

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792199

研究課題名（和文） 耐性を高めた残存歯髄組織を利用した象牙質-歯髄複合体再生療法の確立

研究課題名（英文） Establishment of dentin-pulp complex regeneration therapy from tolerance induced dental pulp tissues

研究代表者

諸富 孝彦（MOROTOMI TAKAHIKO）

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10347677

研究成果の概要（和文）：歯髄は歯を保存するうえで極めて重要な役割を担っており，象牙質-歯髄複合体再生療法を確立することは有用である．本研究において我々は，感染歯質と歯冠部の歯髄を除去後，残存する歯髄組織を増殖・分化誘導し，象牙質-歯髄複合体を再生させる方法について検討した．その結果，軽度の熱刺激は歯髄細胞に熱耐性を誘導し，また熱刺激自体や BMP-2 により象牙芽細胞への分化を促進することが可能であることが示され，断髄後の象牙質-歯髄複合体再生療法確立のために有用な知見を得ることができた．

研究成果の概要（英文）：Dental pulp is important for maintenance of tooth function. Therefore, it is beneficial to establish the dentin-pulp complex regeneration therapy. We have tried to develop the strategy that regeneration of the dentin-pulp complex from amputated dental pulp. In this study, we found that mild heat stress induced thermo-resistance on odontoblastic lineage cells and heat stress or BMP-2 enhanced that the cells differentiated into odontoblast. These finding contributes to the establishment of dentin-pulp complex regeneration therapy from amputated dental pulp.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：歯内療法学，象牙質-歯髄複合体，再生療法，熱耐性，断髄法

1. 研究開始当初の背景

歯髄は健全な歯の機能維持に極めて重要な役割を果たす一方で，周囲を硬組織に囲まれた応諾性の低い組織でもある．現在用いられている歯髄保存療法は診断基準が不明確なうえ，治療効果も不安定である．さらに歯髄炎は耐え難い疼痛を誘発することが多いため，歯科臨床の場において歯髄除去療法（抜髄法）が選択されることは少なくない．歯髄除去後の無髄歯は知覚や代謝能を喪失し，再感染や破折により抜歯へと至る危険性

が有意に高まる．そのため，現在では歯髄除去療法が選択される症例において，歯髄および象牙質を再生させることが可能となれば，QOL の向上に大きく寄与することができると思われる．

2. 研究の目的

本研究では歯髄除去療法が選択される症例において，感染象牙質および歯冠部歯髄を除去後，喪失した歯髄と象牙質を再生させる治療法の確立を目的としている．また，この

治療法を可能な限り早期に実現させるため、現時点においてすでに歯科口腔外科領域、または他の医療分野で用いられている薬剤・材料をのみ用いることと、現在の一般的な歯科診療施設で用いられている設備および器具・機材、そして標準的な手技・手法で処置可能な治療方法とすることを目標に定めた。

3. 研究の方法

in vitro 研究には、我々の樹立したラット切歯歯髓由来の象牙芽細胞前駆細胞様細胞株である KN-3 を用いた。

(1) 歯髓の耐性誘導方法の検討

KN-3 細胞に 41°C の軽度熱刺激を各時間加えた後に致死的な熱刺激を加えた。その後、アポトーシスの発現や細胞増殖能、象牙芽細胞への分化能について解析した。

(2) 可及的低刺激性な断髓方法の検討

KN-3 細胞を、虚血状態を想定した通常の1割の低栄養条件下で培養し、43°C、45 分間の熱刺激を加えた後、細胞増殖能、象牙芽細胞への分化能および石灰化能を解析した。

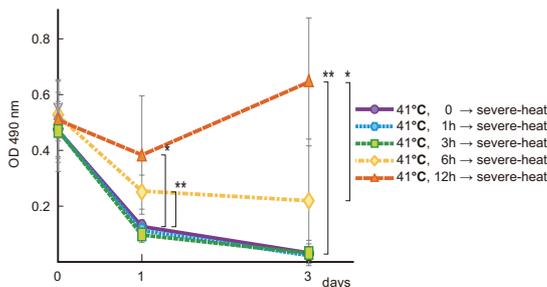
(3) 象牙質形成誘導方法の検討

KN-3 細胞を各種濃度の BMP-2 を添加した培養液を用いて培養し、細胞増殖能に与える影響や象牙芽細胞への分化誘導能について解析した。また、KN-3 細胞に 43°C、45 分間の熱刺激を加えた後の細胞数の変化、細胞増殖能および象牙芽細胞への分化能について確認した。

