

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11806

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞と感染症への可能性のない魚コラーゲンを応用した歯髄再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of dental pulp regeneration therapy applying human dental pulp stem cells and fish collagen that has no potential for infectious diseases

研究代表者

山本 耕平 (YAMAMOTO, Kohei)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号：20756407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通感染症への可能性のない魚由来タイプ コラーゲン(fish type atelo collagen:FAC)を足場材として応用するため検討を重ねてきた。本研究では、FACの安全試験と合わせて魚由来コラーゲンの足場材としての安全性並びに有効性をイヌの歯を使って非臨床試験として評価した。ウイルス否定試験は陰性であった。エンドトキシン残量、細胞毒性、感作性、染色体異常、皮内刺激、急性全身毒性、発熱性、溶血性に関するISO規格試験も、すべて基準値以内であった。臨床等級のFACを使用したイヌの歯髄再生に関する本所見では、新生した歯髄組織に拒絶反応は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人獣共通感染症への可能性のない魚由来タイプ コラーゲン(fish type atelo collagen:FAC)を足場材として応用するため検討を重ねてきた。臨床等級のFACを使用したイヌの歯髄再生に関する本所見では、新生した歯髄組織に拒絶反応は認めなかった。

これはFACの大動物への応用の安全性と有効性を証明した最初の報告であり足場材として哺乳類由来のコラーゲンの代替材料として有用であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)： We have been studying the application of fish type I atelo collagen (FAC) as a scaffolding material, which has no possibility of zoonotic diseases. In this study, the safety and efficacy of fish-derived collagen as a scaffolding material were evaluated as a non-clinical study using canine teeth in combination with the FAC safety study.

The virus denial test was negative. The ISO standard tests for endotoxin level, cytotoxicity, sensitization, chromosomal abnormalities, intradermal irritation, acute systemic toxicity, febrile sensitivities, and hemolytic anemia were all within the standard values. Our findings on canine pulp regeneration using clinical grade FAC showed no rejection of the new pulp tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：魚由来コラーゲン 歯髄幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、エイコラーゲンの研究結果 (Bae, 2008) を参考に、熱帯産魚であるテラピアコラーゲン { (株)ニッピと共同研究中 } の物性等を検討してきた (山本ら、2011)。プロリンの水酸化率は 43% と比較的高かった。コラーゲンの変性温度は、0.5、1、2% の濃度でも、約 35-36 であった (魚の中で非常に高い)。またゲル化後は 37 程度へ上昇することも確認できた。1-2%魚コラーゲンから作製したスポンジ (PBS 緩衝液湿潤状態) は、30mN 程度の引張強度を示し、1%以下に比べて強度の増加が顕著であった。エンドトキシン残量は注射用蒸留水の安全目安規格値である 0.25 EU/ml 以下であった。魚コラーゲンは、一般に変性温度が低いため臨床への応用に制約があるとされていたが、テラピアコラーゲンは臨床への展開が期待できる (山本、2015)。「以上のように歯髄再生療法を開発する上で、ヒト歯髄幹細胞は採取時の侵襲性が低く、また魚コラーゲン足場材は人獣共通感染症の対象外であることから本研究を着想するに至った。」

### 2. 研究の目的

本研究は、人獣共通感染症の可能性のない魚コラーゲンを足場材として用い、歯髄除去後の歯髄を再生する、真に細胞生物学的な歯髄治療法の可能性を多面的に解析し、新たな歯髄再生療法の開発を図ることを目的とする。再生医療を推進する上で基礎となる組織再生工学には、細胞、成長因子、足場の 3 項目が不可欠である。歯科保存学領域において特に歯内療法分野において今回、再生医療の原理・原則を導入した。確実に早期に歯髄欠損修復を進めることは歯の延命化が可能となり臨床上、極めて重要である。

