

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 月 日現在

機関番号：17102

研究種目：戦略的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659890

研究課題名（和文） アンギオテンシン II を用いた成功率の高い意図的歯牙再植術の開発

研究課題名（英文） Development of successful intentional replantation

研究代表者

前田 英史 (MAEDA HIDEFUMI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10284514

研究成果の概要（和文）：

歯の保存治療の1つに意図的再植法があり、難治性の根尖病変の除去や、破折した歯の口腔外接着後の再植時に応用される治療法である。現在のところ、抜歯の際に歯根膜組織へのダメージを最小限にする以外に、再植後の治癒を促進するような薬は開発されていない。そこで本研究では、アンギオテンシノーゲンの代謝産物であるアンギオテンシン II (AngII) が、抜歯再植後の歯根膜組織の治癒に及ぼす影響について検討するために、歯牙再植実験モデルラットを作製し、その歯根膜組織の治癒に及ぼす影響と、AngII をさらに細かく分けたペプチドが歯根膜細胞に及ぼす影響について明らかにすること目的とした。その結果、AngII にて処理されたラットの歯根膜組織において、歯根膜組織中の血管形成が促進し、異所性の骨形成が抑制された。また AngII ペプチドが、未分化なヒト歯根膜細胞に対して、腱/靭帯関連遺伝子の発現を誘導し、さらに歯根膜細胞の起源である歯小嚢のマーカーの1つとされるトロンボスポンディン2の発現を亢進することが明らかになった。以上の結果より、意図的歯牙再植を行う際に、AngII を応用することによってアンキロシスを抑制し、歯根膜組織の治癒を促進しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Intentional replantation is one of conservative dental treatments, that is applied for refractory periapical periodontitis and fractured tooth root subjected to extraoral adhesive treatment. No medicines to promote the periodontal healing after replantation have been reported except to minimize the damage to periodontal ligament (PDL) tissue during extraction. In this context, we aimed to clarify the effects of Angiotensin II (AngII), a metabolite of Angiotensinogen, on the periodontal healing after replantation. For this purpose we decided to develop the replantation experimental model rats, and investigated the effects of AngII on periodontal healing and in addition examined the AngII peptides affected undifferentiated human PDL cells. In consequence, the AngII treatment increased angiogenesis in PDL tissue in rat model, and furthermore reduced the ectopic bone formation in it. We found that an AngII peptide-treated PDL cells increased the gene expression of tendon/ligament-related molecules and Thrombospondin 2 (THBS2), one of the markers of the dental follicle. These results suggested the efficacy of AngII treatment in intentional replantation, reducing ankylosis and promoting periodontal healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2800000	840000	3640000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

歯の意図的歯牙再植を行った際の成功率は、約 67-93%である (Andreasen ら Endod Dent Traumatol 1995; Friedman Endod Topics 2002) といわれている。この結果には、抜歯を行う際の手技だけではなく、再植の際の歯根膜細胞の活性状態が大きく影響を及ぼしていると考えられる。そこで申請者らは、再植する前に歯根膜細胞を賦活化することによって、再植後の歯根膜組織の治癒を促進し、再植の成功率が向上できるという仮説を立てた。

最近申請者らは、適度な咬合力による機械的刺激が歯根膜細胞を賦活化し、強靱な歯周靱帯の形成や維持に寄与していることに着目し、in vitro においてヒト歯根膜細胞 (HPDLC) に伸展刺激を与えた結果、発現が促進した因子に、歯根膜細胞の分化に影響する働きがあることを報告した。8%の伸展刺激を受けた HPDLC は Ang II の発現を促進し、この Ang II は、HPDLC 上の Ang II レセプターの AT1 及び AT2 のうち、AT2 を介して autocrine あるいは paracrine に働き、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) ならびに TGF- β 1 の発現を促進することを明らかにした (Monnouchi et al. J Dent Res, 2011)。さらに、当研究室において樹立した未分化なヒト歯根膜細胞株 (1-11 細胞株; Fujii ら J Cell Physiol, 2008) を TGF- β 1 にて刺激した。その結果、type I collagen (COL1)、alpha-smooth muscle actin (α -SMA)、ならびに fibrillin-1 (FBN1) の発現が亢進したが、骨関連タンパクの発現には影響しなかったことから、TGF- β 1 が、骨系統の細胞よりもむしろ線維芽細胞系統の細胞への分化誘導に働くことを示唆する報告を行った (Fujii ら Cell Tissue Res, 2010)。これらの結果から、Ang II を意図的歯牙再植術に応用した場合、歯根膜細胞を賦活化し、歯根膜組織の再生を促す因子として働くことが可能であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、① Ang II が HPDLC の細胞増殖に及ぼす影響の解析、② Ang II にて刺激した HPDLC が発現を促進する遺伝子の検出、③ ラットを用いた意図的歯牙再植実験モデルの樹立と Ang II による歯根膜組織の治癒促進効果の評価、④ 合成ペプチドが HPDLC ならびに 1-11 細胞株に及ぼす影響についての解析、を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

