

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20491

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を利用した歯周組織再生型インプラント開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic study for development of periodontal tissue regenerative implant using mesenchymal stem cells

研究代表者

山本 竜司 (Yamamoto, Ryuji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20410053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では歯や骨の再生に関連し以下のことを明らかにした。  
 1) DSPPのスプライスバリエーションは歯髄および象牙芽細胞で異なって調節されている。2) 形成過程のエナメル質中のTGF- $\beta$ 1活性化および不活性化はMMP20およびKLK4によって行われ、組織内の移送や活性の維持にはamelogeninが必要である。3) 生理活性物質を含む脱灰骨のシートは歯槽骨を優位に増大させる。4) NGFの局所注射は糖尿病ラットのインプラント-骨接触率を改善する。5) TGF- $\beta$ 1は生理的乳歯歯根吸収の歯根周囲組織におけるRANKLおよびOPGのmRNAの発現時期に依存して破骨細胞分化の調節に密接に関与している。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the following concerning the regeneration of teeth and bones.

1) The splice variant of specific mRNAs of DSPP is regulated differently in pulp and differentiated odontoblasts. 2) TGF- $\beta$ 1 is activated or inactivated by MMP20 or KLK4 and that the amelogenin cleavage product is necessary for the in-solution mobility of TGF- $\beta$ 1, which is necessary for binding to its receptor on ameloblasts and retention of its activity. 3) Conditions using demineralized bone sheet with biologically active substances significantly augmented the height of the alveolar bone. 4) Local injection of NGF could improve implant-bone osseointegration in diabetic rats. 5) TGF- $\beta$ 1 is closely related to the regulation of both OPG induction and RANKL-mediated osteoclast differentiation, depending on the timing of the mRNA expression of RANKL and OPG factors in the root-surrounding tissues of deciduous teeth during physiological root resorption.

研究分野：生化学

キーワード：骨再生 歯科インプラント 歯周組織

## 1. 研究開始当初の背景

歯科用インプラントは歯の欠損に対する治療法の重要な選択肢の1つである。高齢化社会を迎えている日本の歯科医療において、その重要性はさらに高まっていくと考えられる。現在のインプラントの主流はオッセオインテグレーション型、すなわち結合組織を介さずインプラント体と骨が直接結合する方式である。この方式の研究ではインプラント体表面と歯槽骨の結合性に着目した課題が多い。オッセオインテグレーション型のインプラントは歯槽骨と強固な結合により固定される利点がある反面、咬合の負荷が歯槽骨に直接伝わりインプラント周囲炎や、それに伴う歯槽骨吸収などのリスクがある。通常の歯周組織では歯と歯槽骨の間に歯根膜が存在し、歯槽骨に伝わる咬合の負荷を軽減している。

これまでの研究ではオッセオインテグレーション型インプラントの表面をハイドロキシアパタイトコーティングすると骨誘導の効率が上がり、オッセオインテグレーションまでの期間が短縮でき、さらにコーティングと生理活性物質を併用することでさらなる期間短縮ができることが明らかとなっている (Ishibe et. al. 2009 Oral Surg Med Oral Pathol Oral Endod.)。また、ラットの抜去歯を即時に異所移植した場合、移植した歯の根分岐部付近から歯槽骨が形成され、新生歯槽骨と移植した歯の間に歯根膜様の軟組織が存在することも報告されている (Hosoya et. al. 2008 Bone) 。また、多孔性のハイドロキシアパタイトのディスク上でヒト歯根膜細胞を培養し、それを免疫不全マウスに移植した研究でも、多数の移植細胞由来の硬組織間に移植した歯根膜細胞由来の軟組織が認められている (Hiraga et. al. 2009 J Bone Miner Metab) 。さらに、歯胚から分取した細胞の配列を再構築し、歯周組織を含む歯牙組織の再生も成功している (Ikeda and Tsuji. 2008 Expert Opin Biol Ther) 。これらの結果より、歯根膜組織の中には石灰化細胞と、石灰化せず軟組織の状態を保てる細胞の両方の細胞に分化可能な幹細胞が存在していることが強く示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では培養実験や生体への移植実験を通して、歯や歯周組織の発生機序で明らかとなっていない部分を解明し、歯周組織再生型インプラント体開発の可能性の検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ブタ歯髄および象牙芽細胞中の象牙質シアロリタンパク質 (DSPP) のスプライスバリエーションの解析