具体的な研究項目は、

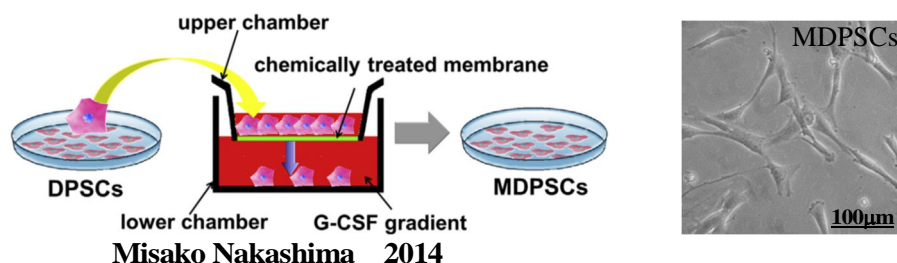
ヒト歯髄幹細胞の特性の確認

魚コラーゲンを使った足場材の有効性・安全性の証明を *in vitro*、*in vivo* の系で検証する。人獣共通感染症への可能性のない魚由来タイプ コラーゲン (fish type atelo collagen: FAC) を足場材として応用するため検討を重ねてきた。

本研究では、FAC の安全試験と合わせて魚由来コラーゲンの足場材としての安全性並びに有効性を免疫不全 SCID ラットの歯を使って非臨床試験として評価することである。

### 3. 研究の方法

(1)非臨床試験としての免疫不全 SCID ラットを使った動物実験を実施する。抜去歯は同意の得られた患者から智歯を抜去し、長寿研の作成しているプロトコールに則って、歯髄を取り出し酵素処理後、培養皿へ播種し細胞培養 (DPSCs) 後、膜分取法によって歯髄幹細胞 (MDPSCs) を採取する。培地は DMEM (10% FBS) 385  $\mu$ l に 0.385  $\mu$ l (G-CSF) の割合で混和したものを使用。



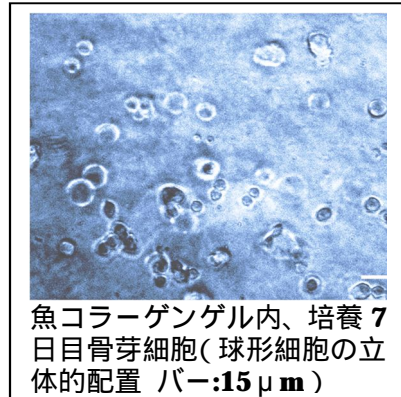
(2)ヒト歯髄幹細胞の特性確認を実施する。膜分取法にて幹細胞を採取した歯髄幹細胞は増殖させたのち、-80 で凍結保存する。解凍した歯髄幹細胞の性質を確認する。検査項目は無菌試験、細胞増殖能、フローサイトメーターを使った細胞表面マーカー (CD105、CXCR4、GCSF-R) の発現率である。

(3)象牙芽細胞への分化確認を実施する。ヒト歯髄幹細胞の歯髄細胞 (象牙芽前駆細胞) 象牙

芽細胞への分化を検討するため、幹細胞用培地で培養する（4週間まで）。マーカー遺伝子（シンデカン、ビメンチン、象牙質シアロリントタンパク質、象牙質リントタンパク質）の発現は RT-PCR で、タンパク質の発現は、Westernblot 解析にて定量化し分化の程度を検討する。

#### (4)3次元細胞培養系での硬組織形成証明

魚コラーゲンに増殖したヒト歯髄幹細胞を成長因子とともに混和後ゲル化し3次元培養（これまでの検討結果：右図参照）を行う。石灰化誘導培地で培養し、硬組織形成状況を4週間まで観察する。魚コラーゲン濃度等の培養条件を種々変化させ、最適条件を求める。石灰化状況に関してアリザリンレッドS染色を行い、早期に石灰化物形成の可能な総合的至適条件を検討・解明する。本実験系は、象牙質形成を想定したものである。なお、魚コラーゲンは、共同研究を行っている（株）ニッピから安定供給が可能である。



(5)真に除去された歯髄が再生されるのは、今回用いる幹細胞、成長因子、足場材の混和物の注入する方法を使った場合である。術式は、全身麻酔後、通法によって歯髄を除去する。解剖学的にラットの歯の根尖部は歯周組織から幹細胞の侵入が容易となるように、径 0.6mm 程度の根尖孔を作製する必要がある。その後、通法によって根管拡大・形成の後、根管洗浄、抗菌薬の根管貼薬を施し、歯冠部は厳重に仮封する。次にヒト歯髄幹細胞を歯髄腔へ注入するための準備を開始する。凍結細胞はクリーンベンチ内で成長因子 G-CSF と共に魚コラーゲン溶液中へ混和する。混和物 20μL 程度はカニューレを使い気泡が入らないようラットの歯髄腔へ注入する。最後にグラスアイオノマーセメントと接着性レジンで厳重に入口を封鎖する。すでに、急性拒絶反応への対応に関しては（株）ニッピ（担当：研究所の研究員 小倉）と共同で予備実験（魚コラーゲンのアテロ化処理時間及び使用する処理酵素の消去操作などの検討）を行い、反応が生じた場合の改善は十分可能であることを確認している。