①については、AngII を 0-10 μ g/mL の間で濃度を変えて HPDLC を刺激し、0-3 日間での細胞分裂を WST-1 (Millipore Corp., Billerica, MA) を用いて検出した。

②については、AngII (0, 1, 10 μ g/mL) にて刺激した HPDLC における、骨系細胞関連遺伝子 (Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN), Bone Sialoprotein (BSP)) ならびに線維芽細胞関連遺伝子 (α -SMA, COL1, COL3, Periostin, S100A4) の遺伝子発現について、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

③については、4 週齢の雄性 SD ラットの上顎右側第 1 臼歯を抜歯後、PBS にて血液を洗浄し、Ang II を 10 μ g/mL に調整したコーゲンゲルを抜歯窩に注入し、そこへ洗浄した歯の再植を行い、術後 1, 2, 3、週間後に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。組織はパラフィン切片を作製し、HE 染色を行って観察した。

④については、AngII は 8 個のアミノ酸 (DRVYIHPF) から構成されていることから、これを DRVY, IHPF, VYIHPF (Ang IV) の 3 種類のペプチドを作製した。つぎに、当研究室で開発した、未分化なヒト歯根膜細胞株 (1-11 細胞株, Fujii et al. 2008) を用いて、これらのペプチドを 0-10 μ g/mL の濃度で添加し、②の遺伝子ならびに腱/靱帯関連遺伝子発現について解析を行った。

4. 研究成果

・細胞増殖：AngII (10 μ g/mL) にて刺激した HPDLC) 刺激下で、HPDLC を 3 日間培養を行ったが、コントロールと有意な差は観察されなかった。したがって、AngII には、歯根膜細胞の増殖を促進する働きはないことが推察された。

・細胞分化：

骨芽細胞分化：AngII (1 または 10 μ g/mL) による HPDLC への 1 時間刺激では、骨関連遺伝子発現に影響が見られなかった。しかしながら、最近の報告で、骨芽細胞分化促進効果が示唆されている IL-11 の発現が、AngII によって促進することを明らかにした。

線維芽細胞分化：AngII (1 μ g/mL) にて 4 日間刺激した HPDLC において、COL1 ならびに COL3 遺伝子の有意な上昇が観察された。しかしながら、 α -SMA および Periostin の発現に変化は認められなかった。

一方、AngII 刺激によって、HPDLC におけ

る Thrombospondin2 (THBS2)の発現が促進した。THBS2は、歯根膜細胞の起源である歯小囊のマーカーの1つであることから、AngII刺激により、HPDLCの分化度が影響される可能性が推察された。

・歯牙再植実験モデルラットの樹立：4週齢の雄性SDラットの上顎右側第1臼歯を抜歯後、歯根の血液をPBSで洗浄し、10分間PBS中に放置した後、抜歯窩に戻した。抜歯窩への適合は十分で、動揺も認められなかったため、再植歯の固定は行わなかった。さらに1-3週間後に灌流固定の際において、再植した歯の脱落は観察されなかった。

そこで再植歯歯根膜の治癒期間について解析した結果、2週間以内に癒痕が消失することが明らかになった。したがって、本研究では、再植後7-10日で組織の観察を行うことにした。

・実験用ラットへのAngIIの応用：上記ラットの上顎右側第1臼歯を抜歯後、口腔外で、抜去歯をAngII (10 µg/mL in PBS)溶液中に10分間浸漬し、その後抜歯窩へ再植した。対照群は、抜去歯をPBS中に10分間浸漬した。術後10日目に灌流固定し、脱灰後パラフィン切片を作製した。その結果、実験群と対照群との間に顕著な差を観察することができなかった。これは、歯根表面の歯根膜細胞へのAngII刺激が不十分であったと推察された。

