

コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子とコラーゲン基剤を用いた複合剤は

水平性骨欠損における歯周組織再生を促進する

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

中村 心

Acceleration of periodontal tissue regeneration of horizontal bone defect

using collagen-binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Shin NAKAMURA

(平成 30 年 12 月 14 日受付)

緒言

歯周病は、歯周病原細菌が原因となって発症する炎症性疾患であり、重症化に伴って歯周組織の破壊が進行する¹⁾。その基本的な治療は、スケーリングやルートプレーニングによって原因となっている細菌性バイオフィルムを機械的に除去することが中心となる²⁾。進行した歯周病に対しては、歯肉を剥離し、明視下で感染源を除去する歯肉剥離搔爬術を代表とする歯周外科処置が選択される³⁾。しかし、歯周外科処置によって除去された病変部のスペースでは、歯根膜および骨髄由来の細胞と比較して歯肉上皮細胞の増殖速度が速いため、歯根面と長い上皮性の付着を形成して治癒が完了し、歯周病の再発リスクが残存する。理想的な歯周組織再生には、最小限の上皮性付着とコラーゲン線維を包含したセメント質の新生、歯槽骨の再生が必要である⁴⁾。そのため、喪失した歯周組織の再生を目的にした歯周組織再生療法が開発されてきた⁵⁻⁹⁾。現在、歯周組織再生誘導法（Guided Tissue Regeneration：GTR）、エナメルマトリックステリバティブ（Enamel Matrix Derivative：EMD）そして種々の増殖因子の応用が試みられている⁵⁻⁹⁾。

塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor：bFGF）は、歯根膜由来の線維芽細胞の増殖や骨形成を促進することが知られている^{10, 11)}。さらにbFGFは、イヌの歯槽骨欠損モデルにおいて歯周組織再生を促進することや、慢性歯周炎患者に

におけるランダム化比較試験において歯槽骨再生を促進することが報告されている¹²⁻¹⁵⁾。これらのことから、bFGF 製剤は世界初の歯周組織再生治療剤として臨床応用が開始された。

しかし、bFGF 製剤は局所組織中において、標的特異性が低く、滞留時間が短いことを課題として残しており、高用量投与や反復投与が必要となる場合、コストの増加や副作用のリスクが問題となる¹⁶⁻¹⁸⁾。歯周組織再生療法においては、歯が上皮を貫いて植立しているという口腔の解剖学的特徴から、創部が開放創になりやすく、材料や薬剤が流失しやすい特徴がある。実際に、水平性骨吸収や重度の根分岐部病変といった重症化した歯周病では、増殖因子を十分な濃度で歯周組織中に維持することが困難である。こうした解剖学的特徴に起因する問題を克服するためには、局所組織中に薬剤を滞留させることや徐放させることが重要となる¹⁹⁾。

そこで、増殖因子を歯周組織中に豊富に含まれるコラーゲンへアンカリングさせ、滞留性を持たせる薬物送達システム (Drug Delivery System : DDS) に着目した。ガス壊疽は、*Clostridium* 属細菌によって引き起こされる感染症であり、同菌が産生するコラゲナーゼによって不溶性コラーゲンが分解されて感染が拡大する。その中でも、*C. histolyticum* は 2 種類のサブタイプのコラゲナーゼを産生する^{20, 21)}。これらのコラゲナーゼの C 末端側には、コラーゲン結合ドメイン (Collagen Binding Domain : CBD)

が存在し、コラーゲンに結合して効率的に加水分解を行う²²⁻²⁶⁾。Nishi らは、この CBD と bFGF から成る融合タンパク質 (Collagen binding bFGF : CB-bFGF) を作製してマウスの皮下に注射したところ、投与局所の間質細胞の DNA 合成が投与 7 日後まで持続した²⁷⁾。さらに、CB-bFGF は整形外科領域において骨形成促進作用が報告されている²⁸⁻³²⁾。マウスの大腿骨骨折モデルに対して、コラーゲンシート^{28,29)}、コラーゲンパウダー³⁰⁾、コラーゲンゲル³¹⁾、脱灰骨³²⁾といった様々な基剤と CB-bFGF を併用すると、bFGF と比較して、有意に長管骨骨折部の骨形成を促進した。また、*Clostridium* 属細菌由来のコラゲナーゼは、デュピュイトラン拘縮の治療薬として認可されており、その一部である CBD も臨床応用において安全性が高いと考えられる^{33,34)}。

以上のことから、CB-bFGF とコラーゲン基剤を用いた複合剤を応用した新規の歯周組織再生療法の可能性を考えた。しかし、歯周組織再生療法に本複合剤を応用するには、上述したように、創部が開放創となりやすく、材料が流失しやすいという口腔の解剖学的特徴を克服する必要がある。さらに、整形外科領域における報告²⁸⁻³²⁾にある長管骨は中胚葉由来であるが、歯槽骨、歯根膜などの歯周組織は外胚葉由来である。すなわち、一般医科領域における再生療法とは発生学的に異なる背景を持つことから、本複合剤の歯科領域への適応は未だ不明である。そこで、*in vitro* 及び *in vivo* の評価系を設定し、本複合剤の有効性を検討した。

材料と方法

1. 使用動物

雄性 SD 系ラット（10-12 週齢，日本クレア株式会社，東京，日本）を使用した。室温 23 ± 1 °C，人工照明 8:00～20:00 に設定された岡山大学動物資源部門飼育施設で飼育し実験に使用した。本研究は，岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：OKU-2017054）。全ての動物実験は岡山大学動物実験規則に基づいて行い，チアラジン（10 mg/kg）及びケタミン（100 mg/kg）を用いて，最小限の侵襲で施行した。

2. 試料

bFGF は，Miltenyi Biotec（東京，日本）から購入した。*C. histolyticum* のコラゲナーゼクラス II (ColH) に由来する CBD と bFGF から成る融合タンパク質 (CB-bFGF) は，Nishi らの方法にしたがって精製した²⁷⁾。簡潔に説明すると，プラスミド (pCHC302-hbFGF) を *Escherichia coli* BL21 CodonPlus RIL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) へ導入し，Glutathione-S-Transferase (GST) との融合タンパク質として生産した。

GST 融合タンパク質は、Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア, 東京, 日本) を用いて、アフィニティ・クロマトグラフィーにより精製した。Thrombin (GE ヘルスケア) で GST タグを切断した後、Heparin Sepharose (GE ヘルスケア) を用いたアフィニティ・クロマトグラフィーにて CB-bFGF を精製した。併用するコラーゲン基剤は、ニッピ (茨城, 日本) のコラーゲンパウダー (collagen powder : CP) とコラーゲンシート (collagen sheet : CS) を用いた。

