

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19280

研究課題名（和文）歯髄・象牙質再生誘導因子を用いた新規再生歯内療法薬の開発

研究課題名（英文）Development of Novel Dental Pulp and Dentin Regeneration Inducing Agents Using Microenvironmental Constituent Factors

研究代表者

林 勇輝（Hayashi, Yuki）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10756547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：in vivoにおいて、CXCL14、MCP1単独の移植ではほとんど歯髄再生を起こさなかった。CXCL14、MCP1の混合液による移植後には根管全体の5割程度に再生歯髄様組織が見られた。根管の開口部には炎症性細胞が非常に多く観察され、根管壁に近い部分および根管上部は石灰化および線維化が強い間質が多く観察された。血管は因子単独での移植の組織と比して増加しているものの、非常に疎であった。CXCL14、MCP1の混合液に対しさらにCCR3アンタゴニストを混合し移植すると、根管全体の7割程度に再生歯髄様組織が見られた。血管新生量は両者の混合では変わらずCCR3を混合して初めて有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

断髄の目的は、健康な歯根部歯髄を残し、乳歯においては生理的な根吸収による後継永久歯への正常な交換、幼若永久歯においては生理的な根の完成を促すことにある。現在、断髄面への貼薬剤として水酸化カルシウム製剤が応用されているが、歯髄における炎症範囲の診断の困難性から、多くの症例で内部吸収が生じ、再歯髄処置あるいは抜歯となってしまう場合もある。そのため、遊走促進能・抗炎症作用・象牙質分化促進能を備え、より有効性の高い貼薬剤の開発は急務と言える。本研究結果により、CXCL14、MCP1単独ではなくCCR3アンタゴニスト混合により歯髄再生が促進されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：In vivo, transplantation of CXCL14 and MCP1 alone caused little pulp regeneration, whereas after transplantation of a mixture of CXCL14 and MCP1, regenerated pulp-like tissue was seen in about 50% of the entire root canal. Inflammatory cells were very abundant at the opening of the root canal, and highly calcified and fibrotic interstitium was observed near the canal wall and in the upper part of the canal. When CCR3 antagonist was added to the CXCL14, MCP1 mixture, regenerated pulp-like tissue was observed in about 70% of the entire root canal. The amount of angiogenesis did not change with the mixture of CXCL14 and MCP1, but increased significantly only with the addition of CCR3.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：歯髄再生

キーワード：歯髄再生 歯髄幹細胞 小児歯科学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療は細胞源の確保、培養期間、費用の問題から、急患期の対応の多い小児歯科領域に適応するのは難しい。そのため、幹細胞を用いず、保存可能な再生誘導薬の開発は急務であると言える。申請者はこれまで、CXCL14、MCP1を歯髄再生に関与している候補因子として同定し、さらに、歯からEDTAにより抽出した非コラーゲンタンパクには象牙質分化促進作用があることを明らかとし、その質量解析からOPN、BMP7を象牙質再生に関与している候補因子として同定した。従ってこれらの因子の混合により歯髄再生・象牙質誘導ができれば、新規歯髄象牙質複合体再生誘導薬の創薬が可能となる。そこでまず、異所性歯根移植および生活歯髄切断モデルを用い、適切な因子の組み合わせと至適濃度を検討することを目的に本研究を行う。

2. 研究の目的

小児歯科領域において乳歯・幼若永久歯の外傷によって歯髄処置が必要となる症例には頻繁に遭遇する。断髄の目的は、健康な歯根部歯髄を残し、乳歯においては生理的な根吸収による後継永久歯への正常な交換、幼若永久歯においては生理的な根の完成を促すことにある。現在、断髄面への貼薬剤として水酸化カルシウム製剤が応用されているが、歯髄における炎症範囲の診断の困難性から、多くの症例で内部吸収が生じ、完全に良好な経過をたどる症例は74%程度にとどまると報告されており、再歯髄処置あるいは抜歯となってしまう場合もある。そのため、遊走促進能・抗炎症作用・象牙質分化促進能を備え、より有効性の高い貼薬剤の開発は急務と言える。

間葉系幹細胞は様々なTrophic factorの分泌源として知られ、血管新生、抗アポトーシスあるいは免疫調整によって障害後の組織再生を促進すると報告されており、再生治療薬としての可能性が研究されている。申請者はTrophic factorの集積物である上清の遺伝子・タンパク発現の解析から、間葉系幹細胞の再生能に関与する候補因子を絞り込み、添加実験におけるTrophic効果の確認と、上清中からの中和でその効果が抑制されることから、CXCL14、MCP1を歯髄再生誘導因子として同定した。これらの研究の成果から、歯髄再生誘導因子・象牙質再生誘導因子の同定は行えたが、因子単独での再生が可能であるかは検討できていない。そこで、異所性歯根移植モデルを利用し、in vivoにおける、それぞれの濃度と混合比率をスクリーニングすることを目的に本研究を行う。