4. 研究成果

(1) 歯髓の耐性誘導方法の検討

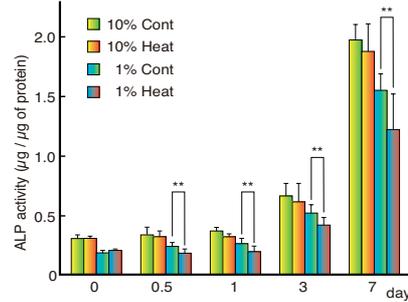
感染象牙質および歯冠部歯髓の切除除去時には各種刺激が根部残存歯髓へと加わる。これらの刺激に対する耐性を歯髓組織に誘導する方法について検討した。その結果、KN-3 細胞にあらかじめ 41°C の軽度熱刺激を 12 時間与えることにより、一過性の細胞周期停止と各種の熱ショックタンパク質の発現を促進し、致死的な熱刺激への耐性を獲得することが確認された【図 1】。さらに 41°C の軽度熱刺激は 20 分間という短時間でも、その後一定時間経過後には同様に致死的な熱刺激への耐性が誘導されることも確認された。



【図 1】軽度熱刺激の耐熱性誘導能

(2) 可及的低刺激性な断髓方法の検討

歯髓は応諾性の低い組織であり、誘導による耐性向上にも限度がある。そのため、可及的に残存歯髓組織を刺激しない断髓方法の確立が必要である。本研究の結果、歯科治療において多用される血管収縮剤を含有した局所麻酔薬により引き起こされる歯髓虚血状態は、感染歯質切削時の熱刺激による刺激を増大させる可能性が示唆された【図 2】。そのため我々が確立を目指す処置方法においては、血管収縮剤を含まない浸潤麻酔薬の使用が推奨される。



【図 2】ALP 活性の変化

(3) 象牙質形成誘導方法の検討

これまでに我々の行ってきた研究において、断髓後の歯冠部歯髓腔に成長因子として線維芽細胞増殖因子 (FGF)-2 を含浸させたゼラチンハイドロゲル粒子を、またスキャホールド材としてヒアルロン酸スポンジを適用することにより象牙質-歯髓複合体を再生させることが可能であることが示唆された。しかしながら、旺盛な歯髓再生誘導と比較し、象牙質再生は十分とは言えないレベルであった。そのため、増殖した歯髓細胞を象牙芽細胞へと分化誘導し、積極的に象牙質形成を促進させる方法について検討を行った。

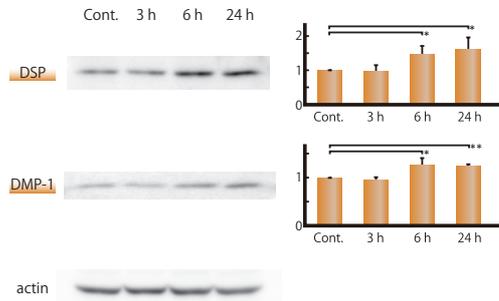
① 成長因子を用いる方法の検討

骨形成誘導因子 (BMP)-2 は強力な骨形成誘導能を示す成長因子であり、整形外科分野ではすでに臨床応用された実績を持つ。また、象牙芽細胞分化誘導能についても報告されている。そこで、この BMP-2 をゼラチンハイドロゲル粒子に含浸させて局所投与し、象牙質形成を促進することを企図して研究を行った。その結果、BMP-2 は象牙芽細胞前駆細胞様細胞の分化を強く促進することが確認され、その有用性が示唆された。

② 軽度刺激による方法の検討

歯髓は旺盛な第三象牙質形成による自己修復能を持つことが広く知られている。一方、そのメカニズムについては不明な点が多い。そのため、我々は成長因子に頼らずに歯髓細胞の有する自然な自己修復能を活用した象牙質形成誘導の可能性についても確認した。その結果、軽度の熱刺激は一過性の象牙芽細胞

胞前駆細胞様細胞の減少に引き続き、旺盛な細胞増殖能と象牙芽細胞への分化が誘導されることが確認された【図3】。よって、歯髄細胞増殖後にコントロール下で軽度熱刺激を加えることで、象牙質形成を促進させることが可能であることが示唆された。



