

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17133

研究課題名(和文)多細胞スフェロイド含有セメント芽細胞シートによるインプラント周囲組織の再生

研究課題名(英文)Regeneration of peri-implant tissue by multicellular spheroid-containing cementoblast cell sheet

研究代表者

佐藤 絢子(SATO, AYAKO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・医員

研究者番号：70803998

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 歯科インプラント治療は強固な顎骨内でのインプラント体の維持以外に、埋入されたインプラント体周囲の歯周組織との調和が必要である。そこで本研究では、細胞シート培養法を応用したセメント芽細胞および歯根膜細胞シートによる1)強固なインプラント体結合の誘導および2)シートからのインプラント周囲歯周組織の再生を試みた。さらに、調和の取れたインプラント周囲組織を獲得するために、3)DNA/Protamineを利用した骨再生誘導を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞シートの応用によるセメント芽細胞とインプラント体とのインテグレーション誘導およびDNA/Protamineスキャフォールドを利用した骨再生の誘導により、新たなインプラント周囲組織の再生方法を検討した。セメント芽細胞を基盤とした歯周組織様の構造を再現することでインプラント周囲に生体と調和のとれた周囲組織再生の可能性が示された。また、セメント芽細胞シートを応用することで歯周組織の再生など、他分野への応用も可能と考えられる。

研究成果の概要(英文): Dental implant therapy must prompt to recover the harmonious structure in the periodontal tissue, through a direct functional connection between ordered, living bone and the surface of a load-carrying implant. In culture experiment, cell sheet-based regenerative techniques, using human periodontal ligament stem cells (HPLSC), were applied to facilitate a cementum-coating on the implant body and a favorable regeneration of periodontal ligament cells which can connect with surface of both regenerative cementum and alveolar bones. Furthermore, I examined that DNA/protamine-based scaffolds enhanced regeneration of vertical alveolar bone defects of the dog mandible. From these findings, I suggest that the HPLSC sheets may be one of the most promised techniques for harmonious regeneration of the periodontal complex including the implant body.

研究分野：補綴

キーワード：インプラント 再生 細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、齲蝕や歯周病、歯根膜破折などで歯を喪失し咀嚼障害が生じた場合、歯科インプラントを利用し咬合機能の回復を行うことが可能となった。歯科インプラントは歯槽骨に直接的に結合することで生体内に維持されている。天然歯と異なり、歯根膜を介さないため、咬合力に対する緩衝機能、感知機能は回復されていない。より生体に調和した構造物にするためには、インプラント体と歯周組織の複合体形成による再生が望まれている。

これまでに天然歯に対して歯周組織を再生させる研究は行われてきたがインプラント周囲に歯周組織を再生させる研究はまだ少ない。実際の臨床的応用には、再生療法に使用する細胞の選択が重要である。とくに、生体に対して低侵襲で歯周組織の再生に関与する完成歯の歯根膜から得られる歯根膜由来幹細胞 (PDLSC) に着目した。歯根膜幹細胞は比較的容易に採取可能な細胞であり、歯周組織の構成成分である線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞への分化能を有する。インプラント治療前に必須となる抜歯で得られるというメリットもある。

失われた歯および歯周組織を再生するためにインプラント体を介して“調和のとれた歯周組織複合体”を形成する必要がある。調和のとれた歯周組織複合体により患者の“歯科 QOL”の向上が可能となる。

2. 研究の目的

インプラント体を埋入して調和のとれた歯周組織複合体の再生を目的とする。具体的には、歯周組織の構成成分であるセメント質と歯根膜、歯槽骨とインプラント体との連続的かつ機能を保持した相互作用を付与させる。そのために、インプラント体に osseointegration のような結合を付与すること、周囲組織とインプラント体の調和により歯周組織複合体の形成 (天然歯と類似した歯周組織の再生) が必要である。本研究では、これらのことを実現するためのソースとして PDLSC 細胞シートを利用し、インプラント体にセメント質を付与し、osseointegration 様の結合を獲得させ、次に足場材 (スキャフォールド材) を利用して、インプラント体周囲の歯周組織の良好な修復および再生を促す。以上のことから、インプラント体側 () および歯周組織側 () の多次元的なインプラントを含むハイブリッド型歯周組織複合体の作製を試みた。

3. 研究の方法

in vitro 研究

1) PDLSC シートの作製

温度応答性培養皿を用いて PDLSC の培養を行う。再現性のある細胞シートの作製法を確立するために使用する培養ディッシュを検討し、歯根膜由来幹細胞の播種密度や培養ディッシュへのコーティング方法の検討および細胞シートの回収が可能となる培養期間、回収する際の温度、時間に関して検証を行う。