そこで、抜歯した後、AngIIを10 µg/mLに調整したコラーゲンを抜歯窩に注入し、そこへ再植を行った。対照群には、AngII非含有のコラーゲンのみを注入し、再植を行った。術後7日間に、同様にして試料を観察した結果、対照群では歯根膜組織中に島状の骨形成が認められたのに対し、実験群では、歯根膜組織中に同様の骨形成はほとんど観察されなかった。さらに、実験群の中には、歯根膜組織中の血管形成が促進した像も一部観察された。

以上の結果より、意図的再植時にAngIIを用いることによって、歯根膜組織の治癒が促進する可能性が示唆された。

・AngIIペプチドの未分化なヒト歯根膜細胞への影響：線維芽細胞分化：AngIIまたは、DRVY、IHPF、VYIHPF (AngIV) (それぞれ0, 10 µg/mL in PBS)にて48時間、1-11細胞株を刺激した結果、COL1, COL3, Periostinなど歯根膜線維芽細胞マーカーの発現に変化は認められなかったが、AngIV刺激によって、線維芽細胞のマーカーであるS100A4の発現が有意に上昇した。以上のことから、AngIIには、未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞分化を促進する働きはないが、AngIIからア

スパラギンおよびアスパラギン酸を除いたAngIVによって、腱/靭帯関連遺伝子 (Scleraxis, Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein (PRELP))の発現が促進する可能性が示唆された。加えて、最近の報告で、創傷治癒を促進する働きがあることが示唆されているThrombospondin1 (TSP1)の発現が、AngIIおよび他のペプチド処理によって促進したことから、AngIIを含めた一連のペプチドに、未分化な歯根膜細胞を介した歯周組織再生効果があることが推察された。

また血管形成誘導作用のあるVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)の発現には、いずれのペプチドも影響しなかった。このため、in vitroとin vivoではAngIIの作用が異なっていることが推察された。

・AngIIペプチドのHPDLCへの影響：AngIIまたは、DRVY、IHPF、VYIHPF (AngIV) (それぞれ0, 10 µg/mL in PBS)にて96時間刺激した結果、1-11細胞株への反応とは異なり、VYIHPF (AngIV)のみが、AngIIと同様にCOL1の発現を促進する傾向が観察され、それ以外のペプチドには顕著な反応が認められなかった。またVYIHPF (AngIV)によってScleraxisの発現が有意に促進した。したがって、これらAngIIペプチドは歯根膜細胞の分化段階によって、影響が異なる可能性が示唆された。

本実験より、AngIIは歯根膜細胞の線維芽細胞分化を促進し、歯周靭帯の形成を促進する可能性が示唆された。またこれまでに私たちは、AngIIは、歯根膜細胞のIL-11の発現を促進し、さらにIL-11は骨系細胞誘導を有していることを報告している。歯周組織は、骨およびセメント質の硬組織、ならびにその間を結ぶ歯根膜組織から構成されていることから、再植時の傷害された歯根膜組織のAngIIによる刺激は、理想的な治癒促進効果を持つ方法であると考えられる。

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13件)

- ① Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor-β1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. Cell Tissue Res. 査読有り

- (in press)
- ② 前田英史. 組織再生工学を応用した歯の保存治療法の開発を目指して. 日歯保存誌 55(5):301-303, 2012
 - ③ Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Hori K, Koori K, Yamamoto N, Teramatsu Y, Akamine A. Alternation of extracellular matrix remodeling and apoptosis by activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in human periodontal ligament cells. J Cell Biochem. 査読有り 113(10):3093-3103, 2012
 - ④ Yamamoto N, Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Kono K, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A. Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal ligament cells. J Clin Periodontol. 査読有り 39(6):556-564, 2012.
 - ⑤ Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Koori K, Yamamoto N, Teramatsu Y, Akamine A. A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. J Cell Physiol. 査読有り 227(5):2040-2050, 2012.
 - ⑥ Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A. Potentials of periodontal ligament stem/progenitor cell lines in regeneration studies. Oral Craniofac Tissue Eng. 査読有り 1(4):289-299, 2011.
 - ⑦ Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res. 査読有り 46(4):438-447, 2011.
 - ⑧ Wada N, Bartold PM, Gronthos S. Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells. Stem Cells Dev. 査読有り 20(4):647-659, 2011.
 - ⑨ Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Akamine A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. Stem Cell Res Ther. 査読有り 2(4):33, 2011.
 - ⑩ 前田英史, 友清淳, 郡勝明, 藤井慎介, 門野内聡, 和田尚久, 河野清美, 山本直秀, 寺松陽子, 赤峰昭文. レジンシーラーの細胞親和性について—スーパーボ

ンド根充シーラーと AH Plus との比較—日歯内療誌 査読有り 32(2):97-101, 2011.

