濃度依存的誘導され、VEGF タンクの産生量も 50ng/ml 以上の FGF-2 濃度において、有意な増強を認めた。また、VMPDL22 において、FGF-2 は濃度依存的に VEGFR-1 mRNA の発現を誘導したが、VEGFR-2 mRNA の発現は認められなかった。

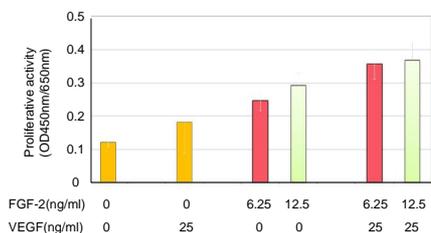


図5 FGF-2存在下におけるMPDL22の増殖能に対するVEGFの効果

(7) FGF-2 存在下におけるマウス歯根膜細胞の増殖能に対する VEGF の効果の検討

FGF-2 存在下における MPDL22 の増殖能に対する VEGF の効果を検討した結果、FGF-2 と VEGF は相加的に働き、MPDL22 の増殖能を上昇させることが明らかとなった(図5)。

(8) マウス歯根膜細胞の骨形成タンパク (BMP-2) 誘導硬組織形成過程における石灰化関連遺伝子発現に対する FGF-2 の影響

BMP-2 により誘導される MPDL22 の石灰化形成は FGF-2 添加により抑制され、FGF 受容体阻害剤である SU5402 の添加により増加した。また、BMP-2 により誘導される MPDL22 における石灰化関連遺伝子の発現も、FGF-2 添

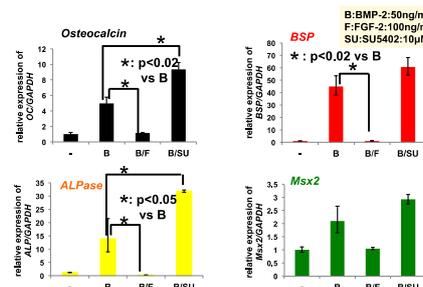


図5 MPDL22のBMP-2誘導硬組織形成過程における石灰化関連遺伝子発現に対するFGF-2の影響

加により同様に抑制され、その抑制は SU5402 の添加により阻害された(図6)。

(9) マウス歯根膜細胞における FGF-2 の骨形成タンパク (BMP) シグナルの調節機構の解析

FGF-2 の前処理により MPDL22 に対する BMP-2 シグナル伝達経路における Smad 1 のリン酸化が抑制された。そして、その系に FGF-2 受容体阻害剤 (SU5402) を添加すると、Erk のリン酸化が阻害され、Smad 1 のリン酸化の抑制が阻害された。以上の結果から、FGF-2 は MAPK を介して Smad1 リンカー部位のリン酸化を抑制し、BMP-2-Smad1 シグナルの標的遺伝子となる石灰化遺伝子群の発現を転写レベルで抑制している可能性が示唆された。

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 5 件)

M Ozasa, K Sawada, T Iwayama, □S Yamamoto, C Morimoto, H Okura, A Matsuyama, H Komoda, CM Lee, Y Sawa, M Kitamura, T Hashikawa, M Takedachi S Murakami, Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells, Inflammation and Regeneration, 査読有, 34, 2014, 109-116.

北村正博、野崎剛徳、山田 聡、村上伸也、歯周組織再生を目指したサイトカイン治療 -FGF-2 製剤開発の現状-、ザ・クインテッセンス、査読無、33、2014、120-124 .

M Takedachi, K Sawada, S Yamamoto, M Ozasa, Y Shimabukuro, M Kitamura, S Murakami, Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived stem cells, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 55, 2013, 137-142.

Y Kojima, M Yanagita, S Yamada, M Kitamura S Murakami, Periodontal regeneration and FGF-2, Inflammation and Regeneration, 査読有, 33, 2013, 72-77.

北村正博、古市保志、藤井健男、川浪雅光、國松和司、島内英俊、山田 了、小方頼昌、和泉雄一、伊藤公一、中川種昭、新井 高、山崎和久、吉江弘正、野口俊英、渋谷俊昭、高柴正悟、栗原英見、永田俊彦、横田 誠、前田勝正、廣藤卓雄、坂上竜資、原 宜興、野口和行、小笠原健文、村上伸也、歯周炎罹患歯に対する FGF-2 投与の長期的効果および安全性の検討、日歯周誌、査読有、54、2012、38-45 .