2) セメント芽細胞シートの作製

温度応答性培養皿を用いて PDLSC の分化誘導を行う。分化誘導方法としては、 β -Glyceophosphate、Dexamethasone、アスコルビン酸およびプラスミノゲン阻害薬 (rhPAI-1) を使用する。セメント芽細胞の分化に関しては、分化マーカー (CEMP-1, CAP) による遺伝子・タンパク発現にて評価を行う。その後、セメント芽細胞シートをチタンプレートに播種し、免疫細胞化学的に cementintegration を評価する。

3) PDLSC を用いて歯周組織様構造を誘導する。

歯周組織様複合体を作製する。骨分化誘導については、 β -Glyceophosphate、Dexamethasone、およびアスコルビン酸を添加し、歯根膜への分化誘導に関しては、インスリン成長因子 (IGF-1) を添加し、分化誘導を行う。評価として、分化マーカー (osterix, periostin, CD31 など) を使用し、PCR、WB および免疫細胞染色による解析を行う。

4) 歯周組織様複合体シート作製・播種

上記の 3) で作製した歯周組織様細胞を 2) のセメント芽細胞シート上に播種し、複合体シート作製する。複合体シートより凍結組織標本作製し、免疫細胞化学的に組織構造の評価を行う。単層および積層の細胞シートの作製は、歯根膜由来幹細胞を用い、細胞シートの積層を行う。積層方法を確立させるため、温度応答性細胞培養ディッシュの冷却時間や積層時の細胞シート同士の接着に必要な時間を検証する。細胞シートの積層が可能となったため、上記 2) で分化誘導を行った細胞シートの積層を行い、組織標本作製し、組織学的評価を行う。

5) チタンプレートを作製し、上記で作製した細胞シートとチタンプレートのインテグレーションの検討を行う。

in vivo 研究

1) 歯周組織複合体インプラントの埋入

in vitro の検証を基に、この複合体インプラントが生体内で機能するかどうか in vivo においてラット脛骨を使用し、歯周組織複合体を付与したインプラント体を埋入する。さらに、インプラント含有歯周組織複合体が生体とマッチするそして、歯周組織複合体の再生・修復の効果を明らかにする。経日的にサンプリングを行い、以下の項目を明らかにする。

マイクロ CT による埋入部の治癒状態の評価を行う。

組織標本作製して組織学的な検索を行う。

インテグレーションの強度を評価する。

本実験で作製した歯周組織複合体インプラントの結合強度をインプラント除去トルク値にて測定し、評価を行う。対照群として従来の osseointegration インプラント体を使用する。さらに、インプラント体を含む歯周組織複合体の調和を整える足場確保のために、scaffoldの研究も行う。

2) DP 複合体の開発およびビーグル犬・垂直型欠損モデルへの埋入実験

ビーグル犬の下顎前臼歯部を抜歯し、抜歯窩の治癒を確認後に 2 壁性の骨欠損 (5 × 7mm) を作製する。骨欠損に DNA および Protamine を使用して作製した scaffold を補填し、骨形成数の効果を明らかとする。経日的にサンプリングを行い、以下の項目を明らかにする。

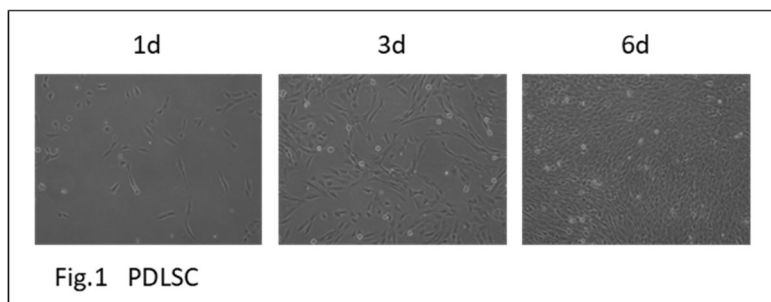
デンタルエックス線画像およびマイクロ CT による埋入部の骨硬化状態の評価を行う。