(独)国立長寿医療研究センター 研究代表者 中島美砂子 歯髄の再生

(6)ラット臼歯根管腔を使った歯髄再生状況は、対照である牛コラーゲンと異物（急性拒絶）反応の有無、歯髄組織再生の迅速さ、注入コラーゲンの分解速度・被蓋硬組織形成状況を観察する。各条件につき臼歯を5本づつ使用する。術後2週、4週目に灌流固定ののち、処置歯を抜去し、再度固定、EDTA脱灰、脱水ののちパラフィンに包埋する。厚さ4~5μmの切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、歯髄再生の状態と炎症所見の有無を詳細に観察し、定量化する。次に、魚コラーゲンに対する宿主側（ラット）の免疫反応である急性拒絶反応（移植後1週から3か月の間に生じる）の有無は、特殊な免疫染色を行うことで解明する。この目的で、MHC Class II（異物反応に関与）、CD 68(Lysosome と関係)、Caspase 3（核断片化と関連）への抗体を用いて、陽性細胞の出現状況を検討する。なお、魚コラーゲンは組織内に移植（注入）された場合、1~2週で分解されることを確認している。

(7)しかし、非臨床試験としての免疫不全 SCID ラットを使った動物実験を実施する予定であったが予想以上の困難さがありイヌの歯による魚コラーゲンを使った足場材の有効性・安全性の

証明を in vitro、in vivo の系で検証する。

本研究で用いたティラピアの皮膚をペプシンで可溶化したものから生成された FAC は、株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所（茨城）から供与された。1.5 倍に濃縮された PBS（-）で溶解された最終濃度 0.1% の FAC を足場材として使用した。FAC に関する安全性の検査のため以下に示す 12 項目を実施した。FAC ゲルの無菌性を明らかとするために、ゲルが抽出された。ISO 規格のレベルを精査するために、0.1% FAC 溶液の生物学的研究が行われた。1.5ml の顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）と 20  $\mu$ l の FAC を添加した自家歯髄由来幹細胞（ $1.0 \times 10^5$  cells）が 2 匹のビーグル犬の抜髄された前歯の根管に移植された（n=2）（愛知医科大学承認番号 2016 5 号）。牛コラーゲンがコントロール群の足場材として使用された（n=2）。両群の歯は 30 日後に除去した。通法に従って脱灰パラフィン切片を作製した後ヘマトキシリンオレンジ染色法を施し光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検討を加えた。

#### 12 検査項目

1)細菌否定試験 2)真菌否定試験 3)マイコプラズマ否定試験 4)ウイルス否定試験 5)エンドトキシン否定試験 6)細胞毒性試験 7)感作性試験 8)染色体異常試験 9)皮内刺激試験 10)急性全身毒性試験 11)発熱性試験 12)溶血性試験

#### 4 . 研究成果

ウイルス否定試験は陰性であった。エンドトキシン残量、細胞毒性、感作性、染色体異常、皮内刺激、急性全身毒性、発熱性、溶血性に関する ISO 規格試験も、すべて基準値以内であった。臨床等級の FAC を使用したイヌの歯髄再生に関する本所見では、新生した歯髄組織に拒絶反応は認めなかった。

人獣共通感染症への可能性のない魚由来タイプ コラーゲン（fish type atelo collagen:FAC）を足場材として応用するため検討を重ねてきた。臨床等級の FAC を使用したイヌの歯髄再生に関する本所見では、新生した歯髄組織に拒絶反応は認めなかった。

これは FAC の大動物への応用の安全性と有効性を証明した最初の報告であり足場材として哺乳類由来のコラーゲンの代替材料として有用であることを示唆した。

<引用 第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会 2017 年 日本歯科保存学会 P58 >

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------