3. 研究の方法

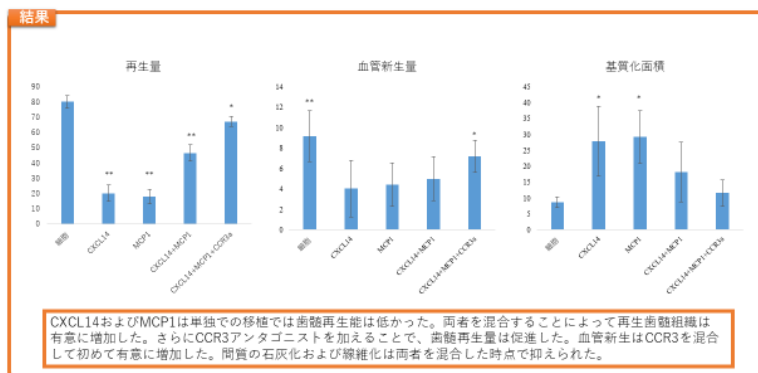
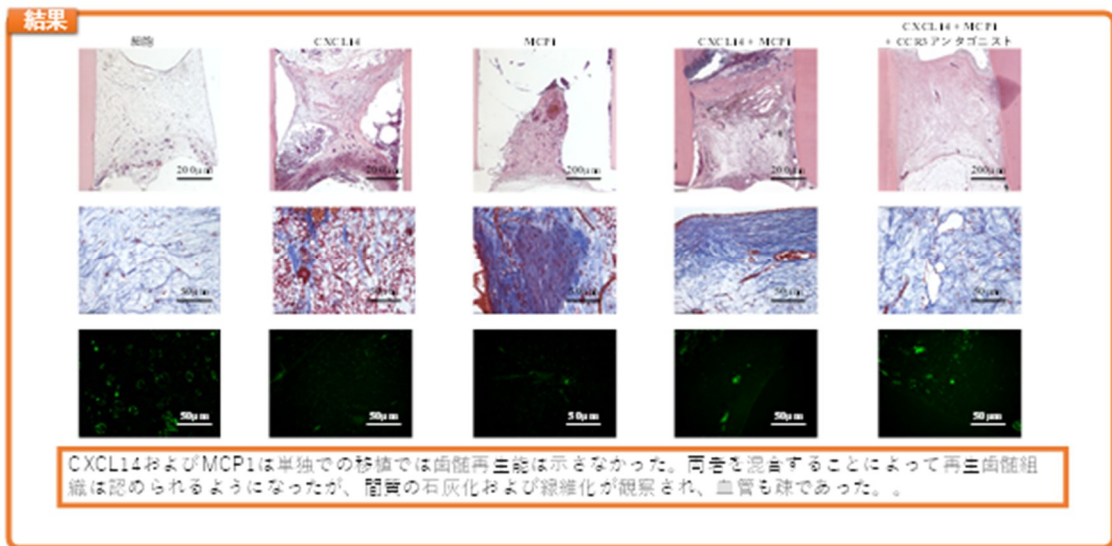
in vivoにおける歯髄再生能の確認するために、コラーゲンと混合した終濃度(10ng/ml)のCXCL14、MCP1および両者の混合液、さらにその混合液にニッチ改善因子であるCCR3アンタゴニストを混合したものをを用い、コラーゲンをスキャフォールドとして、各4匹の5週齢SCIDマウスに対し、異所性歯根移植を行った。移植後28日にて還流固定し、移植片を脱灰後パラフィン切片とした。切片はそれぞれ、再生組織の確認としてHE染色およびマッソントリクロム染色を、血管新生の確認としてLectin染色を行った。

4. 研究成果

in vivoにおいて、CXCL14、MCP1単独の移植ではほとんど歯髄再生を起こさなかった。また根管内の組織は線維化および石灰化物がほとんどを占め、血管の新生もほとんど見られなかった。

CXCL14, MCP1 の混合液による移植後には根管全体の 5 割程度に再生歯髄様組織が見られた。根管の開口部には炎症性細胞が非常に多く観察され、根管壁に近い部分および根管上部は石灰化および線維化が強い間質が多く観察された。血管は因子単独での移植の組織と比して増加しているものの、非常に疎であった。CXCL14, MCP1 の混合液に対しさらに CCR3 アンタゴニストを混合し移植すると、根管全体の 7 割程度に再生歯髄様組織が見られた。組織内間質の石灰化および線維化が抑えられていることが観察された。また血管の新生も促進されていた。

CXCL14 は CXCL12 とともに CXCR4 を通した幹細胞の遊走能に関与すると報告されており、MCP1 は動脈性の血管新生および成熟に関与すると報告されている。しかし、CXCL14 および MCP1 は単独での移植では歯髄再生能は示さなかった。両者を混合することによって再生歯髄組織は認められるようになったが、間質の石灰化および線維化が観察され、血管も疎であった。さらに CCR3 アンタゴニストを加えることで、歯髄再生量は促進し、間質の石灰化および線維化も抑えられ、血管新生も増加した。CCR3 アンタゴニストは遊走細胞のうちマクロファージ細胞の分化を制御し、相対的 M2 マクロファージ細胞を増やすことが報告されている。従って、CCR3 アンタゴニストの追加により幹細胞ニッチが改善し、再生環境が整ったことによると考えられる。今後はより詳細な歯髄再生促進メカニズムの検討が必要であると考えられる。また、より実際に近い生活歯髄切断モデルをラット、イヌなどで作成し、有効性を検討する必要があると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 玄番 千夏子, 林 勇輝, 酒徳 晋太郎, 石坂 亮, 名和 弘幸	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 微小環境誘導因子を応用した新規外傷治療法の開発に向けた動物実験モデルの確立	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 愛院大誌	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林勇輝
2. 発表標題 幹細胞誘導因子を用いた新規再生歯内療法薬の開発
3. 学会等名 超異分野学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林勇輝 酒徳晋太郎 石坂亮 福田理
2. 発表標題 外傷治療における細胞培養上清および歯根構成化学的因子の変化による影響
3. 学会等名 第57回小児歯科学会
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

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