

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19043

研究課題名（和文）感染根管後の歯髄細胞移植による歯髄再生療法を確立するための基盤研究

研究課題名（英文）Development of a novel dental pulp regenerative therapy through transplantation of dental pulp cells in root canals in mice

研究代表者

大桑 雄太（okuwa, yuta）

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：60828739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：再生歯内療法によって根管内に形成された組織は歯髄と同じであるとは言えないため、改善が必要であると考えた。そこで再生歯内療法において歯髄幹細胞を使用することで上記の欠点を解決できると考えた。まずマウスの大臼歯を用いて根尖から血流を確保する方法を模索し、その次にマウスの歯髄から歯髄幹細胞を分取する方法を検討した。最終的にマウスを用いて歯髄再生モデルの作製にとりかかった。その結果、根管内に血管様構造を有する組織、ネスチン抗体およびニューロフィラメント抗体陽性細胞を確認することができた。この結果から歯髄に似た組織をつくることができたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

8020運動の達成者は医療費が20%も低く、要介護率も低下することから、歯の延命は医療・福祉・経済の安定に繋がるという報告がある。そこで、どのような歯の根管においても歯髄を再生させる技術の開発が急務であると考えた。この根管内の歯髄再生には、移植した細胞が根管内に生存することが必須であるが、再生歯内療法で行われている根尖孔の拡大をし、根尖部から十分な血流を確保することで移植した細胞が生存できると考え、今回の研究の着想に至った。この研究課題の成就が超高齢社会に突入した日本の健康寿命を延ばすことに貢献している。

研究成果の概要（英文）：Regenerated endodontic procedures (REP) aim to restore damaged dental pulp tissue to its original state. However, currently, the regenerated tissue formed using REP does not resemble the original dental pulp, with hard tissue formation often seen in the root canal. Therefore, we investigated the isolation and transplantation of dental pulp stem cells (DPSCs) using mice treated with REP. Our data shows formation of vascular tissue (CD31+) with odontoblast-like cells (nestin+ cells) and nervous tissue (neurofilament+). Our results suggest that using REP in combination with DPSC transplantation, a tissue resembling dental pulp was formed.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄 再生

### 1. 研究開始当初の背景

研究当初から歯の歯髄を温存することが重要視されていた。その理由として、永久歯の抜歯の主な原因として歯周病、う蝕および歯折が挙げられるが、その歯折の状態に無髄歯 (43%) が多いことである。さらに、大臼歯における無髄歯の喪失リスクは有髄歯より 7.4 倍高いという報告もある。つまり、直接的な関連ではないが、歯髄の喪失 (無髄歯になると) が歯の喪失リスクを高めることが推察できる。一方で、抜髄後の根管治療は根管充填を終了とするが、再感染する頻度も高く、再感染した歯は再度根管治療や外科的治療法が適応になるので、さらに歯折のリスクが高まる。そこで、理想的には、歯髄の温存が最優先になるが、非可逆性歯髄炎の症例では、抜髄しか方法がないので、歯髄再生治療への期待は大きい。