3. 細胞増殖活性の評価

歯根膜細胞は、奥村らおよび Seo らの報告を改変して培養した^{35,36}。ラットの切歯を摘出し、歯根表面に付着した歯根膜細胞を採取した。2 mg/ml コラゲナーゼタイプ I (フナコシ, 東京, 日本) と 4 mg/ml ディスパーゼ II (三光純薬, 千葉, 日本) で 60 分間、酵素処理した。酵素処理後の組織をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) pH 7.2 (Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本) で洗浄した。続いて、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Thermo Fisher Scientific) 含有イーグル最小必須培地 α 改変型 (minimum essential medium eagle, alpha modification, α MEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) へ細胞を播種し、湿度 95%, CO₂ 濃度 5%, 温度 37°C で培養した。4-5 代目まで継代し、96 ウェルプレートに 1.0×10^3 cells/well で播種し、

2% FBS 含有 α MEM 中で 5 時間培養した。1, 10, 100, そして 1,000 pM の bFGF または CB-bFGF を添加し, 72 時間後に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 熊本, 日本) を用いて, WST-8 assay を行った。

4. コラーゲン結合活性の確認

コラーゲン結合活性の評価は, Matsushita らの方法を改変して行った²²⁾。0.4 nmol の bFGF または CB-bFGF と 5 mg の CP を, 孔径 0.22 μ m の遠心式フィルターユニット (Merk, Darmstadt, Germany) 内で混和し, 4°C で 30 分反応させた。12,000 rpm で 4 分遠心し, 得られた水相をポリアクリルアミド電気泳動 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis : SDS-PAGE) で解析した。

5. コラーゲンシートにおける CB-bFGF の滞留性の評価

bFGF または CB-bFGF を 1 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 で 6 μ M に調整した。Tris(2-carboxyethyl)phosphine (和光純薬, 大阪, 日本) を添加し, 37°C で 30 分反応させた。1 mM Alexa Fluor 594 dye (Thermo Fisher Scientific) を添加し, 4°C で一晩反応させた。得られた標識タンパク質を SpinTrap column (GE ヘルスケア) に移し, 800 \times g, 4°C, 2 分遠心した。蛍光標識とコラーゲン結合活性は, ChemiDoc MP system

(BioRad Laboratories, CA, USA) を用いて、SDS-PAGE で確認した。0.58 nmol の標識した bFGF または CB-bFGF を $5 \times 5 \times 2$ mm (長さ \times 幅 \times 厚さ) の CS と反応させ、1 mL α MEM を加えた 12 ウェルプレートに静置した。0, 1, 3, 5, 10, そして 14 日後に IVIS system (IVIS Lumina, 住商ファーマインターナショナル, 東京, 日本) を用いて蛍光検出した。CS 上の蛍光反応を検出した面積を ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA) で定量した。

6. 骨欠損モデルの作製

ラットの上顎口蓋側歯肉を第一大臼歯近心から第二大臼歯遠心まで切開・剥離し、タングステンカーバイドバー (Beldenta Supply, 兵庫, 日本) で第一大臼歯近心から遠心まで口蓋側の歯槽骨を口蓋骨底部まで約 1 mm 削除した (図 1 a)。5 mg の CP に CB-bFGF を 0.58 nmol (終濃度) となるように混和し (CB-bFGF/CP), 欠損部へ填入した (図 1 b)。試料の填入量は, Saito らの報告を基に決定した³⁰⁾。対照群として, 未填入 (Control) 群, PBS/CP 群, あるいは bFGF/CP 群 (終濃度 0.58 nmol/5 mg) を設定した。最後に, 8-0 ナイロン糸 (ワシエスメディカル, 東京, 日本) で縫合し, 閉創した (図 1 c)。4, 8 週後にラットを炭酸ガスで安楽死させ, 歯周組織再生について放射線学的, 組織学的に評価した。

7. マイクロ CT 解析による骨量と骨塩量の定量

ラットの上顎骨を摘出し、4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒド溶液 (Nacalai Tesque, 京都, 日本) で4°C, 72 時間で浸漬固定した。マイクロ CT 画像は, microfocus X-ray CT imaging system (inspeXio SMX-90CT ; 島津製作所, 京都, 日本) を用いて, 管電圧 90 kV, 管電流 110 mA, ボクセルサイズ 20 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, マトリックスサイズ 1024 \times 1024 pixel の条件で撮影した。骨欠損部の解析は, 第一大臼歯と第二大臼歯の接触点から, 近心方向に 120 スライス (2.4 mm 相当) について行った。骨量と骨塩量は, 骨欠損を作製した口蓋側歯槽骨の最底辺と歯根に沿って歯冠側へ向けて引いた垂線によって囲まれた領域を既存骨と新生骨を含めて解析した (図 1 d, e の点線三角形部分)。画像解析は, Tri-3D-Bone (Ratoc System Engineering, 東京, 日本) を用いて行った。

8. 組織学的形態計測

固定後の上顎骨を 10%ギ酸を用いて 10 日間脱灰し, パラフィン包埋した。第一大臼歯近心咬頭から遠心方向に 4 μm の組織切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin : H-E) 染色と Azan 染色を行った。H-E 染色した切片は, 骨欠損作製部位と推測される明瞭な境界線を基準に, 骨基質の添加が見られ, 骨梁と骨髄を

確認できる部分を新生骨と定義して、Image Jで計測した（図 1 f, g）。Azan 染色切片では、歯面に付着した上皮組織長を計測した。それぞれの切片は、50 μm ごとに3枚作製し、その平均値を算出して定量した。

9. 免疫組織化学染色による解析

免疫組織化学染色は、アビジンビオチンペルオキシダーゼシステムを使用し、VECTASTAIN *Elite* ABC Rabbit kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて行った。キシレンによる脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼを不活化し、Trypsin (Thermo Fisher Scientific) で15分間処理して抗原賦活化を行った。正常ヤギ血清により15分間ブロッキングした後、一次抗体を添加し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体は、抗 osteocalcin 抗体 (OCN : Rabbit-poly ; BIODS, Woburn, MA, USA), 抗 proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA : Rabbit-poly ; Gene Tex, Irvine, CA, USA), 抗 osteopontin 抗体 (OPN : Rabbit-poly ; BIODS) をそれぞれ500倍, 100倍, 100倍にPBSで希釈して使用した。PBSで洗浄し、ヤギ抗ウサギのビオチン標識二次抗体をPBSで200倍に希釈して添加し、25°C, 30分反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン液を添加し、30分反応させた後、0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB ; Nacalai Tesque) を添加して発色させた。

最後に、Mayer's Hematoxylin（和光純薬）により対比染色して、光学顕微鏡（DP70 : OLYMPAS, 東京, 日本）で顕鏡し、新生歯槽骨周囲の陽性細胞数を計測した。陽性細胞数の計測は各群3匹ずつのラットから作製した組織切片を無作為に3枚選択して行った。

10. 統計解析

全ての解析データは、平均 ± 標準偏差（SD）として示した。各実験系における統計解析は、one-way analysis of variance（one-way ANOVA）を用い、さらに多重比較検定を Tukey/Kramer test で行った。2群間の差の検定には Student's *t*-test を用いた。各々の統計処理には、JMP（Ver. 9.0.2 : SAS Institute, Cary, NC, USA）を用いて検定を行い、*p* 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

