

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462972

研究課題名(和文) BMP-9を軸とした新規歯周・顎骨組織再生療法の基盤確立に向けた多面的アプローチ

研究課題名(英文) A study for establishment of new periodontal/bone regenerative therapy by using BMP-9

研究代表者

中村 利明 (Nakamura, Toshiaki)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：60381183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病により失われた歯周組織を効率的に再生させるべく、新たな歯周組織再生療法が望まれている。そこで本研究では、Bone morphogenetic protein (BMP)-9を用いた歯周組織再生療法に関する基礎的研究を行った。その結果、1. リコンビナント(rh)BMP-9はrhBMP-2と比較してヒト由来歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞様分化を強力に促進すること。2. ラット頭蓋骨欠損モデルにおいてrhBMP-9/吸収性コラーゲンスポンジ(ACS)はrhBMP-2/ACSと術後8週において同等の骨形成能を示し、かつ脂肪組織が少ない既存骨に近い骨が形成されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is an inflammatory disease resulting in tooth loss in patients. Further progress is needed in regeneration-based treatment of periodontal disease. In this study, basic research on periodontal regenerative therapy using bone morphogenetic protein (BMP)-9 was performed. As a result, (1) rhBMP-9 potently induces osteoblastic differentiation of human periodontal ligament (PDL) fibroblasts as compared with rhBMP-2. (2) rhBMP-9/ACS provided comparable new bone formation to rhBMP-2/ACS with less adipose tissues after a healing period of 8 weeks in rat calvarial critical-size defects. Further research investigating the potential of rhBMP-9 as a therapeutic agent for future oral and periodontal reconstructive procedures and medical fields is still necessary, and mechanisms underlying the effects of rhBMP-9 on periodontal/bone regeneration must be elucidated prior to clinical use in humans.

研究分野：歯周病学

キーワード：BMP-9 歯周病 骨再生 歯周組織再生 歯根膜細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は組織破壊性の慢性炎症性疾患であり、歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成される。これら失われた歯周・顎骨組織を再生させるべく現在、臨床応用されている歯周組織・顎骨再生療法は、宿主細胞に Signaling molecules を作用させるか、再生に必要な空間を維持することに主眼が置かれている。しかしながらその適応症の狭さ・技術的な難しさゆえ、多くの患者がその恩恵を受けているとは言い難い状況である。そのためさらなる適応症の拡大、効率的な組織再生を成すために Tissue engineering の3要素の観点から、①成長因子②細胞移植③Scaffoldについて様々な研究が行われている。最も臨床応用への障害が少ないと考えられる、リコンビナントタンパクを用いた成長因子の応用に関しては Scaffold と共に盛んに研究され、特に異所性骨形成能の高さから BMPs の中で早くから注目された BMP-2 は、米国において骨造成剤 (Infuse) として認可・使用されているが、ヒトにおいて mg 単位の投与量が必要で非常に高価であり、Cost effective とは言い難く、血清種や術後疼痛などの有害事象の報告も散見される。また歯周組織においては歯根の骨性癒着の懸念や、上述の理由からヒトでの臨床応用には至っていない。他の成長因子についても Breakthrough となる作用を発揮するものは見当たらない。そこで我々は近年注目を集めている BMP-9 (別名 GDF-2) に着目した。BMP-9 は TGF- $\beta$  superfamily に属する 14 の BMPs の 1 つで、マウスの肝臓から単離された物質である。肝臓でのグルコース代謝や、脂肪代謝、コリン作動性神経回路のメンテナンスなどに役割を果たしていることが知られているが、最近、間葉系幹細胞を骨芽細胞様に分化する能力が BMP-2, -7 (OP-1) と同等かそれ以上であると報告 (Curr Gene Ther. 2011;11:229-40) された。数ある BMPs の中で BMP-2 は骨形成因子のゴールドスタンダードと考えられていたが、それを超える性質を BMP-9 は提示し、他に、筋肉に損傷がある場合にのみ同部位に異所性骨形成を示すというユニークな特徴も報告 (J Bone Miner Res. 2011;26:1166-77.) されている。しかしながら、現在までの報告は、ほとんどが動物由来の細胞株 (C2C12 などの間葉系細胞株や筋由来サテライト細胞) を使用しており、また BMP-9 を強発現させた細胞株を使用している報告が多く、ヒト由来の細胞が外因性に添加された BMP-9 にどのように反応するのか、また歯周組織由来の細胞群に対する反応についてはほとんど知見が見受けられない。

