

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670893

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーを応用した次世代型歯周組織再生治療薬のシーズ開発

研究課題名(英文) Feasible study for developing novel periodontal tissue regeneration therapies by chemical biological approaches

研究代表者

山田 聡 (YAMADA, SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、次世代型の新しい歯周組織再生治療薬のシーズを見出すことを目的として、マウス *in vivo*において歯周組織再生治療薬FGF-2による再生標準化モデルを構築するために、実験条件の比較検討を行った。さらに、*in vitro*培養細胞を用いたFGF-2機能制御分子のスクリーニング系を構築した。将来的に同スクリーニング系を組み合わせることにより、低分子化合物ライブラリ等を用いた網羅的なFGF-2機能制御因子のスクリーニング系を確立し、次世代型の歯周組織再生治療薬の開発に向けた基盤構築を行いたい。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel periodontal tissue regeneration therapies, we tried to determine the optimal experimental conditions utilizing a mouse *in vivo* FGF-2 periodontal tissue regeneration model. We also demonstrated an *in vitro* screening for FGF-2 regulated molecules. These screening approaches are anticipated useful for developing novel periodontal tissue regeneration therapies in the future.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 FGF-2 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

サイトカインを用いた歯周組織再生療法として、海外では PDGF-BB (GEM21) が使用され、国内でも近い将来、FGF-2 の臨床応用が可能となることが予想される。一方で、ゲノム創薬技術の発展により、サイトカインよりもさらに薬理効果が高く、副作用も少ない分子生物薬や低分子化合物などの次世代型薬剤開発が推進されている。サイトカイン療法の先を見据えた時、このような次世代型歯周組織再生薬のシーズ開発は喫緊の課題であると思われる。申請者は、これまでの予備実験から、マウス臼歯への絹糸結紮による実験的歯周炎モデルにおいて FGF-2 を局所投与することにより、歯周組織再生を誘導できること(マウス歯周組織再生モデル)を確立している。そこで、申請者は、同モデルを標準化し、低分子化合物ライブラリをスクリーニングすることによって、*in vivo* 生理的条件下での歯周組織再生を指標とした歯周組織再生治療薬のシーズ開発を行うという研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が考案したマウス *in vivo* において歯周組織再生効果を検証できるマウス FGF-2 再生標準化モデルを構築する。同モデルの構築により、マウスを用いた *in vivo* での歯周組織再生治療薬候補のスクリーニングが可能となることが期待される。さらに、培養細胞を用いて FGF-2 作用を制御しうる新しい分子・タンパクを探索する *in vitro* スクリーニング系を構築することで、*in vivo* および *in vitro* スクリーニング系を組み合わせた次世代型の歯周組織再生治療薬のシーズ開発への可能性を探る。

3. 研究の方法

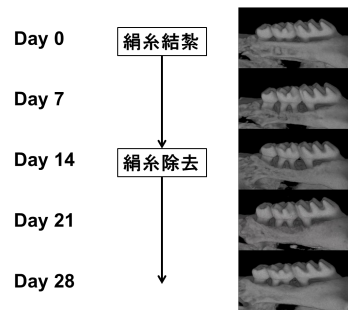
(1) FGF-2 再生標準化モデルの確立へ向けた研究

まず、8週齢の C57BL/6 雄性マウスに対して 5-0 絹糸を上顎第 2 大臼歯に結紮した。絹糸を結紮後、2 日目、4 日目、6 日目、10 日目に上顎第 2 大臼歯を含む上顎組織を採取した。同組織について実験動物用 3D マイクロ CT を用いて断層撮影を行った。得られた画像をもとに 3 次元画像解析ソフトを用いてセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を数値化することで絹糸誘導性の歯槽骨吸収量を評価した。