結果

1. *in vitro* における CB-bFGF の性質評価

CB-bFGF と bFGF の歯根膜細胞に対する細胞増殖活性は、0~1,000 pM の範囲において同程度であった (図 2)。コラーゲン結合試験では、CB-bFGF (41.5 kDa) のバンドがコラーゲンの添加によって消失した。これによって、CB-bFGF のコラーゲン結合活性が確認された (図 3 : Lane 2 および Lane 3)。他方、bFGF (16.4 kDa) のバンドは、コラーゲンを添加しても検出された。これより bFGF は、コラーゲンに結合しないと考えられた (図 3 : Lane 4 および Lane 5)。また、bFGF および CB-bFGF の蛍光標識を確認し (図 4 : Lane 1, 2 および Lane 3, 4)、同様にコラーゲン結合活性を評価したところ、蛍光標識した CB-bFGF も同様にコラーゲン結合活性が確認された (図 4 : Lane 5-7 および Lane 8-10)。続いて、蛍光標識したタンパク質を用いて、CS 中における bFGF および CB-bFGF の滞留性を経時的に測定した (図 5 a)。bFGF の蛍光は、実験開始から 5 日後に消失した。一方、CB-bFGF の蛍光は 14 日後まで確認された。実験期間中の CB-bFGF の蛍光面積は、bFGF と比較して、有意に大きかった (図 5 b)。

2. *in vivo* モデルにおける骨量と骨塩量の変化

CB-bFGF/CP 群では、対照群と比較して骨形成の亢進が観察できた (図 6 a)。術後

4週において、CB-bFGF/CP群は、Control群と比較して、骨量と骨塩量はともに有意に増加した（図6b, c）。bFGF/CP群との比較では、骨量と骨塩量は増加する傾向にあった。一方、術後8週では、CB-bFGF/CP群において、骨量と骨塩量が対照群と比較して有意に増加し、特にbFGF/CP群との比較では、骨量、骨塩量は約1.5倍となった。

3. 組織学的形態計測による新生骨面積と上皮性付着の長さの評価

H-E染色による評価では、術後4および8週後に骨欠損作製部において新生骨が確認できた（図7a）。新生骨を定量したところ、術後4週において、bFGF/CP群及びCB-bFGF/CP群は、Control群と比較して有意に新生骨面積が増大した。術後8週において、CB-bFGF/CP群では対照群と比較して有意に新生骨面積が増大した。bFGF/CP群と比較すると、新生骨面積は1.5倍程度であった（図7c）。

Azan染色による評価では、上皮性付着の長さを評価し、Control群における全てのサンプルで上皮性組織の根尖側への侵入が認められたが、CB-bFGF/CPの填入群では、その割合は減少した。4, 8週後いずれも、CB-bFGF/CP群において、Control群と比較して上皮性付着の長さは有意に短かった（図7b, d）。

4. 骨欠損部における OCN, PCNA, OPN 陽性細胞の局在と定量

OCN 陽性細胞は, CB-bFGF/CP 群において新生骨周囲で確認された (図 8 a)。その陽性細胞数は, 4 週後において, 対照群と比較して有意に増加した。8 週後においては, 陽性細胞数は減少したが, Control 群と比較して有意に多かった (図 8 d)。PCNA 陽性細胞は, CB-bFGF/CP 群において歯根や新生骨周囲の結合組織中に明瞭に観察された (図 8 b)。その陽性細胞数は, 4 週後において, 対照群と比較して有意に増加していたが, 8 週後には減少した (図 8 e)。OPN 陽性細胞は, CB-bFGF/CP 群において新生骨周囲の結合組織中に確認された。その陽性細胞数は, 4 週後において, Control 群と比較して有意に増加した (図 8 c)。一方で, 8 週後では, 陽性細胞数は減少した (図 8 f)。

考察

bFGF は、歯周組織再生治療剤として臨床応用が実現化した。しかし、その適応症は垂直性骨欠損に限定されており、複雑な骨欠損における bFGF 製剤の適応は困難であることが現状である。本研究では、コラーゲン結合活性を付与した bFGF とコラーゲン基剤を用いた複合剤 (CB-bFGF/CP) の水平性骨欠損に対する歯周組織再生療法における有効性を検討した。

in vitro のモデルにおいて、本複合剤が歯周組織再生療法に適しているかを検討した。第一に、CB-bFGF が歯根膜細胞に対して細胞増殖活性を発揮することを示した。bFGF の刺激によって、歯根膜細胞は、増殖、遊走、分化、そして細胞外マトリックスの産生制御を行い、歯周組織再生において重要な役割を果たすことが知られている³⁷⁾。第二に、精製した CB-bFGF が CP に結合することを示した。なお、CP は操作性が良好なため、歯周組織再生療法における手術部位への填入に適した材料である。さらに、*in vitro* における bFGF のコラーゲン基剤に対する滞留性を、蛍光イメージングを用いて定量的に検証した。蛍光イメージングにおいては、定量の正確性を向上するために基剤として CS を用いた。その結果、bFGF と比較して、CB-bFGF は CS 中に長期間滞留することを明瞭に示すことができた。このことから本複合剤の有効性は、コラーゲン基剤から CB-bFGF が徐放されることによって発揮されると推測される。し

かし、本モデルにおいて、プロテアーゼ活性による分解や唾液などによる拡散は検討しておらず、*in vivo* モデルによる今後の検討が必要である。

in vitro において CB-bFGF の有効性が確認されたため、ラットの歯槽骨欠損モデルを作製し、*in vivo* での有効性を検討した。本モデルは、歯槽骨の水平性骨欠損を想定して作製した。マイクロ CT による解析と組織学的形態計測の結果、CB-bFGF/CP 群は、術後 8 週において対照群と比較して有意に歯槽骨形成を促進した。これらの結果から、CB-bFGF/CP はコラーゲン基剤とともに投与することによって歯周組織局所へ滞留し、bFGF の有効性を高める可能性が示された。一般に歯周組織再生では、上皮組織のダウングロースを抑制し、一方で歯槽骨、セメント質、そして歯根膜の新生を促進することが重要である。歯周組織再生の初期段階において、bFGF は欠損部周囲に残存する歯根膜及び歯槽骨からの間葉系幹細胞の増殖と遊走を活性化し、創傷治癒後期において、それらの幹細胞の分化を促進することが知られている³⁸⁾。本研究では、CB-bFGF 投与群で、4 および 8 週後において Control 群と比較して上皮のダウングロースが抑制された。これらの結果から、コラーゲン基剤による再生スペースの保持に加えて、CB-bFGF がコラーゲン基剤から徐放されることによって、歯周組織再生を促進する可能性が考えられる。本複合剤は、新規 DDS として、歯周組織再生療法の適応症の拡大に繋がると期待される。