### 2. 研究の目的

BMP-9 を軸として歯根膜細胞に対する作用と *in vivo* での骨組織再生への効果を解析し、BMP-9 の歯科臨床への応用の基盤を確立する

ことを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* 実験系

- ① 使用細胞: ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLFs, Lonza 社)
- ② 細胞増殖能: MTT-assay 変法 (cell counting kit-8)
- ③ 骨分化作用の解析: 骨分化培地下で BMP-2 および BMP-9 添加後、ALP の染色と活性測定、および Alizarin Red S 染色による石灰化物形成を評価
- ④ BMP 受容体・骨関連因子の遺伝子発現解析 RT-PCR 法または Real-time PCR 法
- ⑤ シグナル伝達経路の解析 Western Blot 法

#### (2) *in vivo* 実験系

- ① 実験動物: Wistar 系ラット
- ② 骨欠損: 両側頭蓋骨頂部に骨欠損 (直径 5mm) を外科的に作製

A: recombinant human BMP-9 (rhBMP-9) / 吸収性コラーゲン (ACS) 担体の骨形成効果の検討  
 吸収性コラーゲンスポンジ (ACS) のみ, 1 $\mu$ g-rhBMP-9/ACS, 5 $\mu$ g-rhBMP-9/ACS, コントロール (欠損のみ) の 4 群

B: BMP-9 (rhBMP-9) と rhBMP-2 の骨形成効果の比較検討

ACS 群, rhBMP-9/ACS (rhBMP-9 群), rhBMP-2/ACS (rhBMP-2 群), 欠損のみ (control 群) の 4 群

A および B の解析: 2 週および/または 8 週後、動物を安楽死させ実験部位を採取。 $\mu$ CT による放射線学的評価および脱灰薄切標本を作製・HE 染色後、組織学的な評価を行った

### 4. 研究成果

#### (1) *in vitro* 実験系

- ① 培養 3 日間において、BMP-2 および BMP-9 は細胞増殖能に有意な影響を与えなかった。
- ② BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激は、培養 6 日後に ALP 活性を有意に亢進させた (図 1)。また 9、15、21 日目の Alizarin Red S 染色において、BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激で有意に石灰化物形成が促進した (図 2)。

図 1

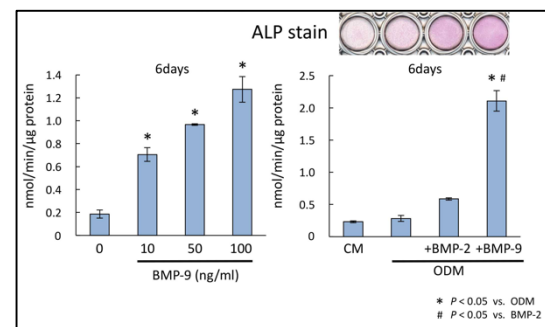
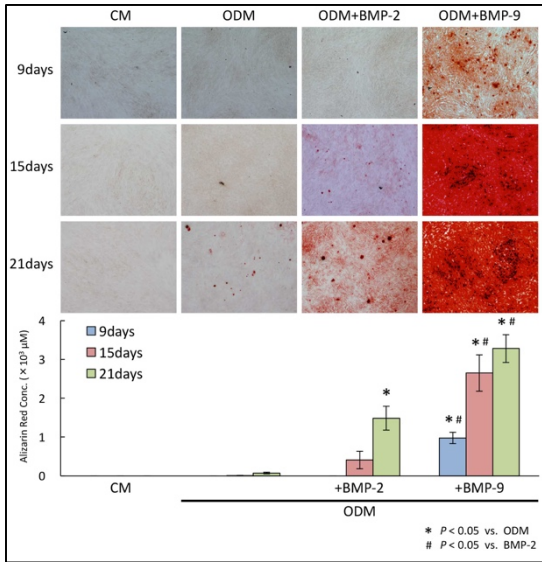


図 2



③ hPDLFs において BMP 受容体群 (ALK-1, -2, -3, -6, BMPR II, ActR II A, ActR II B, Endoglin) の遺伝子発現が認められた (図 3)。また *Runx2*, *ID-1*, *Osterix*, *Osteopontin*, *Bone sialoprotein* の遺伝子発現が control および BMP-2 刺激と比較して BMP-9 刺激で有意に上昇した (図 4)。