[学会発表](計 20 件)

S Murakami, FGF-2 stimulates periodontal regeneration, Harvard University School of Dental Medicine, 2013/10/2, MA, USA.

北村正博、歯周組織再生を目指したサイトカイン治療 FGF-2 製剤開発の現状、第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会、平成 25 年 9 月 22 日、群馬(前橋市民文化会館)。

沢田啓吾、ADMPC 由来液性因子のヒト歯根膜細胞へ及ぼす影響、第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会、平成 25 年 9 月 22 日、群馬(前橋市民文化会館)。

K Sawada, Analysis of periodontal tissue regeneration by transplantation of the ADMPCs, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research - Asia Pacific Region, 2013/8/21, Bangkok, Thailand

沢田啓吾、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞移植による歯周組織再生メカニズムの検討、第 34 回日本炎症・再生医学会、平成 25 年 7 月 3 日、京都(国立京都国際会館)。

村上伸也、FGF-2 を使用した再生療法の展望、日本臨床歯周病学会第 31 回年次大会、平成 25 年 6 月 16 日、札幌

村上伸也、FGF-2・脂肪組織由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法、第 67 回日本口腔科学会学術集会、平成 25 年 5 月

23 日、宇都宮

S Murakami, Periodontal tissue regeneration by cytokine therapy and stem-cell therapy, The 6th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research, 2013/4/14, Hsinchu Taiwan.

K Sawada, EVALUATION OF PERIODONTAL TISSUE REGENERATION BY TRANSPLANTATION OF ADIPOSE-TISSUE DERIVED STEM CELLS, The 6th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research, 2013/4/14, Hsinchu Taiwan.

北村正博、歯周組織の再生を目指してーサイトカイン療法から細胞治療へー、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 03 月 22 日、横浜市(パシフィコ横浜)。

久保田実木子、FGF-2 刺激による歯根膜細胞からの CXCR4 の誘導、日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会(第 137 回)、2012 年 11 月 22 日、2012 年 11 月 22 日。

村上伸也、歯周組織再生療法の潮流を探索、第 22 回日本歯科医学会総会、2012 年 11 月 10 日、大阪市(グランキューブ大阪)

Kojima Y, Cooperative Effects of FGF-2 and VEGF on Periodontal Ligament Cells, 2012 AAP-JSP joint meeting, 2012/9/29, Los Angeles, USA.

沢田啓吾、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた新規歯周組織再生療法の経時的評価、第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 07 月 21 日、東京都(京王プラザ)。

Kojima Y, FGF-2 induces VEGF expression by periodontal ligament cells, 90th General Session & Exhibition of the IADR, 2012/6/22, Iguazu Falls, Brazil.

村上伸也、Periodontal Tissue Engineering の将来展望 サイトカイン療法と細胞移植療法の融合を目指して、第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 06 月 13 日、横浜市(パシフィコ横浜)。

沢田啓吾、犬実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞および FGF-2 の移植による歯周組織再生効果、第 11 回日本再生医療学会総会、2012 年 06 月 12 日、横浜市(パシフィコ横浜)。

沢田啓吾、実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生、日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会(第 134 回)、平成 23 年 10 月 21 日、大阪(大阪国際交流センター)。

山下元三、歯根膜細胞において FGF-2 は Wnt 依存性に BMP シグナルを制御する、日本歯科保存学会 2011 年度春季学

術大会（第 134 回）平成 23 年 6 月 9 日、千葉（東京ベイ舞浜クラブリゾート）、
兒嶋由子、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 回春季日本歯周病学会学術大会、平成 23 年 5 月 28 日、福岡（福岡国際会議場）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

村上 伸也（MURAKAMI, Shinya）
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70239490

山下 元三（YAMASHITA, Motozo）
大阪大学・歯学附属病院・助教
研究者番号：90524984

竹立 匡秀（TAKEDACHI, Masahide）
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447

(3) 研究協力者

山田 聡（YAMADA, Satoru）
大阪大学・歯学附属病院・講師
研究者番号：40359849

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

柳田 学（YANAGITA, Manabu）
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80379081

小笹 匡雄（OZASA, Masao）
大阪大学・歯学附属病院・医員
研究者番号：20624563

兒嶋 由子（KOJIMA, Yuko）
大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員
研究者番号：90632141

沢田啓吾（SAWADA, Keigo）
大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生