さらに、免疫組織化学染色を行って、4 および 8 週における新生歯周組織形成に関与する細胞の局在とその発現の経時推移を観察した。OCN は、骨芽細胞によって分泌されるカルシウム結合性タンパク質であり、歯周組織での骨形成において重要な役割を担っており³⁹⁾、骨形成マーカーとして一般的である⁴⁰⁾。CB-bFGF/CP 投与群では、4 週後に対照群と比較して新生骨表面で発現が亢進し、8 週後においても Control 群と比較して発現が亢進した。この結果から、CB-bFGF による骨形成反応は 4 週後に亢進し、8 週後まで持続することが示された。PCNA は、DNA 複製に関与する DNA ポリメラーゼのコファクターとして作用し⁴¹⁾、細胞周期の DNA 合成期を示すマーカーである⁴²⁾。PCNA 陽性細胞は、結合組織及び歯根膜組織において観察され、その陽性細胞数は対照群と比較して 4 週後に有意に増加した。これらの陽性細胞は歯根膜や骨髄、そして骨膜組織に由来する線維芽細胞様細胞であると考えられる。CB-bFGF/CP は、歯周組織再生に寄与するこれらの細胞の増殖を亢進することが示された。OPN は、インテグリンに結合する Arg-Gly-Asp モチーフを有し、ヒドロキシアパタイトに結合する酸性リン酸化タンパク質である⁴³⁾。そのため、正常な仮骨形成や血管新生に不可欠であることが報告されている⁴⁴⁾。本研究では、OPN 陽性細胞が新生骨周囲や結合組織中に観察された。新生骨周囲の細胞は骨芽細胞や破骨細胞と推測され、これらの細胞は骨のリモデリングに関与し、結合組織中の細胞は血管新生や細胞外マトリックスの産

生に関与していると考え。以上の結果から、CB-bFGF/CPは、術後4週において、骨のリモデリングや創傷治癒を促進し、骨形成を進行させ、その結果が術後8週における骨形成の増加として示されたと考えられる。

本研究によって、bFGF複合剤と比較してCB-bFGF複合剤の水平性骨欠損における歯周組織再生に対する有効性が示された。CB-bFGF複合剤は、基剤によって歯周組織再生のスペースを確保し、CB-bFGFによって内在性の幹細胞の分化・増殖を刺激することで、理想的な歯周組織の再生を導くと考え。これは、CB-bFGFをコラーゲン基剤に結合して投与することで、局所組織中に滞留し徐放されることによって、bFGFの生理活性を持続的に発揮させたためと考え。また、基剤から徐放されたCB-bFGFが、周囲の歯槽骨、セメント質、そして細胞外マトリックスに存在するコラーゲン線維に結合し、さらに持続的に作用したことも考えられる。今後の臨床応用を目指すためには、歯周組織再生研究のスタンダードとされる中型動物を用いて本複合剤の有効性を明らかにすることと、安全性を評価するためにCB-bFGF/CPの薬物動態を明らかにすることが必要である。

結論

CB-bFGF とコラーゲン基剤から成る複合剤は、ラットの水平性骨欠損モデルにおいて、bFGF に比較して有効に歯周組織再生を促進することが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 国際環境科学講座 病原細菌学分野の松下 治教授，美間健彦先生，厚生労働省医政局経済課医療機器政策室の伊東 孝先生，北里大学医学部整形外科学単位の内田健太郎先生，香川大学総合生命科学研究センターの西 望先生，株式会社ニッピバ イオマトリックス研究所の田中啓友様，ならびに歯周病態学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態

学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- ・医療展示会 中央西日本メディカル・イノベーション (2017年3月, 岡山)
- ・第61回秋季日本歯周病学会学術大会 (2018年10月, 大阪)

参考文献

- 1) Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W.: Periodontal diseases. *Lancet.*, **366**, 1809-1820, 2005.
- 2) Heitz-Mayfield, L.J., Trombelli, L., Heitz, F., Needleman, I., Moles, D.: A systematic review of the effect of surgical debridement vs. non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodont.*, **29**, 92-102, 2002.
- 3) Deas, D.E., Moritz, A.J., Sagun, R.S, Jr., Gruwell, S.F., Powell, C.A.: Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol.* **2000.**, **71**, 128-139, 2016.
- 4) Melcher, A.H.: On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodont.*, **47**, 256-260, 1976.
- 5) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J. Clin. Periodont.*, **9**, 257-265, 1982.
- 6) Hammarström, L., Heijl, L., Gestrelus, S.: Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J. Clin. Periodont.*, **24**, 669-677, 1997.

- 7) Kinoshita, A., Oda, S., Takahashi, K., Yokota, S., Ishikawa, I.: Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. *J. Periodont.*, **68**,103-109, 1997.
- 8) Nevins, M., Giannobile, W.V., McGuire, M.K., Kao, R.T., Mellonig, J.T., Hinrichs, J.E., McAllister, B.S., Murphy, K.S., McClain, P.K., Nevins, M.L., Paquette, D.W., Han, T.J., Reddy, M.S., Lavin, P.T., Genco, R.J., Lynch, S.E.: Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J. Periodont.*, **76**, 2205-2215, 2005.
- 9) Takeda, K., Shiba, H., Mizuno, N., Hasegawa, N., Mouri, Y., Hirachi, A., Yoshino, H., Kawaguchi, H., Kurihara, H.: Brain derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng.*, **11**, 1618-1629, 2005.
- 10) Okumura, M., Okuda, T., Nakamura, T., Yajima, M.: Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 530-535, 1996.
- 11) Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibanushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., Matsumoto, T.: Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology.*, **136**, 1276-1284, 1995.

- 12) Murakami, S., Takayama, S., Kitamura, M., Shimabukuro, Kitamura, M., Nozaki, T., Terashima, A., Asano, T., Okada, H.: Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J. Periodont. Res.*, **34**, 425-430, 1999.
- 13) Murakami, S., Takayama, S., Kitamura, M., Shimabukuro, Y., Yanagi, K., Ikezawa, K., Saho, T., Nozaki, T., Okada, H.: Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J. Periodont. Res.*, **38**, 97-103, 2003.
- 14) Kitamura, M., Nakashima, K., Kowashi, Y., Fujii, T., Shimauchi, H., Sasano, T., Furuuchi, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Shibutani, T., Iwayama, Y., Takashiba, S., Kurihara, H., Ninomiya, M., Kido, J., Nagata, T., Hamachi, T., Maeda, K., Hara, Y., Izumi, Y., Hirofuji, T., Imai, E., Omae, M., Watanuki, M., Murakami, S.: Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS ONE.*, **3**: e2611, 2008.
- 15) Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., Hara, Y., Sakagami, R., Hirofuji, T., Hamachi, T., Maeda, K., Yokota, M., Kido, J., Nagata, T., Kurihara, H., Takashiba, S., Sibutani, T., Fukuda, M., Noguchi, T., Yamazaki, K., Yoshie, H., Ioroi, K., Arai, T., Nakagawa, T., Ito, K., Oda, S., Izumi, Y., Ogata, Y., Yamada, S., Shimauchi, H., Kunimatsu,