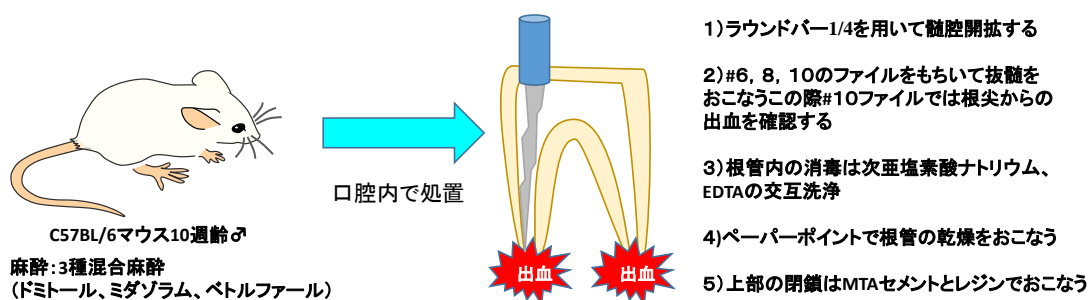
研究当初から歯髄を再生させる新しい 2 つの治療法が始まっている。その一つの再生歯内療法 (Regenerative Endodontics) とは歯髄が壊死した歯根未完成歯に対し抗菌薬による滅菌と根尖孔を拡大して意図的に根管内に出血させることで、細胞を根管内に誘導して歯髄の再生及び硬組織の再生を期待し、歯根の長さや厚みを増加させる治療法である。最近では歯髄壊死を伴う歯根完成永久歯にも同様の方法を施し、歯髄の再生と硬組織の再生を期待する治療が国際的な潮流になりつつある。しかしながら、長期観察によって、根管内に増生した硬組織は象牙質ではなく、セメント質であることが分かってきた。つまり、根管拡大後に根管内に浸入した細胞は歯根膜の細胞であり、その細胞がセメント芽細胞に分化して、セメント質を形成したと考えられる。一方で、再生した結合組織が歯髄の機能を持つことの可否についても、さらに長期的な観察結果が待ち望まれている。もう一つは、患者さんの第 3 大臼歯から採取して、培養増殖させた歯髄細胞を抜髄後の根管内に移植して歯髄を再生させる歯髄再生細胞治療法である。すでに、5 例の臨床研究の報告があり、中期的な結果としてはすべての患者において、歯髄の陽性反応を認めている。しかしながら、根管充填後の感染根管に対して歯髄細胞を移植して歯髄を再生させることを試みた臨床報告はこれまでにない。すでに、根管充填後の感染根管では根尖孔の狭小もしくは閉鎖していること考えると、根管処置後に細胞を移植しても、細胞への栄養供給つまり血管の根管内への誘導が困難である。そこで、感染根管処置後の根管内に移植する歯髄細胞による歯髄再生細胞治療法を考案しようと試みた。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、臨床において根管充填後の根管に血管と神経を含む歯髄組織を歯髄細胞移植によって再生させることである。これまで歯髄再生の研究は数多くおこなわれてきた。その研究の中で歯髄細胞を用いた研究もあるが、根管内に移植した細胞への栄養供給が不十分であることで、細胞の生存率に不安が残ったり、細胞移植後に根管が感染したりと課題が多いのも現実である。そこで、本研究では感染根管治療後を想定し、根尖孔を拡大して血管の誘導を行う。そして、根尖孔をどれくらい開けると血管が誘導できて、歯根膜幹細胞の根管内への流入を防ぐことができるかを明らかにする、さらに歯髄細胞を根管内に移植して象牙質・歯髄複合体を再生する術式を確立することを目的とする。本研究課題によって歯髄再生を可能にすれば、歯の延命に繋がり、口腔機能が長期にわたり維持されることになるので超高齢社会に突入した日本国民の QOL を向上できる。さらには、自律神経や運動機能などの全身の恒常性維持や認知症の予防にも貢献できると考えて、医療費の大幅な削減に繋がることを期待している。

### 3. 研究の方法

(1) 根尖からの血流を確保するため根尖孔をどのファイルで穿通すればよいかの検討をおこなった。C57BL/6 マウス (10 週齢) をもちいてマウスの抜髄をおこない、現在臨床で用いられている 6 号、8 号および 10 号の K ファイルを用いて根尖を穿通し、意図的に根尖から出血を促し 4 週間経過観察した後、マイクロ CT を用いた放射線学的解析およびヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析をおこなった。



