

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592876

研究課題名(和文) 高齢者に優しい、高分子多糖の歯周組織への有用性

研究課題名(英文) The availability of elderly-friendly macromolecule polysaccharide in periodontal tissue.

研究代表者

川本 章代 (KAWAMOTO, Akiyo)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50368156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は高分子多糖、とりわけヒアルロン酸の歯周組織への影響に着目してきた。その結果、ヒアルロン酸添加により骨芽細胞増殖は亢進し、骨髄由来細胞の接着は抑制され、破骨細胞分化の指標であるTRAP染色陽性細胞数は減少した。このことから、ヒアルロン酸の骨芽細胞ならびに破骨細胞への影響は骨新生に有効的に働き、歯周組織再生を促す成長因子の担体としての応用などにもヒアルロン酸が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the effects of macromolecule polysaccharide, in particular, hyaluronan in periodontal tissue. As a result, the proliferation in osteoblasts was increased, and the attachment in bone marrow stromal cells was suppressed, and the number of cells stained by TRAP as a measure of osteoclast differentiation was decreased, when it cultured with hyaluronan. These findings suggest that hyaluronan is efficient in bone regeneration, and it might be applicable to a carrier for periodontal tissue regenerative.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

高分子多糖とくにヒアルロン酸の生物学的特性は多岐にわたり、既に基礎研究報告も多く、整形外科分野などでは臨床応用されている。また、その水分保持能から含嗽剤や化粧品などに広く使用されており、認知度も高い。また、歯周組織の細胞動態に関わる高分子多糖の効果の報告も見られる。そこで、外科的侵襲を避けたい高齢者にも提供できる方法で、高分子多糖を効率良く骨や歯肉周囲組織の新生・再生に有効に作用させることはできないかを着想するに至った。多くの高齢者を悩ます口腔乾燥も和らげつつ、同時に組織の修復も行われるように口腔内へのアプローチ方法はないものか、と考えた。

2. 研究の目的

- (1) 歯周組織の新生・再生を念頭に置いた高分子多糖の利用方法を検索する。
- (2) 簡便な方法で局所に作用でき、なおかつ高齢者にも適応出来ることを目的とする。
- (3) 高分子多糖単体または成長因子複合体としての使用の可能性を検索する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

- 骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1)
- 6 週齢 ddY マウス骨髄由来細胞 (BM)
- 1 日齢マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (OB)

(2) 増殖能の影響について

BM, OB をそれぞれ 96 well plate 上に 2000 cells/well 播種し、10% 仔牛胎児血清 (第一科学薬品) 抗生物質添加培地 α -MEM (ナカライテスク) にヒアルロン酸 (HA, ARTZ Dispo[®], 生化学工業) 最終濃度 1.0mg/ml を添加したもの (HA 添加群) もしくは無添加培地 (コントロール群) を用いて 2 日間培養し、CellTiter96[®] (Promega) を用いて細胞数を吸光度で測定した。また、同条件における増殖関連遺伝子の発現を qPCR にて検索した。

(3) アポトーシスの影響について

MC3T3-E1 を 96 well plate 上に播種し、一日後ヒアルロン酸添加・非添加培地に変え 2 時間後、0.1 μ M Staurosporine を培地に添加しアポトーシスを誘導した。誘導時にも、ヒアルロン酸添加・非添加培地を使用した。刺激後、Caspase-3/7 (アポトーシスのシグナル伝達経路の 1 つ) の活性を発光にて測定した。また、MC3T3-E1 播種後 4 日目に過酸化水素水含有ヒアルロン酸添加・無添加培地にて刺激し、細胞生存率を CellTiter96[®] (Promega) を用いて吸光度にて測定した。

(4) 破骨細胞分化の影響について

BM ならびに OB を 1,25(OH)₂D₃, PGE₂ 存在下で、また BM のみを Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), Macrophage colony-stimulating factor

(M-CSF) 存在下で HA 添加 α -MEM で培養し、破骨細胞分化を評価するために酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。また破骨細胞分化調節因子における HA の影響を検討するために OB を 1,25(OH)₂D₃, PGE₂ 存在下で HA 添加 α -MEM で培養後、RANKL と Osteoprotegerin (OPG) の遺伝子発現を qPCR にて確認した。