- ⑪ Maeda H, Tomokiyo A, Koori K, Monnouchi S, Fujii S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Saito T, Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Int Endod J 査読有り 44(5):425-431, 2011.
- ⑫ Kwon SM, Kim SA, Fujii S, Maeda H, Ahn SG, Yoon JH. Transforming Growth Factor β 1 Promotes Migration of Human Periodontal Ligament Cells through Heat Shock Protein 27 Phosphorylation. Biol Pharm Bull 査読有り 34(4):486-489, 2011.
- ⑬ Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Hori K, Akamine A. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. J Dent Res 査読有り 90(2):181-185, 2011.

[学会発表] (計12件)

- ① Yamamoto et al. Roles of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor in Periodontal Ligament Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. March 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ② Koori et al. Extracellular Calcium Regulates Osteoblastic Differentiation of Undifferentiated PDL Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ③ Wada et al. Conversion of periodontal ligament cells into multipotent stem-like cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ④ Maeda et al. CaCl₂-added Resin Exerts Bioactive Effects on Periodontal Ligament Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ⑤ 長谷川大学 他. 分化能の異なるヒト歯根膜細胞クローンの単離及びキャラクター化. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑥ 祐田明香 他. CTGFが未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑦ 濱野さゆり 他. β 2アドレナリン受容体の非作動薬である Propranololがヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影

- 響. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑧ 和田尚久 他. Sema3A がヒト歯根膜細胞の幹細胞/未分化細胞誘導に及ぼす影響. 第136回日本歯科保存学会春季学術大会. 2012. 6. 28-29. 宜野湾市
- ⑨ Maeda H et al. Potency of Mechanical Load in Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells. 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2011. Nov. 11-13, 2011 Beijing International Convention Center, Beijing, China (招待)
- ⑩ 寺松陽子 他. EGF がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について. 第135回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2011. 10. 20-21. 大阪
- ⑪ Monnouchi et al. Stretched periodontal ligament cells up-regulate Interleukin-11 to regenerate osteoblastic metabolism. 59th Annual Meeting of JADR 2011. Oct 8-9, 2011. International Conference Center Hiroshima, Hiroshima
- ⑫ 門野内聡 他. ヒト歯根膜細胞への伸展刺激は Interleukin-11 の発現を促進する. 第134回日本歯科保存学会春季学術大会. 2011. 6. 9-10. 千葉

[図書] (計 5 件)

- ① 前田英史 赤峰昭文:「接着性レジンシーラーの細胞親和性 スーパーボンド根充シーラーVSリアルシール SE シーラー」日本歯内療法学会編「ENDO で臨床を大きく変えよう!」クインテッセンス出版 pp138-143.
- ② Maeda H, Wada N, Fujii S, Tomokiyo A, and Akamine A (2011) Periodontal ligament stem cells. In: Gholamrezaezhad A (ed) Stem Cells. InTech, Rijeka, Croatia, pp619-636.
- ③ Maeda H, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A (2012) INDUCTION OF BMP-2 IN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS BY CALCIUM-BASED BIOMATERIAL. In: Anja Nohe (ed) Bone Morphogenetic Proteins: New Research. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY pp187-202.
- ④ Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Akamine A (2012) Differentiation of Periodontal Stem/Progenitor Cells: Roles of TGF-beta1. In: M. A. Hayat (ed) Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 4. Springer, Heidelberg, Germany, pp51-58.

- ⑤ 前田英史 (2013):「歯肉縁下では、こんなことが起こっている!」クインテッセンス出版 「日常臨床で必ず使える! 歯内療法克服の一手」 pp36-43.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 英史 (MAEDA HIDEFUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 10284514

(2) 研究分担者

赤峰 昭文 (AKAMINE AKIFUMI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 00117053

和田 尚久 (WADA NAOHISA)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 60380466

門野内 聡 (MONNOUCHI SATOSHI)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号: 30609558

(3) 連携研究者

該当者なし