

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2006 ～2008
 課題番号：18791391
 研究課題名（和文） 架橋度勾配を有するコラーゲンを応用した歯根膜組織の再構築
 研究課題名（英文） Reconstruction of periodontal tissue using cross-linked collagen scaffold
 研究代表者
 平田 政嗣 （ HIRATA MASATSUGU ）
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
 研究者番号：70312593

研究成果の概要：

本研究では、架橋度合いの異なるコラーゲンスキャフォールドを作製しその有用性を確認すると共に、ティッシュエンジニアリング材料に組み合わせるため、自己由来の細胞として大きな可能性を有すると考えるヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞についての検討を行なった。結果、歯根膜組織を再構築することを目的としティッシュエンジニアリングに用いる自己由来細胞のソースとしてヒト智歯由来の間葉系幹細胞が有用であることが示唆され、今後、スキャフォールドとの親和性等さらに検討を行うことが必要と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・保存修復学

キーワード：ティッシュエンジニアリング

1. 研究開始当初の背景

高齢者においては根面う蝕や歯根破折が多く認められる。これに対し、歯科においては接着性レジンを用いた保存修復処置がなされている。しかし、この方法により歯牙欠損部の回復は可能となるが、う蝕、もしくは歯根破折に起因して破壊された天然歯根を取

り巻く歯周支持組織、すなわち歯根膜組織や周囲歯槽骨組織の回復には至らず、歯肉の退縮や歯牙の動揺を引き起こすこととなる。一方、現在では種々の生体材料に自己の細胞や成長因子を応用したティッシュエンジニアリングの開発が試みられている。生体材料としては、体内において分解、吸収されるコラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸

が臨床において使用され、また、エムドゲイン®や BMP をはじめとする成長因子もすでに導入されている。

細胞レベルでは、天然抜去歯から歯根膜組織や、歯肉組織を採取し歯根膜由来細胞及び歯肉線維細胞を分離、継代培養することが可能となっており、これまで当教室においてもセメント質や歯根膜組織を形成する可能性を有するとされる歯根膜由来幹細胞の分離、培養を行ってきた。

本研究ではティッシュエンジニアリング技法でのさらなる細胞の供給源として、ヒト智歯歯胚からの組織間葉系幹細胞の分離、培養を試みる。また、生体吸収材料の研究についても、これまでにポリ乳酸、ポリグリコール酸等の合成高分子材料や、天然高分子材料であるコラーゲンの歯根膜細胞との高い親和性を確認している。さらには、この高分子材料はその組成や架橋度合いをコントロールすることにより、生体内における吸収速度、さらには機械的強度を向上することが可能となっている。

これら生体材料に歯根膜由来幹細胞もしくは、ヒト智歯由来間葉系幹細胞を応用することで、歯周組織再生を可能とするティッシュエンジニアリング技法の確立を目的とする。

2. 研究の目的

近年、様々な生体材料に自己細胞および増殖・分化因子を組み合わせたティッシュエンジニアリングが開発され、その足場としてポリ乳酸やコラーゲンが用いられている。スポンジ形状のコラーゲンは加熱条件を変化させることにより、その架橋度合いを変えることが可能であり、高架橋コラーゲンは組織に炎症反応を惹起させる可能性が高く、初期の細胞付着をやや阻害し、低架橋コラーゲンは生体内での吸収速度が速く、硬組織誘導能が低いことが報告されている。このような架橋度合いを増すことで細胞初期付着を阻害せず足場としての働きを強化できる架橋度勾配を有するバイオマテリアルを開発した。

すなわち、マテリアル表層は細胞付着能を有する低架橋コラーゲンを配置し、マテリアルの骨格となる内層には高架橋コラーゲンを配置する。また、表層のコラーゲン部分に培養細胞を組み込むことで、より迅速な組織再生を可能とするバイオマテリアルの開発を

本研究の目的とする。さらにティッシュエンジニアリング材料に組み合わせるため、自己由来の細胞として大きな可能性を有すると考えるヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞についての検討を行なう。

3. 研究の方法

細胞の足場となるスキャフォールドの架橋度を段階的に変えることにより細胞の付着、増殖がどのように変化するか、その中で細胞増殖にもっとも適し、さらに足場の強度を維持することのできる架橋度合いについて検索する。また、生体応用に際し、材料自体の吸収、分解速度の検索を行う。

実験で用いる歯根膜線維芽細胞についても引き続き検索を行い、細胞培養のさらなる高効率化を追求する。さらに、架橋コラーゲンの生体内での動態を検索する。架橋度の異なるコラーゲンを実験動物の歯根窩洞に埋入し、経時的に組織観察を行い、炎症反応の程度やコラーゲンの生体への吸収等の評価を行う。

上記の実験系より、細胞の増殖と、その足場となるコラーゲンの生体内安定性を両面から評価し、ティッシュエンジニアリングに用いることのできるもっとも適切な架橋度、配合を検索する。これにより得られたコラーゲンを細胞とともに再び実験動物の歯根窩洞内に埋入し、経時的にその組織学的評価を行う予定である。また、自己由来の細胞として大きな可能性を有すると考えるヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞についての検討を行った。

