

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592110

研究課題名(和文) 歯根修復における新しいバイオハイブリッド型材料の開発

研究課題名(英文) The development of a novel biohybrid material for tooth root restoration

研究代表者

小林 洋子(岩松洋子)(Iwamatsu-Kobayashi, Yoko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50261524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜あるいはヒト智歯歯胚から、間葉系幹細胞のマーカーの一つであるSTRO-1陽性細胞をMSCGM培地を用いて培養したところ、高い回収率が得られ、骨あるいは軟骨誘導培地にて分化誘導された。さらに、生体材料として、シャーピー線維と同程度の直径20 $\mu$ mの貫通孔を有する試作チタンメッシュを試作し、その上での細胞の付着ならびに分化について検討したところ、貫通孔だけでなく貫通孔のないチタン表面を覆うように多数付着し、細胞接着分子であるフィブロネクチンの分布も広範囲にみられた。免疫組織科学的に調べたところ、オステオポンチンならびにオステオカルシンが孔および孔と孔の間に結晶を形成するようにみられた。

研究成果の概要(英文)：We examined the influence of mesenchymal stem cells growth medium (MSCGM) for STRO-1 positive cells derived from PDL compared with DMEM. PDL cells cultured in MSCGM showed colony formation and the isolation rate was higher than that in DMEM. STRO-1 positive cells derived from human wisdom tooth germs collected using MSCGM showed Alcian blue positive matrix when cultured in chondrogenic induction medium. They also performed nodule formation stained with Alizarin red cultured in osteogenic induction medium.

We have designed a titanium sheet with two-dimensional porous array of 20 $\mu$ m pored mesh which was almost same as the diameter of Sharpeys fiber and numerous holes were densely pierced. We investigated the effect of the differentiation of cells on the titanium mesh. Frios Bone Shield was used as control. The cells on the titanium mesh expressed higher osteopontin and osteocalcin expression around the pore compared with the Frios.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学 生体材料 再生医学 細胞・組織 歯根修復

## 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオマテリアルに細胞ならびにシグナル因子を応用したティッシュエンジニアリングの開発が、皮膚や血管、骨をはじめ様々な臓器で試みられている。歯科分野においても、歯根膜由来培養細胞から得られた細胞シートにより歯周組織再生を試みる研究 (Hasegawa et al., 2005) や、PLLA等の吸収性材料ならびに bFGF を用いた顎骨再生に関する研究 (Kinoshita et al., 2008) などがなされてきている。しかし、根面う蝕や歯根破折といった、歯科臨床において日常的に遭遇する症例に対する治療法としてティッシュエンジニアリングの応用はまだなされていない。

これまで、当教室において、歯根膜由来線維芽細胞の培養系はすでに確立されており、コラーゲンを用いた立体培養に関する研究も行ってきた (岩松、金田一ら 2002)。さらに、イヌを用いた実験において、歯根窩洞に歯根膜由来線維芽細胞を応用した場合、術後3ヶ月までその細胞の存在が確認され、歯根膜組織再生に関与している可能性が示唆された (岩松、金田一ら 2000)。残存歯根膜組織に近接したかたちでチタンならびに歯根膜由来線維芽細胞を挿入すると、チタン表面にセメント質ならびに歯根膜が形成され (平田、兼平ら 2000)、細胞の足場としてマイクロキャリアが有効であることもわかってきた (平田、金田一ら 2001)。ラット歯根膜に近接したかたちでチタンインプラントを挿入し、酵素組織化学的に検討した結果、ALP陽性細胞を含む歯根膜様線維がチタンインプラント体表面に対して垂直に配列しており、生体内における歯根膜線維芽細胞の純チタンに対する高い親和性が示唆された (只友、岩松ら 2001)。また、PLAやコラーゲン等各種吸収性材料に対する歯根膜由来細胞の接着について検討した結果、培養初期にはコラーゲンに対して高い接着性が

得られ、培養期間が長くなるとPLAやPLLA上においても同様の接着性が得られることがわかった (Iwamatsu-Kobayashi, Nishihara, et al., 2005、西原、岩松-小林他、2005)。さらに、ヒト智歯歯胚由来の間葉系幹細胞にも着目し、その組織内での分布の解明ならびに分離培養にも成功している (岩松 - 小林、西原、2006、Nishihara, Iwamatsu-Kobayashi, et al., 2007, 2009)。また、4-META/MMAレジンを始めとする各種レジンの物性、とくに歯質への接着性について詳細に検討している (Endo, Komatsu, et al., 2007, Furukawa, Komatsu, et al., 2008)。