【図3】熱刺激後の象牙芽細胞分化マーカー

以上の研究から、現在では歯髄除去療法が選択される症例において感染象牙質および歯冠部歯髄除去後の象牙質-歯髄複合体再生療法確立のための有用な知見を得ることができた。

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 13 件)

- 1). Morotomi T, Kitamura C, Toyono T, Okinaga T, Washio A, Saito N, Nishihara T, Terashita M, and Anan H: Effects of Heat Stress and Starvation on Clonal Odontoblast-like Cells. *J Endod*, 37: 955-961, 2011. 査読有り
- 2). 阿南 壽, 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 他6名: ラット根尖病巣に及ぼすオフロキサシン眼軟膏の影響. *日歯内療誌*. 32: 28-37, 2011. 査読有り
- 3). 矢野淳也, 永吉雅人, 西野宇信, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉居慎二, 西藤法子, 諸富孝彦, 寺下正道, 北村知昭: 実習方法の違いが術式習得に及ぼす影響の検討 (第1報) 回転式ニッケルチタンファイルを用いた根管形成. *日歯保存誌*. 54: 242-249, 2011. 査読有り
- 4). 春名千英子, 泉利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 他7名: 唾液中に検出されるストレス性内分泌ホルモンによる口腔乾燥症患者の評価-唾液検査の歯内治療への応用に向けての基礎的研究-. *日歯内療誌*. 32: 169-173, 2011. 査読有り
- 5). 鷺尾絢子, 中川愛加, 西藤法子, 吉居慎二, 平田志津, 市丸美希, 永吉雅人, 矢野淳也, 諸富孝彦, 寺下正道, 北村知昭: 九州歯科大学附属病院保存治療科を受診した患者の初診時診査から見た歯内治療の現状. *日歯内療誌*. 32: 206-211, 2011. 査読有り
- 6). 中村真理, 柿木保明, 北村知昭, 吉岡 泉, 椎葉俊司, 土生 学, 富永和宏, 寺下正道, 榎原葉子, 上森尚子, 唐木淳一, 松崎友祐, 諸富孝彦, 永吉雅人, 木尾哲朗, 尾崎由衛, 福田仁一: 口腔周囲筋の緊張緩和とリラクゼーションにおけるアロマテラピートリートメントの有効性について. *アロマテラピー学雑誌*. 11: 17-24, 2011. 査読有り
- 7). 諸富孝彦: 象牙質-歯髄複合体再生療法の確立を目指して -断髄後の象牙質-歯髄複合体再生療法と歯髄の耐性誘導-. *福岡歯大誌*. 38 (2): 75-80, 2012. 査読有り
- 8). Washio A, Kitamura C, Morotomi T, Terashita M, Nishihara T: Possible Involvement of Smad Signaling Pathways in Induction of Odontoblastic Properties in KN-3 Cells by Bone Morphogenetic Protein-2, a Growth Factor to Induce Dentin Regeneration. *Int J Dent*. DOI: 10.1155/2012/258469, 2012. 査読有り
- 9). 諸富孝彦, 北村知昭, 水上正彦, 板家圭祐, 牛尾悟志, 福田泰子, 松本典祥, 春名千英子, 松浦洋志, 泉 利雄, 阿南 壽: 低栄養条件下で熱刺激が象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響. *日歯内療誌*. 33(2): 105-112, 2012. 査読有り
- 10). Cho T, Nagao J, Imayoshi R, Imayoshi R, Kodama J, Morotomi T, Kaminishi H: *In Vitro* Efficacy of Continuous Mild Heat Stress on the Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Biofilm Formation. *Biol Pharm Bull*. 35(8): 1371-1373, 2012. 査読有り
- 11). 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 水上正彦, 松本典祥, 春名千英子, 泉 利雄, 阿南 壽: 熱刺激が歯髄由来細胞の増殖能および分化能に与える影響. *日歯保存誌*. 55(5): 304-312, 2012. 査読有り
- 12). 鷺尾絢子, 中川愛加, 廉 晃勲, 西藤法子, 吉居慎二, 平田志津, 市丸美希, 永吉雅人, 矢野淳也, 諸富孝彦, 西野宇信, 寺下正道, 北村知昭: 九州歯科大学附属病院保存治療科を受診した初診患者の調査-2003年度~2010年度-. *九州歯会誌*. 65: 198-204, 2012. 査読有り
- 13). 松本典祥, 水上正彦, 春名千英子, 諸富

孝彦, 泉 利雄, 阿南 壽:破壊されたラット根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain gel の効果の解明. 日歯内療誌. 34(1): 22-28, 2013. 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