4. 研究成果

まず架橋コラーゲンスキャフォールドの作製および評価を行った。架橋度の異なるコラーゲンスポンジに、歯根膜由来線維芽細胞を播種し培養を行った。マクロ的にみて、培地中の架橋(-)群のスポンジは収縮しその形態を維持していなかったのに対し、架橋(+)群のスポンジは 7 日間経過しても初期の形態を維持していた。コラーゲンスポンジを SEM で観察すると、架橋(-)群は細い線維状のコラーゲン束が密に交差しているのに対し、架橋(+)群はその線維が太く、板状を呈しており、また、その空隙のしめる割合が架橋(-)群に比較して大きかった。H-E、あるいは DAPI 染色の結果、架橋(-)

群では、細胞がスポンジの表層付近にのみ存在し、培養 3、7 日後になってスポンジの内部への進入が見られた。一方、架橋(+)群の細胞は培養 1 日後ですでにコラーゲンスポンジ内部にまで進入した像が確認された。以上のことから、架橋(+)群のコラーゲンスポンジは、培養初期に細胞のスポンジ内部への進入を可能とし、また、架橋によりその強度に優れるため、口腔内など、外部からのストレスのかかる部位において、再生の足場としての応用の可能性が示唆された。加えて架橋コラーゲンはラット顎骨中において、架橋 (-) に比較して、吸収の遅延が起こることを確認している。

次に、ティッシュエンジニアリング材料に組み合わせるため、自己由来の細胞として大きな可能性を有すると考えるヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞についての検討を行った。智歯歯胚は 8 歳から 12 歳までの矯正学的理由により抜去された埋伏智歯を使用し、実験に供することの同意を得ている。

実験には矯正学的理由により抜去された 8 歳から 12 歳までの埋伏智歯を用いた。4% パラフォルムアルデヒドにて固定し、非脱灰のまま、通法に従いパラフィン包埋ならびに凍結包埋、H-E 染色を施した。凍結切片は間葉系幹細胞に特異的に交差する抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。

(用いた抗体は、STRO-1 (MAB1038; R&D Systems, Minneapolis, MN) ならびに CD146 (MAB16985X; Chemicon International, Temecula, CA)である。)

得られたヒト智歯歯胚は、歯冠の形成途上で歯根形成は開始していなかった。組織学的には Bell Stage に相当し、象牙前質の形成がみられたが石灰化はしていなかった。エナメル芽細胞の極性化はみられたが、エナメル質はまだ形成されていなかった。歯乳頭には血管が進入しており、ヘマトキシリン好性の基質で満たされていた。象牙芽細胞が配列していたが、その下にはまだ希薄層や稠密層は形成されていなかった。STRO-1 および CD146 で染色した結果、いずれも特にエナメル芽細胞ならびに歯乳頭の血管周囲の細胞に強い発現を認めた。また、象牙芽細胞の一部にも陽性反応を認めた。これよりこれまでの歯髓あるいは歯根膜の報告と同様、形成途上の歯乳頭においても間葉系幹細胞は血管周囲の細胞に存在していることが確認された。エナメル芽細胞にも強い発現がみられたが、これまでこうした報告はなく、今後さらに検討す

る必要があると考えられた。

細胞実験系では、抜去したヒト智歯歯胚をディスプレイゼ・コラーゲナーゼ酵素下にて細胞単位まで分離回収し培養を行った。幹細胞マーカーとされる STRO-1 陽性細胞に対し、磁石抗体を応用した Dynabeads®を用い、分離回収をおこなった。全細胞にシめる間葉系幹細胞の割合は 6%であった。また、それら磁石抗体を再分離し、さらに培養を継続、細胞の増殖を確認している。さらに、抜去天然歯由来の歯根膜細胞から STRO-1 陽性細胞を分離し同様の実験を行った。その結果、回収率は 2.2%と有意に低かった。さらには歯胚由来の細胞は培養経過において ALP 活性及びタンパク量測定で歯根膜由来細胞に比べ高い値を示すことを確認した。

以上より、歯根膜組織を再構築することを目的としティッシュエンジニアリングに用いる自己由来細胞のソースとしてヒト智歯由来の間葉系幹細胞が有用であることが示唆され、今後、スキャフォールドとの親和性等さらに検討を行うことが必要と考えられた。

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 3 件)

1) D.Nishihara, M.Hirata et al, Isolation and comparison of mesenchymal stem cells derived from human wisdom tooth germs and periodontal ligament in vitro, Interface Oral Health Science, 巻項数未定, 2009, 査読有、印刷中

2) D.Nishihara, M.Hirata et al, Mesenchymal stem cells in human wisdom tooth germs, Interface Oral Health Science, 187-188,2007, 査読有

3) 岩松・小林 洋子、平田 政嗣 他
ヒト智歯歯胚における幹細胞の組織化学的検討、日歯保存誌、49(a)、2007、P174-P174、査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

1) D.Nishihara, M.Hirata et al
Isolation and comparison of mesenchymal
stem cells derived from human wisdom
tooth germs and periodontal ligament in
vitro
Interface Oral Health Science in Sendai
2009.1.15、仙台

2) 岩松-小林 洋子、西原 大輔、平田 政
嗣他、
ヒト智歯歯胚における幹細胞の組織化学的
検討、日本歯科保存学会、2006.11.9、鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 政嗣 (HIRATA MASATSUGU)
東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師
研究者番号：70312593

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□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◇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

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：