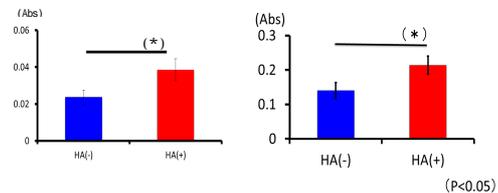
(5) 接着の影響について

BM 播種後、非接着細胞を除去し HA の細胞接着への影響を CellTiter96[®] (Promega) にて検討した。

4. 研究成果

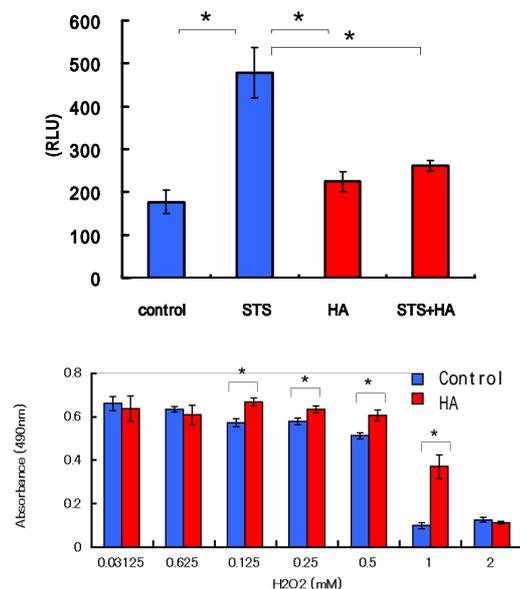
(1) 細胞増殖能

細胞増殖は OB (左図) ならびに BM (右図) において、それぞれ HA 添加群でいずれも亢進した。また、増殖関連遺伝子の発現を qPCR にて検討したが、いずれの mRNA 発現でも差はみられなかった。



(2) アポトーシスの影響

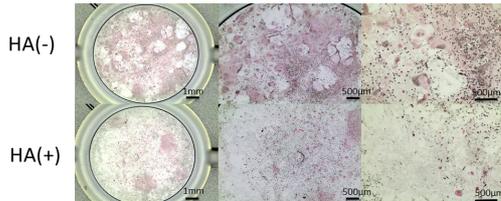
Staurosporine 添加群・ヒアルロン酸非添加群ではコントロール (無添加) と比較して有意に caspase-3/7 活性の上昇がみられた。一方、staurosporine 添加群・ヒアルロン酸添加群では活性が有意に抑制されていた。また、細胞生存率は H₂O₂ 刺激により濃度依存的に減少がみられたが、ヒアルロン酸添加により生存率の減少が有意に抑制された。このことより、骨芽細胞のアポトーシス誘導環境下において、ヒアルロン酸は抑制に働くことが示唆された。



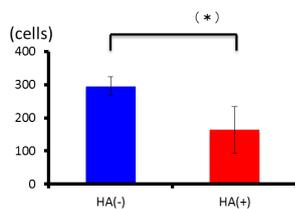
(3)破骨細胞分化の影響と qPCR 解析

HA 添加における破骨細胞分化の影響を BM と OB の共培養または BM のみで比較した。3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞とした。その結果、BM と OB の共培養もしくは BM のみの両方において TRAP 陽性細胞数は、HA 添加で有意に減少した。RANKL、OPG の mRNA 発現は HA 添加により変化がなかった。

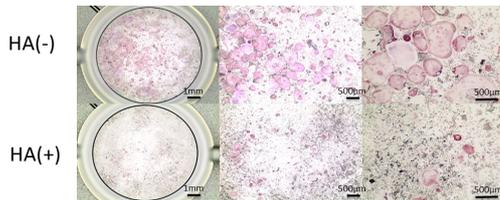
・ TRAP 染色 (BM と OB の共培養)



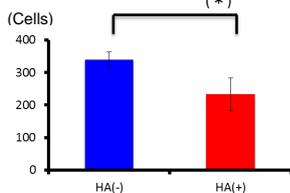
・ TRAP 陽性細胞数 (BM と OB の共培養)



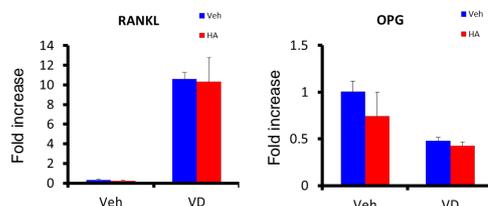
・ TRAP 染色 (BM のみ)



・ TRAP 陽性細胞数 (BM のみ)

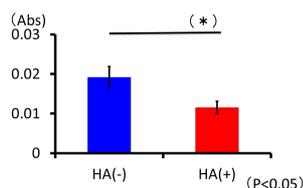


RANKL, OPG の mRNA 発現



(4)接着

BM の細胞接着は HA 添加により抑制された



ヒアルロン酸が骨芽細胞の増殖を促進し、骨髄由来細胞の接着を抑制することで、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞数のバランスが崩れ、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が抑制される可能性が示された。ヒアルロン酸は分子量により細胞への影響も異なるが、本実験では分子量 60 万 ~ 120 万のヒアルロン酸を用いた。過去の報告によると、低分子ヒアルロン酸添加により破骨細胞分化は促進する一方、高分子ヒアルロン酸添加により骨の創傷治癒における骨誘導は刺激されることが分かっている。ヒアルロン酸の担体への応用を考えた場合、適切な分子量のヒアルロン酸と成長因子の複合体の応用に向けた in vitro ならびに in vivo での検討も今後必要と考える。