本研究では、以上の成果をふまえて、ティッシュエンジニアリングを歯根修復材料に応用すべく、現在歯科においてひろく使用されている接着性レジンを改質し、歯周組織再生能を有する新たなバイオハイブリッド型材料を開発する予定であり、従来報告にはみられない新たな研究として位置づけられる。

## 2. 研究の目的

高齢化社会となった現在の日本において、歯科においても患者のQOLの向上を目指すことが急務となっている。高齢者にみられる根面う蝕や歯根破折は、天然歯の保存を難しくしている一要因である。現在、これらの疾患に対しては、主として歯冠修復に用いられる接着性レジンによる修復処置がなされているが、この方法だと天然歯根にみられる歯根膜組織の回復にまでは至っていない。そこで、新たな歯根修復術として、ヒト歯根膜由来培養細胞あるいはヒト智歯歯胚から得られた間葉系幹細胞を用いて、バイオマテリアルとハイブリッド化することで、歯根膜組織を有する新たな歯根修復用バイオハイブリッド型材料開発を目標として研究していく予定である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯根修復材料の開発ならびに物性の検討

生体親和性に優れ、歯質接着性を有する 4-META/MMA レジンの歯科修復材料に、細胞の Scaffold としての機能を与える。

また、生体材料として、シャープピー線維と同程度の直径 20  $\mu$ m の貫通孔を有する試作チタンメッシュに着目し、その上での細胞の付着ならびに分化について検討する。さらに、そのチタン表面処理として blast 処理について検討する。

さらにその表層において歯根膜由来培養細胞あるいは間葉系幹細胞の増殖・分化が可能となるような適切な環境を与え、同時に物性の検討を行う。

#### (2) 歯根膜由来細胞あるいはヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞の培養

歯根膜由来細胞は、ヒト抜去歯より岩松、金田一ら (2002) の方法に基づき、歯根膜組織片を剥離、採取、Outgrowth 法にて培養・継代する。ヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞は、ヒト智歯歯胚より Nishihara, Iwamatsu-Kobayashi et al. (2007) の方法に基づき、STRO-1 陽性細胞を分離・培養する。以上の培養は、クリーンベンチならびに CO2 インキュベーターを備えた培養室で行う。

#### (3) 改良歯根修復材料上での細胞の動態観察

(2) より得た歯根膜由来細胞あるいはヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞を (1) で作製した材料上にて培養する。細胞の増殖能を調べるため、経時的に細胞数や BrdU の取り込みを測定する。細胞の付着状態は、位相差顕微鏡あるいは走査型・透過型電子顕微鏡により観察する。また、アクチンフィラメントに特異的に結合するファロイジンや、細胞の接着に關与するフィブロネクチン、FAK などの分子を免疫組織化学的に検出し、蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察・考

察する。さらに細胞の分化度を調べるため、オステオネクチン、オステオカルシン等の発現を免疫組織化学的に検出する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜あるいはヒト智歯歯胚から、間葉系幹細胞のマーカーの一つである STRO-1 陽性細胞を効率的に得るために、培地を従来の DMEM 培地から幹細胞培養用の MSCGM 培地に変えて、immunomagnetic beads を用いて分離培養した。すると、歯根膜由来細胞においてもコロニー形成がみられ、アクチンフィラメントに特異的に結合するファロイジン染色で形態変化が観察され、STRO-1 陽性細胞の高い回収率が得られた (Endo, Iwamatsu-Kobayashi, Nishihara, Komatsu et al. (2011))。また、得られた STRO-1 陽性細胞を骨あるいは軟骨誘導培地にて誘導し、組織学的に観察したところ、それぞれアリザリン赤陽性骨様基質あるいはアルシアン青陽性軟骨様基質の分泌が観察され、多分化能が示唆された (Iwamatsu-Kobayashi, Nishihara, Komatsu et al. (2011))。さらに、歯科臨床において現在ひろく用いられているコンポジットレジン上にて間葉系幹細胞を培養したところ、SEM 観察において細胞の付着がみられ、付着数はレジンの表面性状によって変化することが確認された。

(2) 生体材料として、シャープピー線維と同程度の直径 20  $\mu$ m の貫通孔を有する試作チタンメッシュに着目し、その上での細胞の付着ならびに分化について検討した。さらに、そのチタン表面処理として blast 処理について検討した。コントロールとして、市販の直径 100  $\mu$ m のチタンメッシュ (Frios Bone Shield) を用いて比較検討した。Frios では、細胞が貫通孔に落ち込むようにわずかに付着していたのみであったが、試作チタンメッシュでは貫通孔に付着するだけでなく、貫通