- K., Kawanami, M., Fujii, T., Furuichi, Y., Furuuchi, T., Sasano, T., Imai, E., Omae, M., Yamada, S., Watanuki, M., Murakami, S.: FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J. Dent. Res.*, **90**, 35-40, 2011.
- 16) Andreopoulos, F.M., Persaud, I.: Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials.*, **27**, 2468-2476, 2006.
- 17) Yun, Y.R., Won, J.E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J.H., Shin, U.S., Kim, H.W.: Fibroblast growth factors: biology, functions, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.*, **7**, 2010:218142, 2010.
- 18) Epstein, S.E., Fuchs, S., Zhou, Y.F., Baffour, R., Kornowski, R.: Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc. Res.*, **49**, 532-542, 2001.
- 19) Chen, F.M., Zhao, Y.M., Wu, H., Deng, Z.H., Wang, Q.T., Zhou, W., Liu, Q., Dong, G.Y., Li, K., Wu, Z.F., Jin, Y.: Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of insulin-like growth factor- I from dextran-co-gelatin microspheres. *J Control Release.*, **114**, 209-222, 2006.
- 20) Yoshihara, K., Matsushita, O., Minami, J., Okabe, A.: Cloning and nucleotide sequence analysis of the *colH* gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a

- gelatinase. *J. Bacteriol.*, **176**, 6489-6496, 1994.
- 21) Matsushita, O., Jung, C.M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y., Okabe, A.: Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. *J. Bacteriol.*, **181**, 923-933, 1999.
- 22) Matsushita, O., Jung, C.M., Minami, J., Katayama, S., Nishi, N., Okabe, A.: A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3643-3648, 1998.
- 23) Matsushita, O., Koide, T., Kobayashi, R., Nagata, K., Okabe, A.: Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 8761-8770, 2001.
- 24) Wilson, J.J., Matsushita, O., Okabe, A., Sakon, J.: A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J.*, **22**, 1743-1752, 2003.
- 25) Bauer, R., Wilson, J.J., Philominathan, S.T.L., Davis, D., Matsushita, O., Sakon, J. : Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum*. *J. Bacteriol.*, **195**, 318-327, 2013.
- 26) Bauer, R., Janowska, K., Taylor, K., Jordan, B., Gann, S., Janowski, T., Latimer, EC.,

- Matsushita, O., Sakon, J.: Structures of three polycystic kidney disease-like domains from *Clostridium histolyticum* collagenases ColG and ColH. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 565-577, 2015.
- 27) Nishi, N., Matsushita, O., Yuube, K., Miyanaka, H., Okabe, A., Wada F.: Collagen binding growth factors: Production and characterization functional fusion proteins having a collagen binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7018-7023, 1998.
- 28) Uchida, K., Matsushita, O., Naruse, K., Mima, T., Nishi, N., Hattori, S., Ogura, T., Inoue, G., Tanaka, K., Takaso, M.: Acceleration of periosteal bone formation by human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A.*, **102**, 1737-1743, 2014.
- 29) Uchida, K., Matsushita, O., Nishi, N., Inoue, G., Horikawa, K., Takaso, M.: Enhancement of periosteal bone formation by basic fibroblast-derived growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Tissue Eng Regen Med.*, **11**, 1165-1172, 2017.
- 30) Saito, W., Uchida, K., Matsushita, O., Inoue, G., Sekiguchi, H., Aikawa, J., Fujimaki, H., Takaso, M.: Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain

- from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A.*, **102**, 3049-3055, 2014.
- 31) Sekiguchi, H., Uchida, K., Inoue, G., Matsushita, O., Saito, W., Aikawa, J., Tanaka, K., Fujimaki, H., Miyagi, M., Takaso, M.: Acceleration of bone formation during fracture healing by poly(pro-hyp-gly)₁₀ and basic fibroblast growth factor containing polycystic kidney disease and collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum* collagenase. *J Biomed Mater Res A.*, **104**, 1372-1378, 2016.
- 32) Saito, W., Uchida, K., Matsushita, O., Inoue, G., Sekiguchi, H., Aikawa, J., Fujimaki, H., Takaso, M.: Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *J Orthop Surg Res.*, **10**, 59, 2015.
- 33) Badalamente, M.A., Hurst, L.C., Hentz, V.R.: Collagen as a clinical target: nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.*, **27**, 788-798, 2002.
- 34) Hurst, L.C., Badalamente, M.A., Hentz, V.R., Hotchkiss, R.N., Kaplan, F.T., Meals, R.A., Smith, T.M., Rodzvilla, J.: Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 968-979, 2009.
- 35) 奥村健仁, 菅谷勉, 加藤熙: 培養・移植した歯根膜細胞の動態と歯周組織再生の研究., 日歯周誌, **40**, 421-430, 1998.

- 36) Seo, BM, Miura, M., Gronthos, S., Bartold, PM., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, PG., Wang, CY., Shi, S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.*, **364**, 149-55, 2004.
- 37) Murakami, S.: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): What role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000.*, **56**, 188-208, 2011.
- 38) Nagayasu-Tanaka, T., Anzai, J., Takaki, S., Shiraishi, N., Terashima, A., Asano, T., Nozaki, T., Kitamura, M., Murakami, S.: Action mechanism of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the promotion of periodontal regeneration in beagle dogs. *PLoS ONE.*, **10**, e0131870, 2015.
- 39) Lian, J.B., Stein, G.S.: Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit. Rev. in Oral Biol. Med.*, **3**, 269-305, 1992.
- 40) Chen, F.M., Zhao, Y.M., Zhang, R., Jin, T., Sun, H.H., Wu, Z.F., Jin, Y.: Periodontal regeneration using novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins. *J Control Release.*, **121**, 81-90, 2007.

- 41) Strzalka, W., Ziemienowicz, A.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.*, **107**, 1127-1140, 2011.
- 42) Xlong, Y., Zhang, H., Beach, D.: D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell.*, **71**, 505-514, 1992.
- 43) O'Regan, A., Berman, J.S.: Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int. J. Exp. Pathol.*, **81**, 373-390, 2000.
- 44) Duvall, C.L., Taylor, W.R., Weiss, D., Wojtowicz, A.M., Guldberg, R.E.: Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient Mice. *J. Bone Miner. Res.*, **22**, 286-297, 2007.