図 3

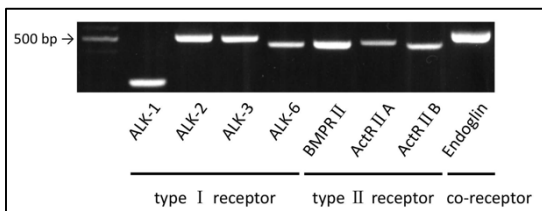
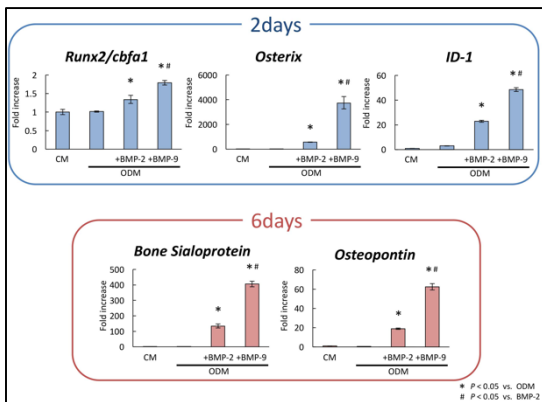
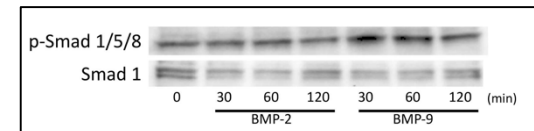


図 4



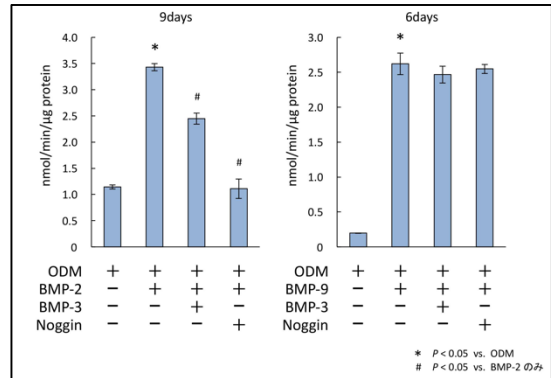
④ BMP-2 および BMP-9 刺激時ともに Smad1/5/8 のリン酸化が認められた。 (図 5)

図 5



⑤ Noggin および BMP-3 は、BMP-2 刺激によって誘導された ALP 活性を有意に減少させたが、BMP-9 刺激によって誘導された ALP 活性に有意な影響を与えなかった。 (図 6)

図 6



(2) *in vivo* 実験系

A: rhBMP-9/ACS の骨形成効果について rhBMP-9 移植群 (低濃度:1μg および高濃度:5μg の rhBMP-9/ACS, それぞれ L-rhBMP-9, H-rhBMP-9 とする)における骨形成量は ACS 群と比較し有意に高かった (図 7). 欠損閉鎖率はコントロール群, ACS 群よりも rhBMP-9 移植群の方が有意に高かった. H-rhBMP-9/ACS 群の新生骨面積及び新生骨面積率は コントロール群, ACS 群より有意に高く, 全群間で最も高かった. L および H-rhBMP-9/ACS 群では, 全ての組織形態計測項目で群間に有意差は認められなかった (図 8).