ブタ DSPP は、象牙質シアロタンパク質 (DSP)、象牙質糖タンパク質 (DGP)、象牙質リタンパク質 (DPP) の 3 つのタンパク質から構成される。DSPP 遺伝子は 5 つのエクソンから構成されるが、ブタおよびヒトにおいては少なくとも 2 つの mRNA バリエーションが存在する。一つは DSPP 全長体をコードし (DSPP-1)、もう一つはイントロン 4 に含まれるポリ A シグナルの利用により DSP のみのバリエーションをコードする (DSPP-2) (DGP、DPP はエクソン 5 からコードされる)。ブタ切歯歯胚より歯髄先端部、本体部、象牙芽細胞の total RNA を調製し cDNA を作成した。DSPP 遺伝子の各バリエーションを特異的に増幅するプライマーを設計し、リアルタイム PCR でそれら 2 つの mRNA の発現量を調べた。

(2) ブタ幼若エナメル質中の TGF- $\beta$ 1 のオートクリン機構の解明

ブタ永久切歯エナメル器より基質形成期、移行期、成熟期に相当する領域から total RNA を調製して潜在型 TGF- 1 (Latent TGF- 1) の遺伝子発現を定量 PCR にて分析した。次に MMP-20 および KLK4 による TGF- 1 の活性化および不活性化についてヒト歯根膜由来培養細胞に対するアルカリホスファターゼ活性を測定することで評価した。さらにブタ永久大臼歯の幼若エナメル質よりアメロゲニンの分離・精製を行い、TGF- 1 に対する in vivo 相互作用を ELISA の応用とマルチアングル動的散乱法 (DLS) にて調べた。

(3) 生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生

ラットの第一臼歯を抜歯し、その近心根の抜歯窩にチタンインプラントを埋入後、他の抜歯窩を脱灰骨で被覆し、4 週間後に観察した。脱灰骨で抜歯窩を被覆したラットは被覆しなかったものと比較した。

(4) 2 型糖尿病ラットの骨新生に対する NGF の効果

2 型糖尿病モデルラット脛骨に人工的にインプラントのソケット型の骨欠損を作成し、そこにチタンインプラントを埋入した。移植後、実験群では移植部位周囲に神経成長因子 (NGF) を、対照群には生理食塩水を筋肉注射した。サンプリング 1 週前にカルセイン、2 週前にアリザリンレッドを投与し、新生骨をラベリングした。インプラント埋入 4 週後と 8 週後にラット脛骨をサンプリングし、非脱灰切片を作成後、共焦点顕微鏡でカルセイン、アリザリンレッドの蛍光観察、顕微鏡でメチレンブルー/塩基性フクシンの 2 重染色の観察を行った。

(5) 生理的乳歯歯根吸収における TGF- $\beta$ 1

## と破骨細胞分化の関係

ブタ下顎より吸収の始まっている乳切歯を抜去し、そこからタンパク質とRNAを抽出し、タンパク質中に含まれる生理活性について調べた。同様に total RNA を調整し定量 PCR にて関連遺伝子の発現状況を調べた。

### 4. 研究成果

(1) ブタ歯髄および象牙芽細胞中の象牙質シアロリタンパク質 (DSPP) のスプライスバリエーションの解析

DSPP-1 の遺伝子発現量は歯髄先端部 (PT)、歯髄本体部 (PB) では非常に低く、象牙芽細胞 (OB) で急激に上昇した。また、DSPP-2 の遺伝子発現量は歯髄本体部 (PB)、象牙芽細胞 (OB) でほぼ同じであったが、歯髄先端部 (PT) では発現が非常に低かった (図 1)。

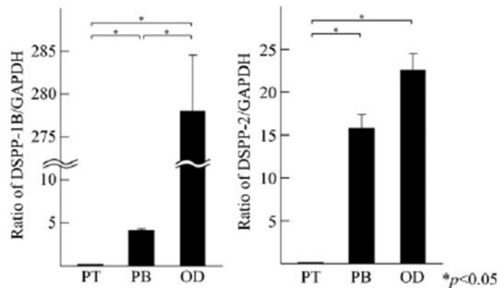


図 1

また、象牙芽細胞における 2 つの mRNA の発現量は DSPP-1 が DSPP-2 よりも有意に高かった。さらに歯髄からタンパク質を抽出・分離し、DSPP 由来タンパク質について調べた結果、DSP は認められたが DPP は検出されなかった。これらの結果は近年明らかになりつつある DSPP 由来タンパク質と歯の石灰化の関係を裏付ける結果となった。また、DSPP 遺伝子が象牙芽細胞への分化マーカーとして有用であることも示した。(雑誌論文)

(2) ブタ幼若エナメル質中の TGF-β1 のオートクリン機構の解明

エナメル質形成過程のエナメルマトリックスには transforming growth factor-1 (TGF-1) が含まれていることをタンパク質、遺伝子、活性の面から明らかにした。