孔のないチタン表面を覆うように多数付着しているのが観察された(石幡、小林他(2012)、小林他(2012)。さらに、チタン表面にblast処理を施すことによって、細胞の付着が促進されることがわかった。細胞接着分子であるフィブロネクチンの分布も、細胞の付着部位に応じて広範囲にみられた。さらに、細胞の分化度について免疫組織科学的に調べたところ、オステオポンチンが培養2週間後で試作チタンメッシュの貫通孔ならびにその近傍に高く発現し、材料の配向性がみられたが、Friosにはみられなかった。オステオカルシンの発現は、Friosの場合は孔の周囲に限局してみられたが、試作チタンメッシュにおいてはいずれの実験群でも孔および孔と孔の間に結晶を形成するようにみられ、播種密度が高くなるにつれてその結晶が大きくなっていった(Endo, Iwamatsu-Kobayashi et al.(2014))。今回の結果から、試作チタンメッシュは細胞の分化を妨げないことがわかり、新たな歯根修復材料となる可能性が示唆された。

(3) 組織再生には神経系の再生が不可欠である。そのため、生体内における神経系のさまざまな機能を分子生物学的に検討した(Ichikawa H. et al, 2011,2012,2013)。

## 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 4件)

Sasaki R., Ichikawa H. et al., The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx, Cell Mol Neurobiol., 査読有, 33 巻, 2013 年, 707-714, DOI: 10.1007/s10571-013-9938-3

Nagayama T., Ichikawa H. et al., Increase of CGRP-containing nerve fibers in the rat periodontal ligament after luxation, Cell Mol Neurobiol., 査読有, 32 巻(3), 2012 年, 391-397, DOI: 10.1007/s10571-011-9767-1

Ichikawa H. et al., Masseteric nerve injury increases expression of brain derived neurotrophic factor in microglia within the rat mesencephalic trigeminal tract nucleus, Cell Mol Neurobiol., 査読有, 31 巻(4), 2011 年, 551-559, DOI: 10.1007/s10571-011-9648-7

Kano M., Ichikawa H. et al., Pituitary adenylatecyclase-activating polypeptide-immunoreactive nerve fibers in the rat epiglottis and pharynx, Ann Anat., 査読有, 193 巻(6), 2011 年, 494-499, DOI: 10.1016/j.aanat.2011.08.005

[学会発表](計 7件)

Iwamatsu-Kobayashi Y. et al., F-spondin involved in periodontal ligament differentiation through regulation of TGF- $\beta$  activity, The 5<sup>th</sup> international symposium for interface oral health science, 2014 年 1 月 20-21 日, 仙台

Endo N., Iwamatsu-Kobayashi Y. et al., The effect of the differentiation of cultured human cells on titanium mesh, The 5<sup>th</sup> international symposium for interface oral health science, 2014 年 1 月 20-21 日, 仙台

石幡浩志、小林洋子 他、20 $\mu$ mチタンメッシュを用いた歯周組織再生、日本歯周病学会、2012 年 5 月 17-19 日、札幌

小林洋子 他、培養智歯歯胚由来細胞に対するチタンメッシュの効果、日本歯科保存学会、2012 年 11 月 22-23 日、広島

小林洋子、小松正志 他、永久歯に内部吸収のみられた歌舞伎メイキャップ症候群の 1 例、日本歯科保存学会、2011 年 10 月 20-21 日、大阪

Iwamatsu-Kobayashi Y., Nishihara D., Komatsu M. et al., Characterization of STRO-1 positive cells derived from Human Wisdom Tooth Germs, The 4<sup>th</sup> international symposium for interface oral health science, 2011 年 3 月 8 日, 仙台

Endo N., Iwamatsu-Kobayashi Y., Nishihara D., Komatsu M. et al., The Influence of Mesenchymal Stem Cells Growth Medium for Isolation of STRO-1 Positive Cells from Human Periodontal Ligaments, The 4<sup>th</sup> international symposium for interface oral health science, 2011 年 3 月 8 日, 仙台

〔図書〕(計 2 件)

Iwamatsu-Kobayashi Y., Nishihara D., Komatsu M., et al., Springer 社、「Interface Oral Health Science 2011 – Characterization of STRO-1 positive cells derived from Human Wisdom Tooth Germs」, 2012、119-121 ページ

Endo N., Iwamatsu-Kobayashi Y., Nishihara D., Komatsu M., et al., Springer 社、「Interface Oral Health Science 2011 – The Influence of Mesenchymal Stem Cells Growth Medium for Isolation of STRO-1 Positive Cells from Human Periodontal Ligament」, 2012、122-124 ページ

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小林 洋子(IWAMATSU-KOBAYASHI, YOKO)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50261524

### (2)研究分担者

西原 大輔(NISHIHARA, DAISUKE)  
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：10431587

市川 博之(ICHIKAWA, HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：20193435

小松 正志(KOMATSU, MASASHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授  
研究者番号：10005069