図 7

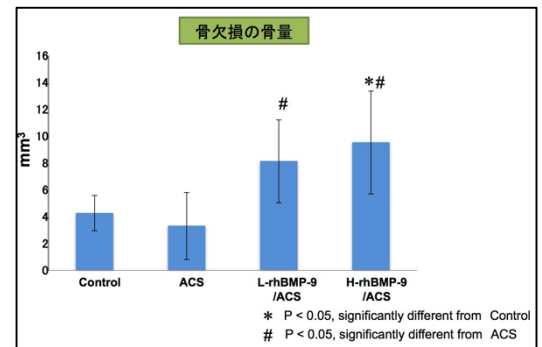


図 8

組織形態計測項目	実験群				統計学的有意差
	(1) Control N=8	(2) ACS N=8	(3) L-rhBMP-9/ACS N=8	(4) H-rhBMP-9/ACS N=8	
欠損幅 (mm)	4.99 ± 0.03	4.99 ± 0.01	4.98 ± 0.02	5.01 ± 0.03	NS
欠損閉鎖幅 (mm)	2.07 ± 0.80	2.05 ± 0.68	3.49 ± 0.87	3.50 ± 1.00	(1)(2) vs (3)(4)
欠損閉鎖率 (%)	41.49 ± 16.0	40.97 ± 13.56	70.15 ± 17.56	69.93 ± 19.95	(1)(2) vs (3)(4)
中心部組織高さ (mm)	0.28 ± 0.15	1.06 ± 0.25	1.14 ± 0.12	1.12 ± 0.15	(1) vs (2)(3)(4)
周辺部組織高さ (mm)	0.51 ± 0.12	1.10 ± 0.22	1.21 ± 0.09	21.19 ± 0.15	(1) vs (2)(3)(4)
骨欠損面積 (mm²)	4.85 ± 0.41	5.07 ± 0.18	4.99 ± 0.20	5.02 ± 0.36	NS
新生骨面積 (mm²)	1.10 ± 0.34	1.07 ± 0.38	1.75 ± 0.59	1.90 ± 0.58	(1)(2) vs (4)
新生骨面積率 (%)	22.83 ± 7.35	21.17 ± 7.35	34.88 ± 10.56	37.72 ± 10.57	(1) vs (4) (2) vs (3)(4)

B: BMP-9 (rhBMP-9) と rhBMP-2 の骨形成効果の比較検討  
骨欠損内における骨形成量 (BV) と新生骨面積率 (NBA/TA) は術後 2 週において rhBMP-2 群が

他群と比較して有意に高かった(図9, 10). 術後8週では rhBMP-9 群と rhBMP-2 群の両群間に有意な BV の差は認められなかったが control 群および ACS 群と比較して BMP 群 (rhBMP-9 群, rhBMP-2 群)は有意に高い BV を認めた(図9, 10). また ACS 群および BMP 群は control 群と比較して有意に高い欠損閉鎖率 (DC/DL)を認めた(図11). 術後8週における NBA/TA に関しては rhBMP-9 群および rhBMP-2 群の両群間に有意な差は認められなかったが, control 群および ACS 群と比較して BMP 群は有意に高かった. 新生骨内の脂肪組織面積は rhBMP-2 群では rhBMP-9 群よりも有意に高かった(図11).

図9

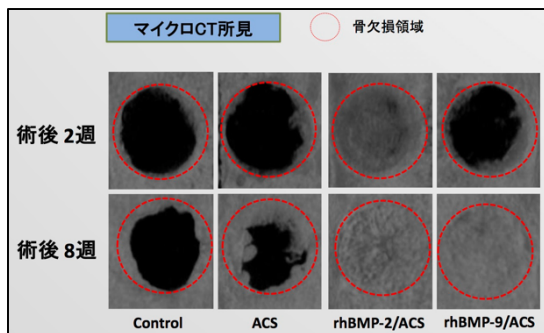


図10

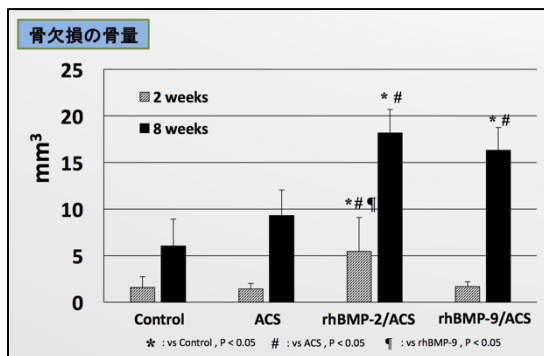
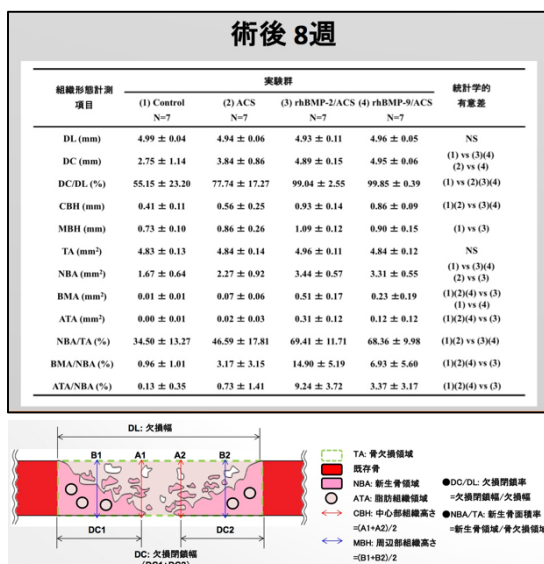