また、TGF-1 は不活性な Latent TGF-1 の形で合成され、matrix metalloproteinase 20 (MMP20) によって活性化されること、活性化された TGF-1 は amelogenin と結合し活性を維持しており、TGF-1-amelogenin 複合体がエナメル芽細胞へシグナルを伝達していることを明らかにした。これらの結果より、ブタエナメル質形成過程での TGF-1 のオートクリン機構を解明した (図 2)。(雑誌論文)

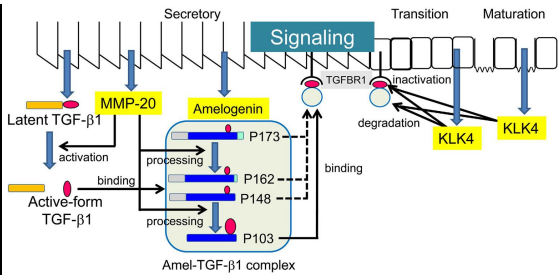


図 2

(3) 生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生

インプラント埋入のみの群 (I) と比較し、抜歯窩を脱灰骨で被覆した群 (IS+) は優位に断面の骨面積が増大した。また、脱灰骨からタンパク質成分を除去した群 (IS-) と比較しても優位に歯槽骨が増大していた。歯槽骨の増大方向は脱灰骨で被覆した方向 (Bone height) に歯槽骨が増大していた (図 3)。

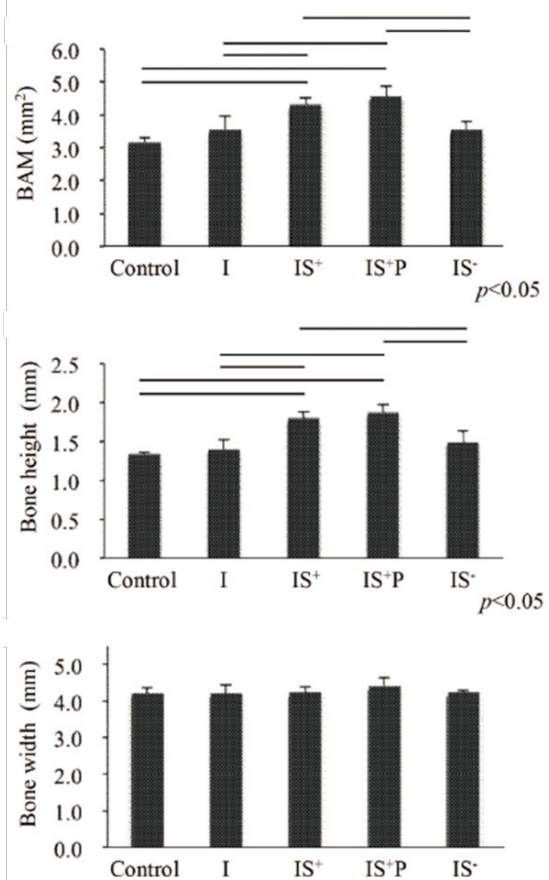


図 3

また、チタンインプラントと歯槽骨の骨インプラント接触率も被覆しなかったものに比べて高かった。このことより良好な歯槽骨の再生を促すためには脱灰骨が有効であることがわかった。特に外的骨増生には脱灰骨に含まれるタンパク質も重要な役割を果たすことが明らかとなった。(雑誌論文)

(4) 2 型糖尿病ラットの骨新生に対する NGF の効果

2 型糖尿病モデルラットへのインプラント埋入は健常ラットと比較し、術後の骨形成が遅く、Bone-to-implant contact (BIC) 値も低い傾向を示した。この 2 型糖尿病モデルラットにインプラント埋入後 NGF を投与したところ、BIC 値は健常ラットと比較して遜色のないレベルまで骨形成が回復した (図 4)。

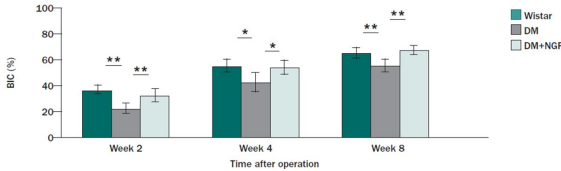


図 4 このことから NGF が 2 型糖尿病モデルラットの骨形成能を回復させる効果があることが示された。(雑誌論文)

(5) 生理的乳歯歯根吸収における TGF-β1 と破骨細胞分化の関係

乳歯の歯根周囲には TGF-β1 が生理的乳歯歯根吸収の始まる前段階から存在していることが明らかとなった。また、生理的乳歯歯根吸収時における TGF-β1 は破骨細胞分化に抑制的に働く osteoprotegerin (OPG) 促進的に働く RANKL と密接に関連して機能している可能性を示す結果が得られた (表 1)。(雑誌論文)