(2) 歯髄細胞 (DPC) の分取にとりかかった。新生児 EGFP マウス (5 日齢) の歯髄から細胞を

分離させ、幹細胞培地で培養し、80%コンフルエンスにした後に増殖させた。

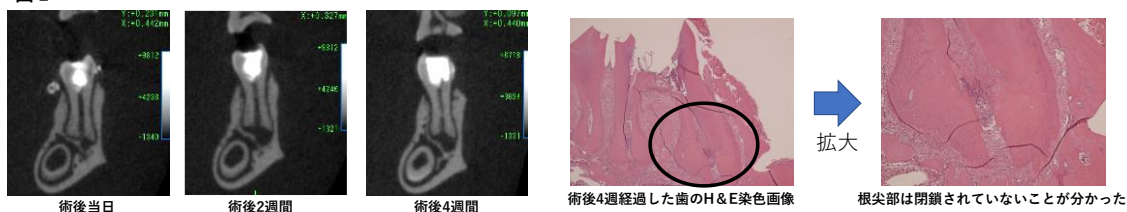
(3) マウス歯髄再生モデルの作製にとりかかった。(1)にて作製したモデルを用いて根管内に新生児 GFP マウスから採取した歯髄幹細胞 (DPSC)  $1.0 \times 10^5$  個を移植した。最後に歯髄腔とその上部を MTA セメントとコンポジットレジンで封鎖した。対照群は DPSC を移植しないものとした。術後 4 週間の間は MTA セメントとコンポジットレジンの脱離がないかおよび根尖病変ができていないかを確認するために毎週マイクロ CT を用いて撮影をおこない、4 週間経過観察した後 H&E 染色をおこなった。さらに根管内にできた組織を免疫組織化学染色による解析もおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 根尖部からの血流を確保するファイル号数の検討

現在臨床で用いられている 6 号、8 号および 10 号のファイルを用いて根尖を穿通し、意図的に根尖から出血を促し 4 週間経過観察した。マイクロ CT を用いた放射線学的解析およびヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的解析の結果から根尖は 10 号のファイルで穿通させると、穿通後 4 週間経過しても根尖は閉鎖されていないことが分かった。(図 1)

図 1



##### (2) 歯髄幹細胞 (DPSC) の分離について

歯髄は新生児 EGFP マウス (5 日齢) から分離させた。細胞を幹細胞培地で培養し、80%コンフルエンスにした後に増殖させた。1 継代目および 3 継代目の細胞を多能性マーカーである KLF4 用いて分析した結果、ほとんどの細胞の核において均一な KLF4 の発現を確認することができた。歯髄幹細胞はまた、間葉系細胞マーカーであるビメンチンで染色した。初代培養では、歯髄幹細胞が最大で 80% の陽性率を示した。さらに培養物中の歯髄幹細胞 以外の上皮細胞の占める割合を確認するために、広範囲のサイトケラチン抗体をもちいて上皮細胞の染色をおこなった。その結果、初代培養では約 20% 上皮細胞 が混在していることを確認したが、1 回目と 3 回目の継代後、上皮細胞の割合は 3% 未満という結果だった。

##### (3) マウス歯髄再生モデルの作製結果

C57BL/6 マウス (10 週齢) の下顎大臼歯の抜髄をおこない、根管に新生児 GFP マウスから採取した歯髄幹細胞 (DPSC)  $1.0 \times 10^5$  個を移植した。対照群は DPSC を移植しないものとした。その結果、DPSC を移植したモデルでは、血管様構造を有する組織と無細胞の骨または象牙質に似た組織を確認することができたが、対照群のモデルでは無細胞の骨に類似した構造物が根管内の大部分を占めており、血管構造を有する組織は少ししか観察することができなかった。

また移植した細胞が根管内にしっかり残っているか GFP 抗体による免疫組織化学染色をおこなったところ、根管内に GFP 抗体陽性細胞を確認することができた。さらにネスチン抗体、CD31 抗体およびニューロフィラメント抗体も用いて、免疫組織化学染色をおこなったところ、DPSC 移植群ではネスチン抗体、CD31 抗体およびニューロフィラメント抗体陽性細胞を確認することができたが、対照群では、これらの抗体陽性細胞は確認することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大桑雄太
2. 発表標題 Revitalizationのマウス実験モデルの作製
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------