- 1). 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 坂上竜司, 阿南 壽:軽度の熱刺激は歯髓由来細胞株の致命的な熱刺激への耐性を誘導する. 第 134 回日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会, 千葉県浦安市(6 月 9, 10 日), 2011.
- 2). 諸富孝彦, 北村知昭, 鷺尾絢子, 寺下正道, 阿南 壽:熱刺激が低栄養条件下で象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響. 第 32 回日本歯内療法学会学術大会, The 9th JEA-KAE Joint Meeting, 長崎市(7 月 30, 31 日), 2011.
- 3). 平田志津, 諸富孝彦, 寺下正道, 北村知昭:NF- κ B 阻害剤は BMP による骨形成を促進する. 第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会, 大阪市(10 月 20, 21 日), 2011.
- 4). 松本典祥, 水上正彦, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 他 6 名:破壊された根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain®gel の効果の解明. 第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会, 大阪市(10 月 20, 21 日), 2011.
- 5). 春名千英子, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 他 7 名:BMS 患者における唾液コルチゾルの評価. 第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会, 大阪市(10 月 20, 21 日), 2011.
- 6). 水上正彦, 阿南 壽, 春名千英子, 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 榮田太郎, 國本俊雄, 福田泰子, 牛尾悟志:ラット根尖病変におけるオフロキサシン貼薬の影響. 第 38 回福岡歯科大学学会総会, 福岡市(12 月 11 日), 2011.
- 7). 松本典祥, 水上正彦, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 他 14 名:破壊された根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain gel の効果の解明. 第 38 回福岡歯科大学学会総会, 福岡市(12 月 11 日), 2011.
- 8). 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 阿南壽:熱刺激後に生存する象牙芽細胞様細胞は増殖能と基質形成能が亢進する. 第 136 回日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会, 沖縄県宜野湾市(6 月 28, 29 日), 2012.

- 9). 平田-土屋志津, 福島秀文, 片桐岳信, 諸富孝彦, 青木和広, 永野健一, 大谷啓一, 寺下正道, 自見英治郎:NF- κ B p65 は Smad4 と結合することで BMP2 による骨芽細胞分化を抑制する. 第54回歯科基礎医学会学術大会, 郡山(9月14, 15日), 2012.
- 10). 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 阿南 壽:象牙芽細胞様株化細胞への軽度熱刺激による熱耐性誘導機構の解析. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会, 広島市(11月22, 23日), 2012.
- 11). 牛尾悟志, 阿南 壽, 松本典祥, 水上正彦, 泉 利雄, 諸富孝彦, 春名千英子, 福田泰子, 逸見晃司, 板屋圭祐:下眼瞼の膨張を伴う歯内-歯周疾患 I 型病変の一症例. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会, 広島市(11月22, 23日), 2012.
- 12). 泉 利雄, 福田泰子, 板屋圭祐, 春名千英子, 松本典祥, 諸富孝彦, 阿南 壽:Strontium 含有試作Bioactive glassの生体親和性. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会, 広島市(11月22, 23日), 2012.
- 13). 春名千英子, 泉 利雄, 諸富孝彦, 他7名:口腔乾燥症患者におけるストレス性内分泌ホルモンの解析. 第137回日本歯科保存学会 2012年度秋季学術大会, 広島市(11月22, 23日), 2012.
- 14). 諸富孝彦:シンポジウム「よみがえる歯髓・歯根膜・根尖歯周組織」断髄後の象牙質-歯髓複合体再生療法の確立を目指して. 第7回日本再生歯科医学会シンポジウム, 北九州市(2月16日), 2013.
- 15). Morotomi T, Kitamura C, Terashita M, Nishihara T, Anan H: Heat-stress induces odontoblast differentiation on clonal dental pulp cell. The 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seattle, Washington, USA (March 20-23), 2013.

[図書] (計 3 件)

- 1). 諸富孝彦(共著):医歯薬出版 歯内治療学 第4版 2012年発行. 3-12.
- 2). 諸富孝彦(共著):医歯薬出版 必修 臨床研修歯科医ハンドブック 第3版 2012年発行. 89-93, 111-112.
- 3). 諸富孝彦(共著):医歯薬出版 歯内療法学 専門用語集 日本歯科保存学会, 日本歯内療法学会編 2013年発行.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸富 孝彦 (MOROTOMI TAKAHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10347677