表 1

Root-Surrounding Tissue	Region	Non-Resorption			Resorption		
		Cervical	Center	Apical	Cervical	Center	Apical
Protein study	Collagen	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	trace
	Decorin	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	trace
	ALP activity	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑	trace
	eTRAP activity	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
In vitro study	iTRAP activity	↑	↑↑	↑	↑	trace	trace
Genetic study (mRNA level)	TGF-β1	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑
	TGF-β2	↑	↑↑	↑↑↑↑	↑	↑	↑↑
	TGF-β3	↑	↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑
	RANKL	trace	↑↑	↑	↑↑↑	↑	↑↑↑↑
	RANK	trace	↑↑	↑	↑	↑↑↑	↑↑↑↑
	TRAP	N.D	N.D	trace	↑	↑↑↑	↑↑↑↑
	CALCR	N.D	N.D	N.D	↑	↑↑↑	↑↑↑↑
	NEAT1	trace	↑↑	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑↑
	OPG	↑↑↑↑	↑↑	trace	trace	trace	trace
	RANKL/OPG ratio	1.34	63.8	157	393	5192	3092

N.D: not determined. Arrow (↑) indicates the intensity obtained in each experimental results (↑: low, ↑↑: middle, ↑↑↑: high, ↑↑↑↑: highest).

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)

Shimazaki E, Karakida T, Yamamoto R, Kobayashi S, Fukae M, Yamakoshi Y, Asada Y. TGF-β1 and Physiological Root Resorption of Deciduous Teeth. International Journal of Molecular Sciences. 査読有, 18(1), 2017, pii: E49 DOI: 10.3390/ijms18010049

Zhang J, Shirai M, Yamamoto R, Yamakoshi Y, Oida S, Ohkubo C, Zeng J. Effect of nerve growth factor on osseointegration of titanium implants

in type 2 diabetic rats. The International journal of oral & maxillofacial implants. 査読有, 31(5), 2016, 1189-1194. DOI:10.11607/jomi.4455

Shirai M, Yamamoto R, Chiba T, Komatsu K, Shimoda S, Yamakoshi Y, Oida S, Ohkubo C. Bone augmentation around a dental implant using demineralized bone sheet containing biologically active substances. Dental materials journal. 査読有, 35(3), 2016, 470-478.

DOI:http://doi.org/10.4012/dmj.2016-026

Kobayashi-Kinoshita S, Yamakoshi Y, Onuma K, Yamamoto R, Asada Y. TGF-β1 autocrine signalling and enamel matrix components. Scientific reports. 査読有, 6, 2016, 33644. DOI:10.1038/srep33644

Yamamoto R, Yamakoshi Y. Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in porcine pulp and dentin - Gene expression and function. Journal of Oral Biosciences. 査読有, 58(4), 2016, 120-127

DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2016.06.001

Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y. Dentin sialophosphoprotein-derived proteins in the dental pulp. Journal of dental research. 査読有, 94(8), 2015, 1120-1127.

DOI:10.1177/0022034515585715

[学会発表](計 9 件)

大久保水羽, 小林冴子, 山本竜司, 齊藤まり, 長野孝俊, 五味一博, 大井田新一郎, 山越康雄 プタ幼若および成熟エナメル質中の TGF-β1 アイソフォームについて 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小林冴子, 山本竜司, 大井田新一郎, 朝田芳信, 山越康雄 プタ幼若エナメル質中の TGF-β1 とエナメルタンパク質との相互作用について 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

島崎絵美, 唐木田丈夫, 山本竜司, 朝田芳信, 山越康雄 生理的乳歯歯根吸収組織の存在する TGF-β1 の発現と破骨細胞

胞の分化誘導調節について 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

白井麻衣, 山本竜司, 小松浩一郎, 下田信治, 山越康雄, 大井田新一郎 生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

野田千尋, 藤浪さをり, 山本竜司, 小林冴子, 大井田新一郎, 山越康雄 プタ幼若エナメル質中のアメロゲニン・TGF-1 複合体と TGF- 受容体との結合能について 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

唐木田丈夫, 大井田新一郎, 山本竜司, 斉藤まり, 山越康雄 プタ歯髄細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGF の影響 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

山本竜司 歯髄および象牙質中の DSPP 由来タンパク質 ~ 遺伝子発現と機能について~ 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム 2015-09-11-13 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

丹羽堯彦, 山本竜司, 山川駿二郎, 長野孝俊, 大井田新一郎, 五味一博, 山越康雄 プタ歯髄および象牙質中の TGF- 1 の存在様式について 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会 2015-09-11-13 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

斉藤まり, 唐木田丈夫, 山本竜司, 長野孝俊, 山越康雄, 五味一博, 大井田新一郎 ジルコニアおよびチタンディスク上における骨芽細胞分化の比較 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会 2015-09-11-13 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 竜司 (Yamamoto Ryuji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 20410053