図の説明

図 1. 水平性骨欠損モデルの作製

- (a) ラットの第一大臼歯口蓋側歯肉を切開，剥離し，全層弁を形成後，水平的に骨欠損を作製した。
- (b) 骨欠損作製部位に試料を填入した。
- (c) 縫合によって閉創した。

未処置側 (d) と処置側 (e) の術直後のマイクロ CT 画像を示す。骨量と骨塩量は図に示す三角形の領域内を解析した。スケールバーは 1 mm を示す。未処置側 (f) と処置側 (g) の術直後の組織像を示す。スケールバーは 500 μm を示す。

図 2. bFGF と CB-bFGF 添加時の細胞増殖活性の比較

歯根膜細胞を，96 ウェルプレートへ播種し，5 時間後に bFGF または CB-bFGF を添加した。72 時間後に WST-8 assay を行い，細胞増殖率を算出した (% of control)。

グラフは，独立した 3 回の実験の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。

図 3. コラーゲンパウダー (CP) に対する CB-bFGF の結合活性の確認

コラーゲン結合活性の検討は、CP の存在下及び非存在下で行った。M はマーカー、Lane 1 ; CP, Lane 2 ; CB-bFGF, Lane 3 ; CB-bFGF + CP, Lane 4 ; bFGF, Lane 5 ; bFGF + CP をそれぞれ示す。画像は、独立した 3 回の実験の典型例を示す。

図 4. 蛍光標識した bFGF 及び CB-bFGF のコラーゲン結合活性の確認

bFGF 及び CB-bFGF の Alexa Fluor 594 による標識を確認した (Lane 1&2; CB-bFGF, Lane 3&4 ; bFGF)。標識したタンパク質のコラーゲン結合活性を確認した (Lane 5-7 ; CB-bFGF, Lane 8-10 ; bFGF)。未反応色素はゲルの下部に位置していた。M はマーカー、画像は独立した 3 回の実験の結果を示す。

図 5. コラーゲンシート (CS) 中における bFGF と CB-bFGF の滞留性の比較

- (a) CS 中の蛍光反応について、独立した 3 回の代表的な画像を示す。
- (b) 蛍光面積について経時的に計測した結果を示す。グラフは、独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。両群の比較は、Student *t*-test を用いて検定した。* : $p < 0.05$ (bFGF 群と CB-bFGF 群の比較)

図 6. マイクロ CT による骨量と骨塩量の定量

(a) 独立した 5 例の代表的な 2D 画像を示す。白い矢印は、骨欠損作製部の最底部を示す。

グラフは骨量 (b) と骨塩量 (c) の定量解析の結果を示す。解析範囲については、図 1 d, e の点線三角形部分に示した。データは、5 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの骨量及び骨塩量の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。a : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と Control 群との比較), b : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と bFGF/CP 群との比較)

図 7. 新生骨面積と上皮性付着の長さの定量

(a) 術後 4, 8 週における独立した 5 例の代表的な H-E 染色像を示す。破線は骨欠損作製部を示し、スケールバーは、100 μm を示す。

(b) 術後 4 週における独立した 5 例の代表的な Azan 染色像を示す。白い矢印は、上皮性付着を示し、スケールバーは、100 μm を示す。

グラフは、新生骨面積 (c) と上皮性付着の長さ (d) の定量解析の結果を示す。データは、5 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの新生骨面積の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。a : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と Control 群との比較), b : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と bFGF/CP 群との

比較)

図 8. 骨欠損部における OCN, PCNA, OPN 陽性細胞の局在と定量

OCN (a), PCNA (b), OPN (c) 陽性細胞の局在について、独立した 3 例の代表的な組織切片像を示す。図中の B は新生骨、矢印は陽性細胞を示す。スケールバーは 100 μm を示す。グラフは、OCN (d), PCNA (e), OPN (f) 陽性細胞数の定量解析の結果を示す。各群 3 匹ずつのラットから作製した組織切片を無作為に 3 枚選択して行い、その平均値を示す。それぞれの陽性細胞数の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。a : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と Control 群との比較), b : $p < 0.05$ (CB-bFGF/CP 群と bFGF/CP 群との比較)

Figure 1.

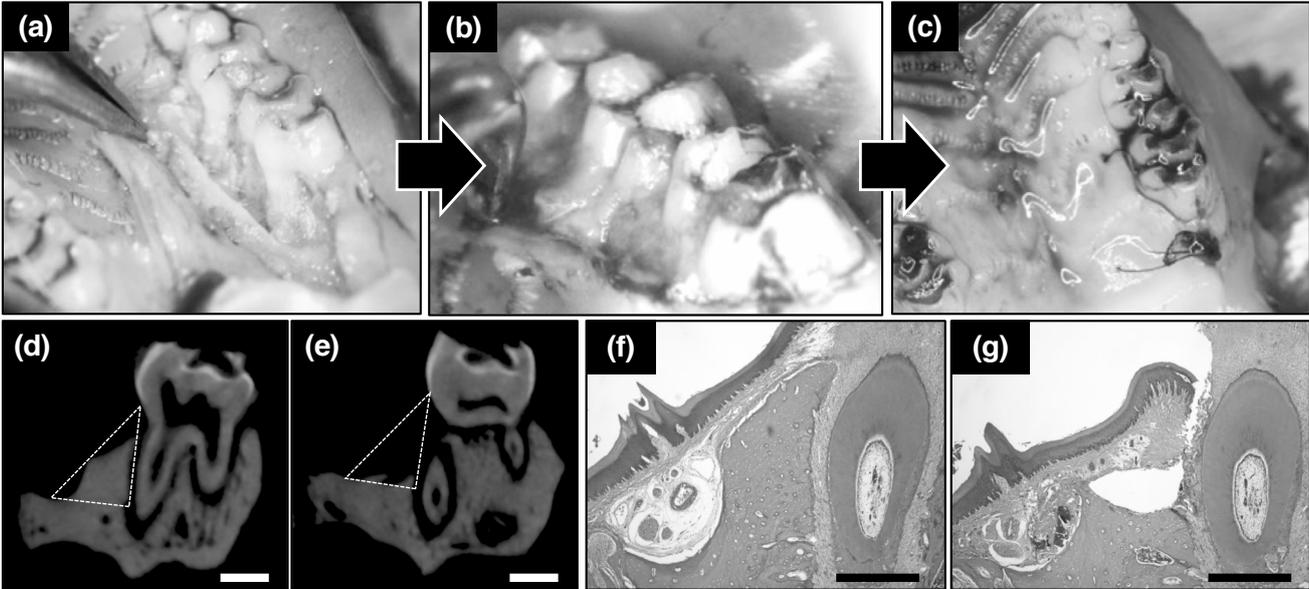


Figure 2.

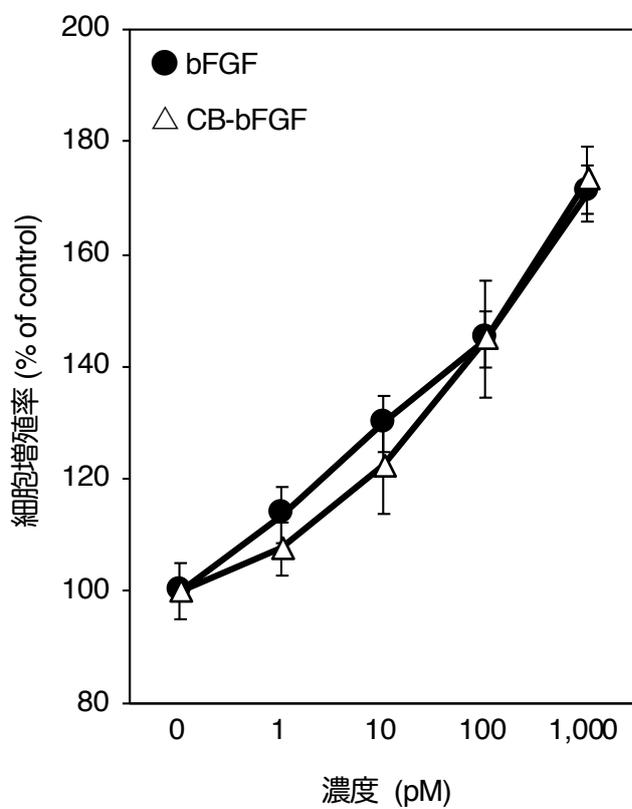


Figure 3.