図11



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 6 件)

1) Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, Richard J. Miron, Kozue Hasegawa, Masako Fujioka-Kobayashi, Kazuyuki Noguchi. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. *Clinical Oral Investigations*. in press. (2017) DOI:10.1007/s00784-017-2069-3, 査読有り

2) Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, Richard J. Miron, Kirara Furue, Kazuyuki Noguchi. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. *Clinical Oral Investigations*. in press. (2017) DOI:10.1007/s00784-016-1963-4, 査読有り

3) Kirara Furue, Kotaro Sena, Kenji Sakoda, Toshiaki Nakamura, Kazuyuki Noguchi. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in BMP9-stimulated osteogenic differentiation and SDF-1 production in human periodontal ligament fibroblasts. *European Journal of Oral Sciences* 125(2), 119-126, 2017. DOI:10.1111/eos.12336, 査読有り

4) Yukiya Shinohara, Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Kazuyuki Noguchi. Bone healing capabilities of recombinant human bone morphogenetic protein-9 (rhBMP-9) with chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. A pilot study. *Dental Material Journal*, 35(3), 454-460, 2016. DOI:10.4012/dmj.2015-242, 査読有り

5) Sawako Fuchigami, Toshiaki Nakamura, Kirara Furue, Kotaro Sena, Yukiya Shinohara, Kazuyuki Noguchi. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potentially induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *European Journal of Oral Science*. 124(2), 151-157, 2016. DOI:10.1111/eos.12249, 査読有り

6) 中村利明. 成長因子の歯周組織再生療法への応用について. *鹿児島大学歯学部紀要*. 36 巻, 65-74, 2016. 査読無し

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 古江きらら, 瀬名浩太郎, 迫田 賢二, 中村利明, 野口 和行. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9)の歯根膜由来線維芽細胞の機能への影響. 平成 28 年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会. 2016年11月6日, 長崎県歯科医師会館(長崎県長崎市).

2) 江部由佳梨, 中村利明, 中村梢, 野口和行. IL-1 $\beta$ はヒト歯根膜由来細胞の bone morphogenetic protein-9 による骨芽細胞様分化を抑制する. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会. 2016年10月7~8日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).

3) 中村利明, 白方良典, 野口和行. ラット頭蓋骨欠損における rhBMP-9 と rhBMP-2 の骨形成効果に対する比較研究. 第 46 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会. 2016年9月16~18日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

4) 篠原敬哉, 中村利明, 白方良典, 古江きらら, 野口和行. Recombinant human bone morphogenetic protein-9/コラーゲン担体がラット頭蓋骨欠損の骨形成に及ぼす影響. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会. 2016年5月20~21日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市).

5) 篠原敬哉, 中村利明, 白方良典, 古江きらら, 野口和行. ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた recombinant human bone morphogenetic protein-9/コラーゲン担体の骨形成評価. 平成 27 年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会. 2015年11月8日, アクロス福岡(福岡県福岡市).

6) Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, Kazuyuki Noguchi. New bone formation after application of recombinant human bone morphogenetic protein-9 with chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. Europerio 8. 2015年6月3-6日, ロンドン(イギリス).

7) 篠原敬哉, 中村利明, 白方良典, 野口和行. ラット頭蓋骨欠損における recombinant human bone morphogenetic protein-9 の骨形成効果. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会. 2015年5月15-16日, 幕張メッセ(千葉県千葉市).

8) 淵上佐和子, 中村利明, 篠原敬哉, 瀬名浩太郎, 古江きらら, 野口和行. Bone morphogenetic protein-9 によるヒト歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞様分化. 平成 26 年度

日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会. 2014年11月16日, アクロス福岡(福岡県福岡市).

9) 桃寄佐和子, 中村利明, 篠原敬哉, 瀬名浩太郎, 古江きらら, 野口和行. BMP-9 はヒト歯根膜線維芽細胞の新規の骨芽細胞様分化因子である. 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会(第 140 回). 2014年6月19-20日, びわ湖ホール(滋賀県大津市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)  
鹿児島大学・歯学領域附属病院・講師  
研究者番号: 60381183

### (2) 研究分担者

白方良典 (SHIRAKATA YOSHINORI)  
鹿児島大学・歯学領域歯学系・准教授  
研究者番号: 60359982