組織標本を作製して組織学的な検索を行う。

4. 研究成果

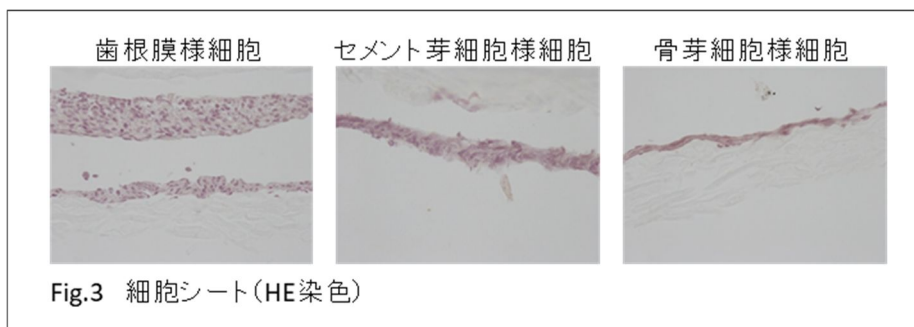
1) 単層細胞シートの作製

温度応答性細胞培養皿に PDLSC を播種し、細胞シートを作製した。適切な細胞数、培養日数の検討を行った。検討の結果、細胞を播種する前に前処理としてゼラチンコートまたはコラーゲンコート処理が推奨されると考えられた (Fig.1)。



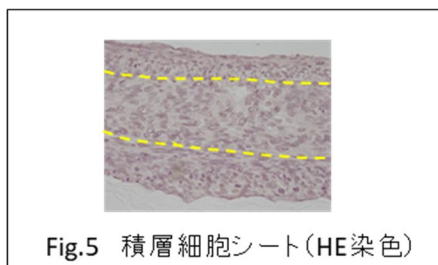
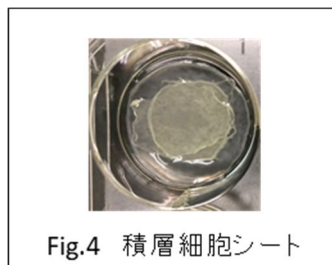
PDLSC を 10mM β -glycerophosphate, 100nM dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbic acid を用いて骨分化誘導を行った。また、上記の骨分化誘導因子に加え、プラスミノゲン阻害薬 (rhPAI-1) を用いてセメント分化誘導を行った。単層の歯根膜由来幹細胞シートおよび各種細胞シートの作製が可能となった。

経日的に観察を行い、温度応答性細胞培養皿 37 から 20 に冷却し、各種細胞シートは細胞シート回収用支持体を用いて回収した (Fig.2)。それぞれ組織標本を作製し、HE 染色および免疫組織染色を行い、組織的分析を行ったところ、組織構造に違いが見られた。歯根膜様細胞シートではその他の細胞シート細胞と比較して核がやや扁平な構造であることが確認できた (Fig.3)。



2) 積層細胞シートの作製

上記と同様に各種細胞シートの作製を行った。分化誘導 1, 2 および 3 週において温度応答性細胞培養皿 37 から 20 に冷却し、各種細胞シートは細胞シート回収用支持体を用いて回収した。分化誘導の異なる細胞シートを積層させ、培養した。その後、再び細胞シート回収用支持体を用いて積層した細胞シート回収した。それぞれ組織標本を作製し、HE 染色および免疫組織染色を行い、組織的分析を行った (Fig.4,5)。



3) チタンプレートへの cementintegration の獲得

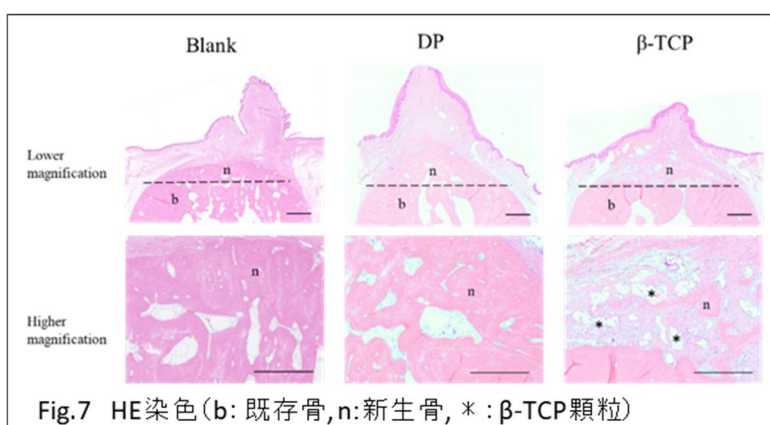
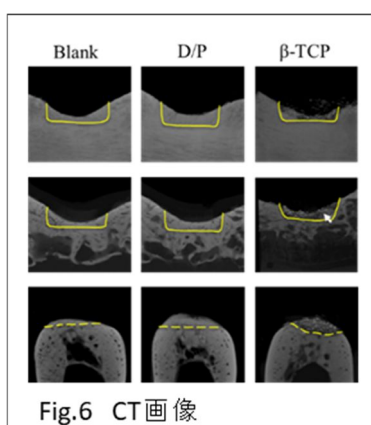
直径 20mm×1.5mm のチタンディスクを作製した。チタンディスク上に各種の細胞シートを播種し、integration の獲得を検討した。