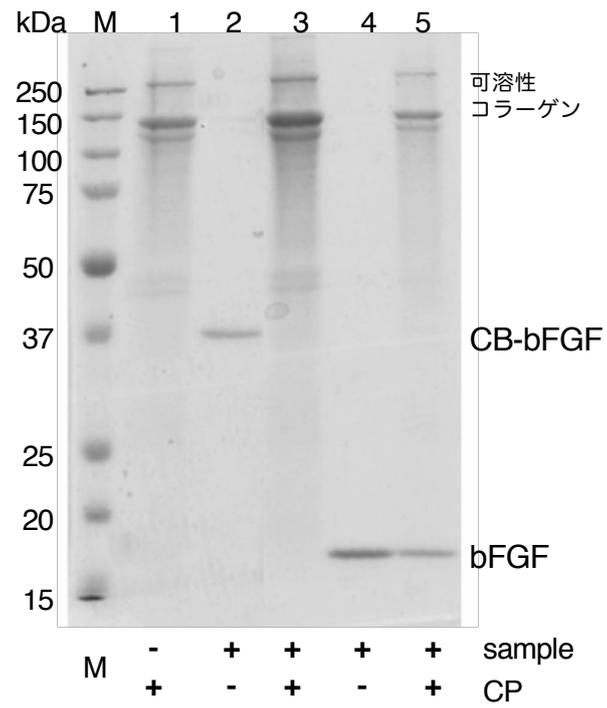


Figure 4.

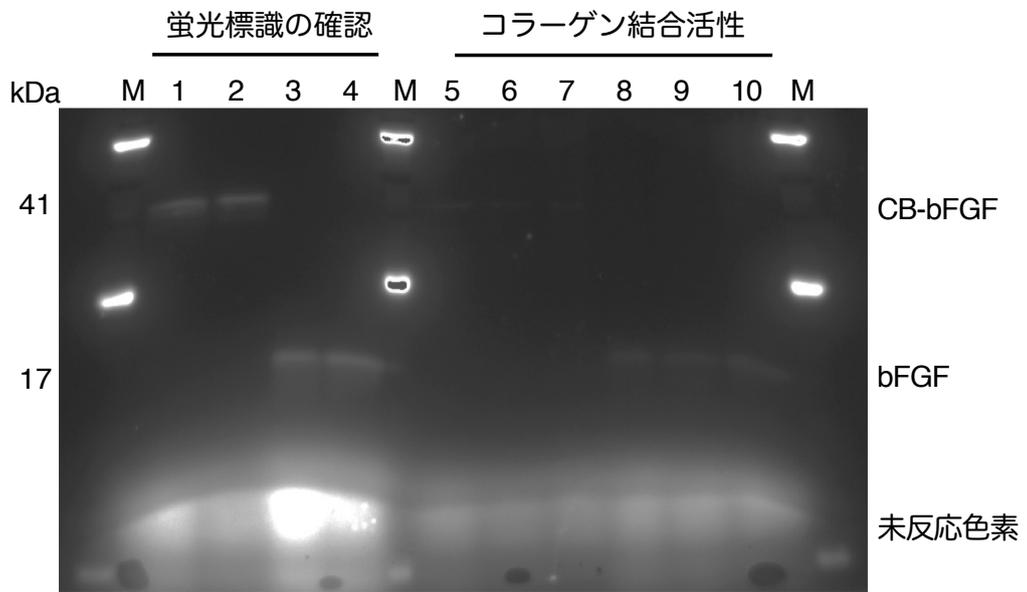


Figure 5.

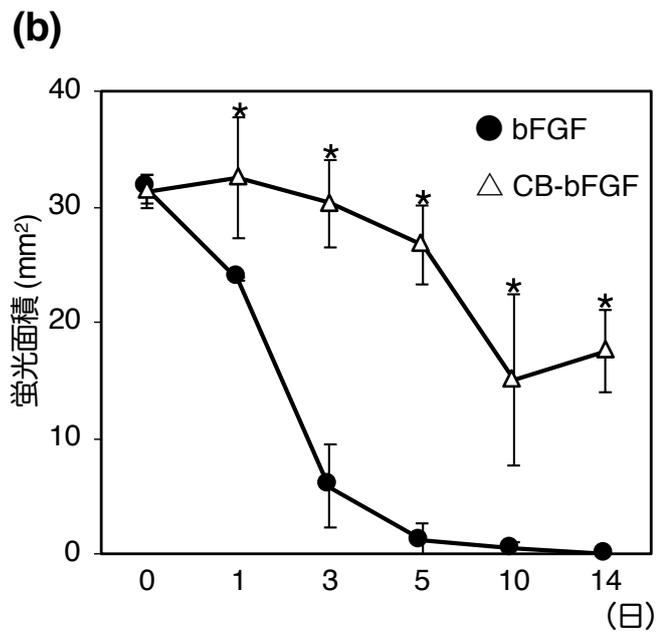
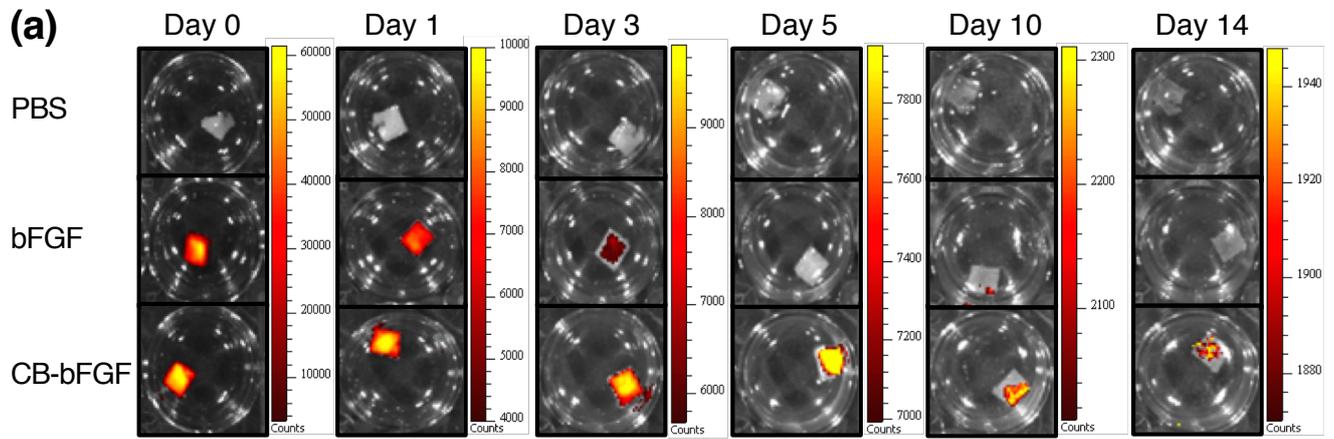


Figure 6.

