

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24120

研究課題名(和文) BDNFによるセメント芽細胞分化誘導を基軸としたセメント質再生の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on cementum regeneration by inducing cementoblast differentiation using BDNF

研究代表者

佐々木 慎也 (Sasaki, Shinya)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：60848000

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)：歯周炎が進行して保存不可能となった歯を保存するためには、細胞移植治療による歯周組織再生が選択肢の一つとなる。この研究では歯をいったん抜歯し、生体外で細胞とともに培養し、歯周組織再生のキーとなるセメント芽細胞を歯の表面に誘導することでセメント質を再生させ、生体内に戻すことを最終目標としている。本研究期間中に、象牙質の表面で間葉系幹細胞を培養することに成功した。この象牙質表面の細胞がセメント芽細胞に分化すれば、生体外でセメント質を再生させることができると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代の日本では国民の8割が歯周病に罹患しているとされ、歯周病は糖尿病などの全身の健康と関わりがあることが分かってきている。歯周病の理想的な治療法として、歯周組織再生療法があり、盛んに研究が進められている。現状で臨床応用されている再生療法は、軽度～中等度の歯周炎が対象で、重症化したものは抜歯せざるを得ないことが多々ある。本研究では歯周炎が重症化した場合でも歯を保存できる歯周組織再生療法を開発することを目的としている。重症化した歯周病を治癒させることができれば、単に口の中だけの問題解決でなく、全身の健康増進につながるため、健康寿命延伸の観点でも非常に重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Periodontal tissue regeneration by cell transplantation is one of the promising options for preserving teeth that have severe periodontitis. In this study, extracted teeth were cultured with cells ex vivo. If cementoblasts, which are essential for periodontal tissue regeneration, are guided to the tooth surface to regenerate cementum, it will be possible to return the extracted teeth to the oral cavity. During this study, I succeeded in culturing mesenchymal stem cells on the dentin surface. If the cells on the dentin differentiate into cementoblasts, it is considered that cementum can be regenerated ex vivo.

研究分野：歯周病学

キーワード：間葉系幹細胞の三次元培養

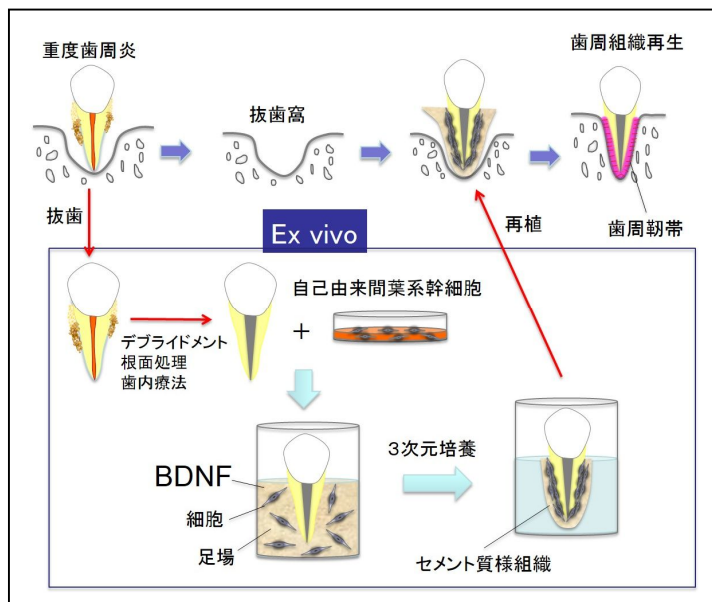
1. 研究開始当初の背景

歯周炎の進行は、歯を支える歯槽骨の吸収、歯周靭帯の損傷を引き起こし、放置すると歯の喪失に至り咀嚼機能低下、審美障害そして発音障害などの障害を招く。一般的な歯周病治療としてブラッシングやスケーリング・ルートプレーニングによる細菌バイオフィルムの除去が行われ、これによって炎症を軽減させることはできる。しかし、喪失した歯槽骨や歯周靭帯の再生およびその機能を回復することは難しく、歯周炎の再発リスクは残ったままである。すなわち、破壊された歯周組織に感染した嫌気性の歯周病原細菌の排除は困難で、慢性炎症が持続する。さらに欠損部に侵入した上皮によって歯周組織再生に必要な細胞が歯根面に遊走できない。以上のことから、歯周炎によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復する歯周組織再生療法が必要である。

現在、歯周組織再生療法として臨床応用されている Guided Tissue Regeneration (GTR) 法や、ブタのエナメルタンパク質 (Emdogain®) を歯周組織欠損部位に填入する方法は、内在性の細胞の制御によって再生を目指すため、比較的小規模の欠損には適している。しかし、臨床で多くみられる広範囲にわたる水平性の骨吸収や1壁性骨欠損のような大規模な歯周組織破壊では、歯周組織の細胞数が相対的に不足しているため、前述の方法では十分な再生効果が得られない。そのため、再生にかかわる細胞数の不足を補う細胞移植治療が必要と考える。歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨、歯肉結合組織、歯肉上皮といった複数の組織から構成されており、これらの複雑な組織を再生するためには多分化能を有する幹細胞が適していると考えられる。現時点では、倫理面・安全性の点から、間葉系幹細胞 (MSCs) が有用な細胞の1つである。

細胞移植治療は他の再生療法的手段と異なり、細胞に生体外で増殖・分化誘導などの加工ができることが有利な特徴である。そこで、重度歯周炎に罹患した歯を意図的に抜歯し、再生のキーとなるセメント質を生体外で構築しておくことで、その歯を再植したときに歯周靭帯や歯槽骨を効率的に再生できるのではないかと考えた。