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 3 件)

H. Hatanaka, Y. Ono, N. Uesugi, K. Iwayama, T. Ashida, A. Kawamoto, Y. Komasa Respiratory pattern on mastication and swallowing J Osaka Dent Univ 47(2) 221-225, 2013. 査読あり。

Y. Ono, H. Hatanaka, K. Iwayama, M. Yoshioka, T. Ashida, A. Kawamoto, Y. Komasa Duration of apnea on mastication and swallowing J Osaka Dent Univ 47(2) 227-231, 2013. 査読あり。

Waddington RJ, Alraies A, Colombo JS, Sloan AJ, Okazaki J, Moseley R. Characterization of oxidative stress status during diabetic bone healing. Cells Tissues Organs 194: 307-312, 2011. 査読あり。

[学会発表](計 11 件)

廣田秀逸, 川本章代, 吉川美弘, 池尾 隆, 小正 裕 マウス骨髄由来細胞と骨芽細胞の共培養系でのヒアルロン酸の破骨細胞分化に及ぼす影響 日本補綴歯科学会 第 123 回学術大会 2014.5.14. 仙台国際センター (仙台市)

Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I, Kamada A, Ikeo T. Small Interfering RNA Targeting Smad1 suppresses osteoclast differentiation. American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting. 2013.10.6 Baltimore, MD, USA. 廣田秀逸, 川本章代, 吉川美弘, 高橋一也, 池尾 隆, 小正 裕 ヒアルロン酸が破骨細胞に及ぼす影響 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013.9.20. 岡山コンベンションセンター

廣田秀逸, 川本章代, 吉川美弘, 高橋一也, 池尾 隆, 小正 裕 ヒアルロン酸が骨芽細胞接着に与える影響 第 11 回日本再生歯科学会学術大会・総会 2013.8.31. 日本大学理工学部 1 号館 C S T ホール (東京都内千代田区)

S. HIROTA, A. KAWAMOTO, Y. YOSHIKAWA, K. TAKAHASHI, Y. KOMASA. Hyaluronic acid suppresses osteoclast differentiation by osteoblasts 第 61 回 JADR 学術大会 2013.8.22. Bangkok, Thailand

A. KAWAMOTO, Y. YOSHIKAWA, S. HIROTA, A. KAMADA, T. IKEO, K. TAKAHASHI, Y. KOMASA. Effect of Hyaluronan on Staurosporine-induced Apoptosis in Osteoblast-like Cells 第 61 回 JADR 学術大会 2013.8.22. Bangkok, Thailand
廣田秀逸, 川本章代, 吉川美弘, 高橋一也, 小正 裕 破骨細胞分化におけるヒアルロン酸の影響 一般社団法人日本老年歯科医学会第 24 回学術大会 2013.6.5. 大阪国際会議場 (大阪)

川本章代, 吉川美弘, 廣田秀逸, 高橋一也, 小正 裕 ヒアルロン酸の骨芽細胞アポトーシスに及ぼす影響 一般社団法人日本老年歯科医学会第 24 回学術大会 2013.6.5. 大阪国際会議場 (大阪)

吉川美弘, 川本章代, 堂前英資, 合田征司, 田村 功, 鎌田愛子, 小正 裕, 池尾 隆 マウス骨芽細胞における Smad1 を介した VDR の発現 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会 2013.3.2. 東京

吉川美弘, 竹山 旭, 川本章代, 田村功, 鎌田愛子, 小正 裕, 森田章介, 池尾 隆 骨芽細胞による破骨細胞分化には Smad1 が関与する 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012.7.21. 東京

吉川美弘, 川本章代, 新原拓也, 竹山旭, 堂前英資, 合田征司, 田村 功, 鎌田愛子, 森田章介, 岡崎定司, 小正 裕, 池尾 隆 歯根膜細胞において VDR 発現が破骨細胞分化因子を調節する 第 9 回日本再生歯科医学会 2011.9.10. 大阪

研究者番号 : 80169094

吉川美弘 (YOSHIKAWA, Yoshihiro)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 70434793

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本章代 (KAWAMOTO, Akiyo)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 50368156

(2) 研究分担者

吉澤達也 (YOSHIKAWA, Tatsuya)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号 : 40313530

岡崎定司 (OKAZAKI, Joji)
大阪歯科大学・歯学部・教授