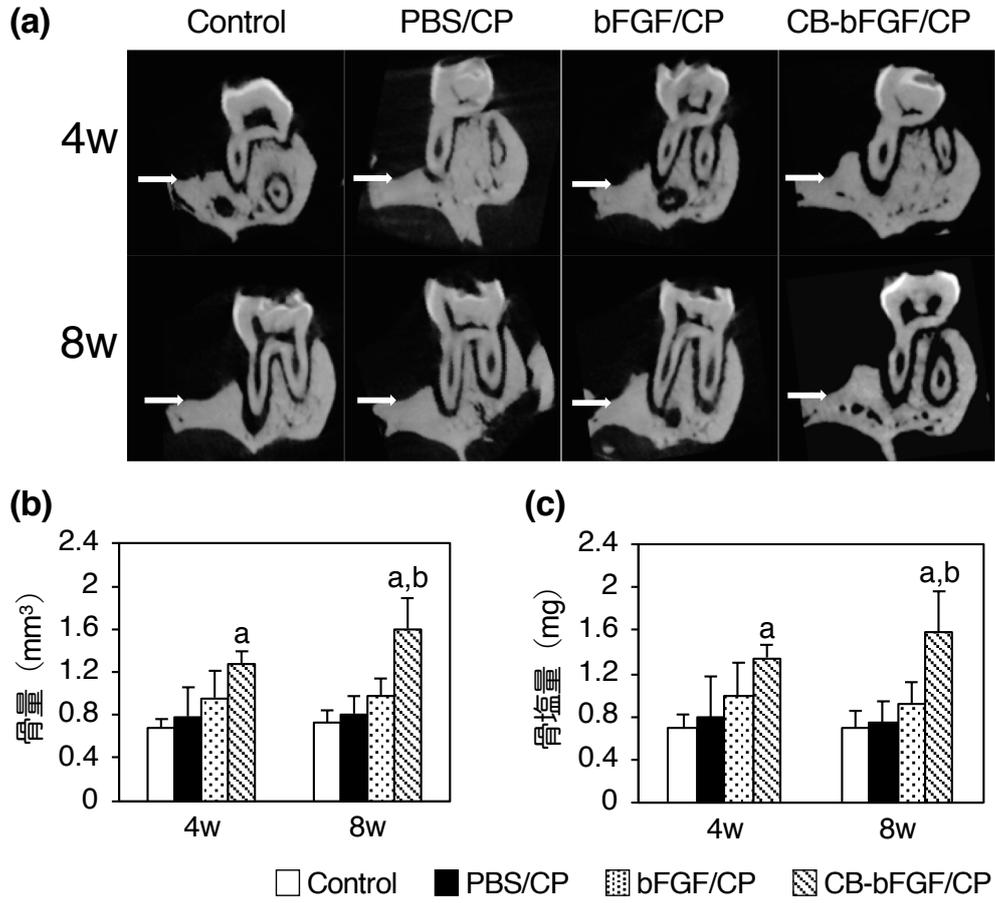


Figure 7.

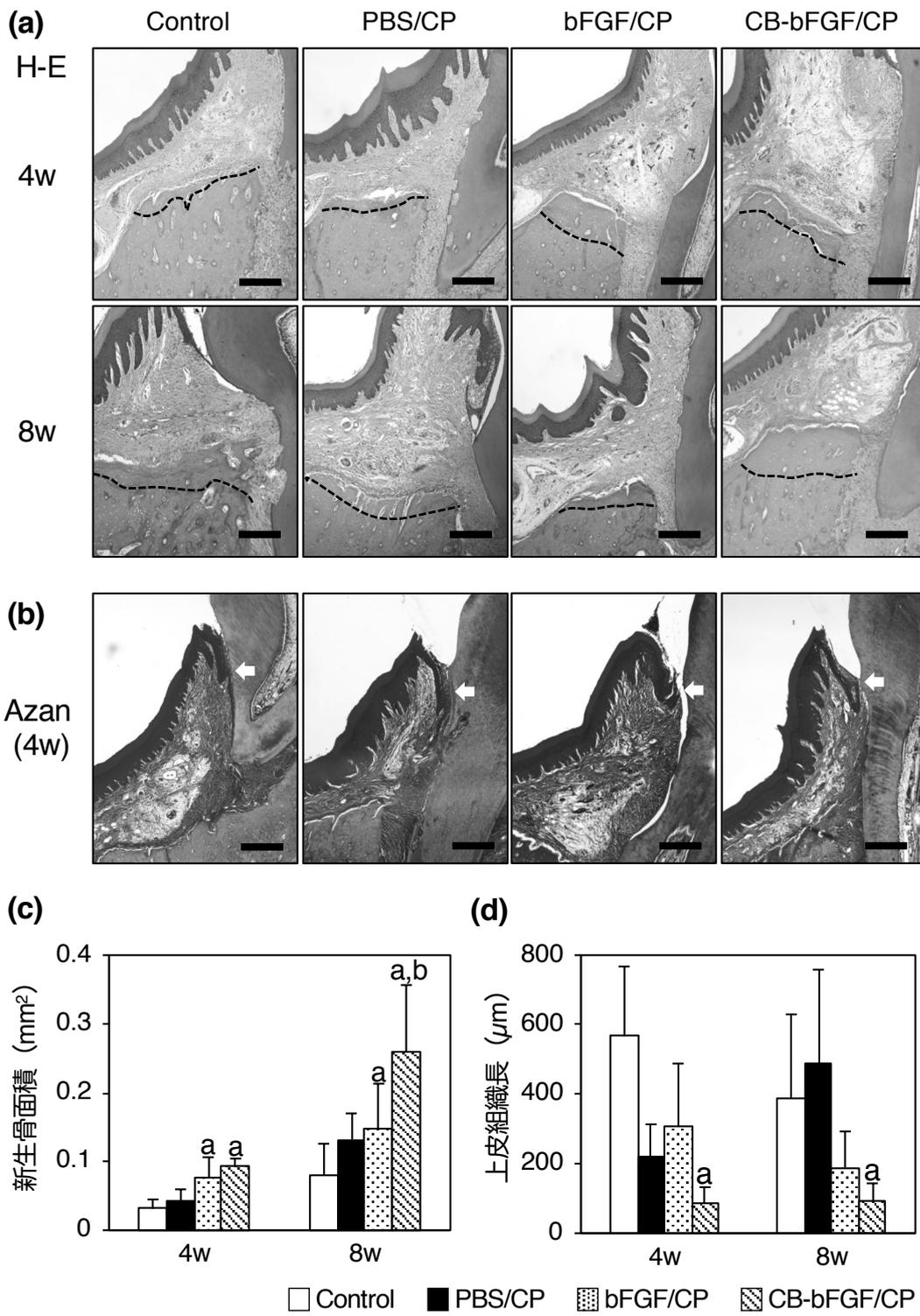


Figure 8.