次に、この実験的歯周炎モデルを用いて歯周組織再生モデルを構築した。すなわち、上記の絹糸を 14 日間結紮した後、除去し、生理食塩水にて歯周組織を洗浄した。絹糸除去後、7 日目、14 日目において上顎第 2 大臼歯を含む上顎組織を採取した。同組織について実験動物用 3D マイクロ CT を用いて断層撮影を行った。得られた画像をもとに 3 次元画像解析ソフトを用いてセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を数

値化することで歯槽骨再生量を評価した(参考図 1)

マウス歯周組織再生モデル(参考図1)



FGF-2 マイクロインジェクション時期の条件選定

上記の歯周組織再生モデルを用いて、リコンビナント FGF-2 を用いた FGF-2 再生標準化モデルの確立を行った。すなわち、8 週齢の C57BL/6 雄性マウスの上顎第 2 大臼歯に絹糸を結紮し、14 日間留位した後、絹糸を除去し、生理食塩水で洗浄後、上顎第 2 大臼歯口蓋側の歯周組織に FGF-2 (0.3%) をマイクロインジェクションした。最適な FGF-2 局所投与のタイミングを評価するために、絹糸除去の直後、2 日目、3 日目の計 3 パターンにてマイクロインジェクションを行った。絹糸除去後から数えて、7 日目、14 日目において上顎第 2 大臼歯を含む上顎組織を採取した。同組織について実験動物用 3D マイクロ CT を用いて断層撮影を行った。得られた画像をもとに 3 次元画像解析ソフトを用いてセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を数値化することで FGF-2 による歯槽骨再生量についてプラセボ投与群を対照群として比較評価した。

リコンビナント FGF-2 濃度の選定

次に、局所投与するリコンビナント FGF-2 の最適な濃度を評価するために、上記において歯周組織にマイクロインジェクションするリコンビナント FGF-2 の濃度を 0.025%、0.05%、0.1% に設定し、マイクロインジェクションを行った。絹糸除去後から数えて、7 日目において上顎第 2 大臼歯を含む上顎組織を採取した。同組織について実験動物用 3D マイクロ CT を用いて断層撮影を行った。得られた画像をもとに 3 次元画像解析ソフトを用いてセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を数値化することで FGF-2 による歯槽骨再生量についてプラセボ投与群を対照群として比較評価した。

リコンビナント FGF-2 の基剤の選定

リコンビナント FGF-2 の適切な基剤を評価するために、ポリ乳酸 (PLA) あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を基剤としてリコンビナント FGF-2 を調整したものを、マイクロインジェクターに注入し、マウス歯周

組織にインジェクションした。

歯周組織再生評価時期の選定

FGF-2 歯周組織再生モデルにおいて、歯槽骨再生量を評価する時期を選定するために、絹糸除去、FGF-2 投与後、7 日目および 14 日目において上顎第 2 大臼歯を含む上顎組織を採取した。同組織について実験動物用 3D マイクロ CT を用いて断層撮影を行った。得られた画像をもとに 3 次元画像解析ソフトを用いてセメント - エナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向の距離を数値化することで FGF-2 による歯槽骨再生量についてプラセボ投与群を対照群として比較評価した。

(2) *in vitro* 培養細胞スクリーニング系の確立

FGF-2 と細胞外にて直接結合することで、FGF-2 の作用を増強するタンパクとして、PLAP-1 分子が明らかとなっている。そこで、PLAP-1 分子の発現が欠損した細胞を用いて FGF-2 の細胞表面への結合量を比較検討することにより、*in vitro* スクリーニング系の構築を試みた。PLAP-1 遺伝子を欠損した PLAP-1 ノックアウトマウスの胎生 13.5 日齢の胎児から胎児由来線維芽細胞 (PLAP-1KO MEFs) を樹立した。また、対照群として、野生型マウス (WT) から WT マウス同士を交配させることにより、WT MEFs を同様に分離し、ともに継代数 3-5 を実験に供した。

次に、回収した同上 MEFs に対してビオチン標識リコンビナント FGF-2 を 4、1 時間反応させ、洗浄後、FITC 標識アビジンを添加した。細胞表面に結合した FGF-2 量をフローサイトメーターにて解析し、対照群と比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) FGF-2 再生標準化モデルの確立へ向けた研究