また当研究室では、サイトカインの一つである BDNF が歯周靭帯細胞、セメント芽細胞、血管内皮細胞の増殖、分化、細胞外基質形成といった細胞機能を制御することを *in vitro* で明らかにしてきた。このような歯周組織再生促進効果のある BDNF に MSCs をセメント芽細胞へと分化させる作用があれば、BDNF/MSCs/足場複合体を用いて生体外でセメント質様の硬組織を構築することが可能になると考える。



2. 研究の目的

歯周組織再生に必要な歯周組織構成細胞の増殖・分化を促進するという BDNF の特徴を利用して、再生困難なセメント質を生体外で構築するシステムを確立することを目的とした。重度歯周炎に罹患した歯を意図的に抜歯し、生体外で歯根表面にセメント質を構築することができれば、その歯を再植することで歯周組織再生を誘導し、歯を保存することができる。生体外でセメント質様組織を構築することは、未解明の部分が多いセメント質の発生段階における分子メカニズムの解明につながると考えられる。また本研究での3次元培養システムを応用して、インプラント体 (もしくは新規材料 X) の表面にセメント質を構築し、歯周靭帯を有する機能的なインプラント体の開発に寄与できる。

### 3. 研究の方法

#### (1)象牙質片上でのヒト MSCs (hMSCs) の培養システムの確立

hMSCs (理研から購入、継代数 6) を象牙質片 (ヒト抜去歯を幅 1mm にスライス、表面を EDTA 処理) の上に  $1.0 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度で播種した。培地は 10%FBS 含有 DMEM 培地を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下で 2 週間または 4 週間培養した。培養終了後、象牙質片を取り出し、メタノールで固定してギムザ染色を行った。また、走査型電子顕微鏡 (SEM、KEYENCE VE-8800) で象牙質片表面への hMSCs の付着状況を確認した。

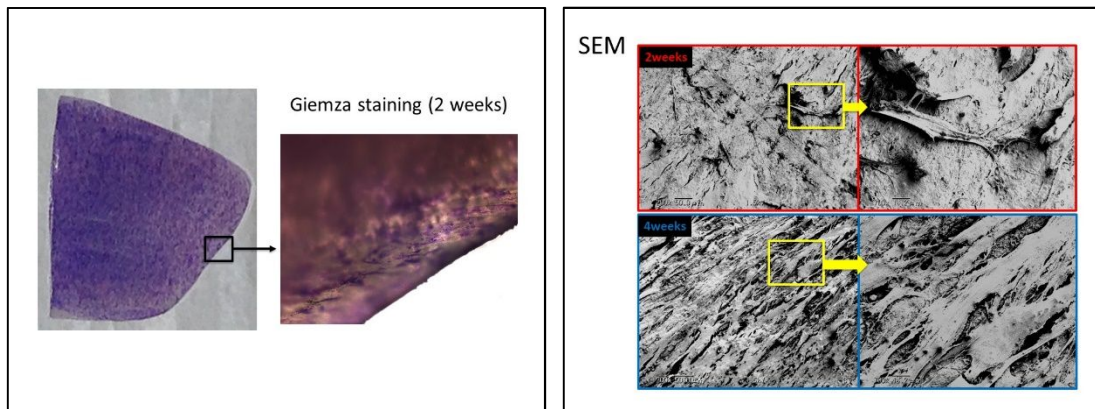
#### (2)コラーゲンを用いた hMSCs/象牙質片複合体の三次元培養方法の確立

培養プレート上で hMSCs を培養し、コラーゲンゲル (Cellmatrix®) に細胞密度  $1.0 \times 10^5$  cells/mL となるように混和した。それを (1) の方法で作製した hMSCs/象牙質片複合体の上に 1mL 加え、さらに前述の培地を 1mL 加えて 1 週間培養した。培養終了後、象牙質片を取り出してメタノールで固定し、アザン染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)象牙質片上での hMSCs の培養システムの確立

hMSCs を象牙質片上で 2 週間培養した結果、象牙質片上にギムザ染色陽性の hMSCs とと思われる細胞が観察された。また、同様に培養して SEM で観察すると、象牙質片上に伸展している多数の細胞を認め、4 週間培養したものでは細胞密度が高くなっていった。この細胞は培養していた hMSCs と考えられ、象牙質片に付着し、増殖することができるということがわかった。



#### (2)コラーゲンを用いた hMSCs/象牙質片複合体の三次元培養方法の確立

象牙質片とコラーゲンゲル中の hMSCs の三次元培養を開始して 1 週間で、象牙質片とコラーゲンが一体化している組織像が観察された。コラーゲン中には細胞が含まれており、この方法で培養可能であるといえる。

以上のように実験結果が得られ、当初予定していた計画よりも進捗は遅いものの、生体外で象牙質表面に細胞を接着させ培養することができた。今後、この培養系に BDNF を作用させてセメント質を構築することができれば、大規模な歯周組織欠損においても組織再生治療が可能になる足がかりとなる。引き続き、当該研究を推進していく予定である。



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 堀越励、加治屋幹人、本池総太、小川智也、曾根久勝、吉井寛毅、森本慎、吉野舞、佐々木慎也、岡信愛、松田真司、岩田倫幸、應原一久、水野智仁
2. 発表標題 軟骨分化誘導を施した間葉系幹細胞集塊Clumps of MSCs/ECM complexesによる骨再生効果の検討
3. 学会等名 第59回広島県歯科医学会
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
---------	---------