4) DNA/Protamine を利用した骨再生誘導

300-bp DNA と Protamine で DNA/Protamine 複合体を作製した。ビーグル犬の前臼歯を抜歯し、抜歯窩の治癒を確認後、顎骨に 5×7mm の 2 壁性骨欠損を作製した。各欠損に対して DNA/Protamine を補填した (D/P 群)。対照群として試料を入れない Blank 群と β -TCP (CERASORB®, HAKUHO, Japan) を補填し、コラーゲン被覆膜 (BIOMEND®; Zimmer Biomet Holdings, Inc., USA) した β -TCP 群とした。骨再生の評価として定期的にはデンタルエックス線画像を撮影した。

5) 垂直型欠損部への DP 複合体の再生および修復効果

8 週間経過後にサンプリングを行い、マイクロ CT を撮影し、組織標本を作製した。マイクロ CT 画像において D/P 群は、Blank 群および β -TCP 群と比較して不透過性の亢進が認められた。 β -TCP 群では β -TCP 顆粒の残存が認められた (Fig.6)。HE 染色では、D/P 群において成熟した骨再生は認められた。 β -TCP 群ではマイクロ CT 所見と同様に β -TCP 顆粒の残存が認められた (Fig.7)。DNA/Protamine は口腔内の骨欠損に対し、骨形成能を有する骨再生に効果的な scaffold であることが確認できた。



(Fig.6,7 : Arch Oral Biol. 115, 2020 より改変)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyaguchi Naoyuki, Kajiya Hiroshi, Yamaguchi Masahiro, Sato Ayako, Yasunaga Madoka, Toshimitu Takuya, Yanagi Tsukasa, Matsumoto Ayako, Kido Hirofumi, Ohno Jun	4. 巻 27
2. 論文標題 Bone Morphogenetic Protein-2 Accelerates Osteogenic Differentiation in Spheroid-Derived Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 343 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2485/jhtb.27.343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Masahiro, Kajiya Hiroshi, Egashira Rui, Yasunaga Madoka, Hagio-Izaki Kanako, Sato Ayako, Toshimitsu Takuya, Naito Toru, Ohno Jun	4. 巻 27
2. 論文標題 Oxidative Stress-induced Interaction between Autophagy and Cellular Senescence in Human Keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 199 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2485/jhtb.27.199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Ayako, Yanagi Tsukasa, Yamaguchi Yuichiro, Taniguchi Yusuke, Kido Hirofumi, Ohno Jun	4. 巻 115
2. 論文標題 Effect of DNA/protamine complex paste on bone augmentation of the mandible: A pilot study on dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104729 ~ 104729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関 真理子, 一志 恒太, 高山 麻衣, 佐藤 絢子, 篠原 佳代子, 森永 健三, 城戸 寛史
2. 発表標題 PMTCが歯冠修復物の表面性状および細菌数の増加に及ぼす影響
3. 学会等名 福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平岡 麻衣, 関 真理子, 佐藤 絢子, 一志 恒太, 篠原 佳代子, 寺岡 啓, 森永 健三, 城戸 寛史
2. 発表標題 PMTCの現状と課題についての検討 歯科衛生士を対象としたPMTCの実施状況に関するアンケート調査から
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関 真理子, 一志 恒太, 平岡 麻衣, 佐藤 絢子, 篠原 佳代子, 寺岡 啓, 森永 健三, 城戸 寛史
2. 発表標題 PMTCが歯冠修復物の表面性状およびバイオフィルムの形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤崎誠一, 柳束, 加倉加恵, 佐藤絢子, 松本彩子, 豊田馨大, 大野純, 城戸寛史
2. 発表標題 2つの脂肪組織由来の幹細胞の移植による下顎骨再生療法の検討
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関真理子, 平岡麻衣, 佐藤絢子, 一志恒太, 森永健三, 城戸寛史
2. 発表標題 歯冠修復物の表面粗さに影響を与えるPMTCの要因についての検討
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本彩子, 柳束, 佐藤絢子, 藤崎 誠一, 大野純, 城戸寛史
2. 発表標題 DNAスキャフォールドと骨再生
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----