FGF-2 マイクロインジェクション時期の条件

最適な FGF-2 局所投与のタイミングを評価するために、絹糸除去の直後、2 日目、3 日目の計 3 パターンにてマイクロインジェクションを行った。その歯周組織再生作用を対照群と比較検討したところ、絹糸除去直後に FGF-2 を局所投与することによって、絹糸除去後から数えて、7 日目、14 日目における歯槽骨再生量が、プラセボ投与群と比較して低値となることが明らかとなった。この結果から、局所の歯周組織の炎症状態が強い場合、FGF-2 により誘導される新生血管により炎症反応が増強されることで、歯周組織の再生過程が阻害される可能性が推測された。一方、絹糸除去後、2 日目あるいは 3 日目に FGF-2 を局所投与することで、歯周組織再生過程の阻害は回避されることが示唆される結果が得られた。

リコンビナント FGF-2 濃度の選定

局所投与するリコンビナント FGF-2 の最適な濃度を評価するために、上記において歯周組織にマイクロインジェクションするリコンビナント FGF-2 の濃度を 0.025%、0.05%、0.1% に設定し、マイクロインジェクションを行った。その結果、0.05% および 0.1% FGF-2 では、その歯槽骨再生量に差がなく、濃度 0.05% が適切であることが示唆された。

リコンビナント FGF-2 の基剤

リコンビナント FGF-2 の適切な基剤を評価するために、ポリ乳酸 (PLA) あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を基剤としてリコンビナント FGF-2 を調整したものを、マイクロインジェクターに注入し、マウス歯周組織にインジェクションした結果、PLA は粘度が高すぎるためマイクロインジェクション操作には不向きであり、FGF-2 再生標準化モデルにおいては、FGF-2 の基剤として、PBS が適切であることが明らかとなった。

歯周組織再生評価時期

FGF-2 歯周組織再生モデルにおいて、歯槽骨再生量を評価する時期を選定するために、絹糸除去、FGF-2 投与後、7 日目および 14 日目においてマイクロ CT 解析を行い、最も効果の高い再生時期について評価したところ、プラセボ対照群と比較して、同上の解析時点において歯槽骨再生量には差がないことが明らかとなり、FGF-2 による歯周組織再生量の解析は、絹糸除去後、7 日目とすることを決定した。

(2) *in vitro* 培養細胞スクリーニング系

FGF-2 と結合能を有する PLAP-1 分子を利用して、PLAP-1KO MEFs の細胞表面に結合する FGF-2 量をフローサイトメーターにて定量化し、PLAP-1 分子を発現している WT MEFs と比較検討することで、様々な分子・タンパクから FGF-2 作用制御因子をスクリーニングできる培養実験系の構築を試みた。その結果、細胞表面上に結合する FGF-2 量は、対照群である WT MEFs と比較して、PLAP-1KO MEFs では、低下していることが明らかとなった。この結果から、様々なタンパクや低分子にて前処理した MEFs を用いてビオチン標識 FGF-2 の細胞表面への結合量を比較検討することで、FGF-2 作用制御因子をスクリーニングできる可能性が示唆された。

今後は、上記の *in vivo* FGF-2 再生標準化モデルおよび *in vitro* 培養細胞スクリーニング系を組み合わせることにより、低分子化合物ライブラリやタンパク発現ベクターライブラリ、あるいは最新のゲノム編集 CRISPR/Cas9 ライブラリ等を用いた網羅的な FGF-2 機能制御因子のスクリーニング系

を確立することによって、次世代型の歯周組織再生治療薬の開発に向けた基盤構築を行って行きたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 聡 (YAMADA, Satoru)

大阪大学歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

(2) 研究分担者

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

北垣次郎太 (KITAGAKI, Jirouta)

大阪大学歯学部附属病院・助教

研究者番号：90570292