

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593074

研究課題名(和文)リン酸化プルランによる歯根再生技術の開発

研究課題名(英文)Development of regenerative medicine of tooth root resorption using phosphorylated pullulan

研究代表者

池田 悦子 (Ikeda, Etsuko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：20509012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正治療では、歯の移動に伴って歯根吸収が生じることがある。本研究では、新規生体材料であるリン酸化プルランを応用した、歯根吸収に対する再生医療技術の開発を目指した基盤研究を行った。その結果、リン酸化プルランが細胞動態に及ぼす影響の解明、細胞シーズの獲得、および細胞操作技術の確立が達成され、将来の歯根再生技術確立の実現につながる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Tooth root resorption is one of side effects of orthodontic treatment. In the present study, we have performed the basic research directing development of regenerative medicine of the tooth root resorption using a novel biomaterial, phosphorylated pullulan. As a result, we achieved elucidation of the effects of phosphorylated pullulan on cell activities, acquirement of cell seeds, and establishment of cell manipulation technique. These findings will contribute to establishment of the regenerative medicine of the tooth root resorption in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 リン酸化プルラン 歯根

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療では、歯の移動に伴って、歯の根尖部に吸収性形態変化が生じることがある。この歯根吸収は矯正力の過度なストレスが原因の一つであり、破歯細胞によって歯根が吸収されて歯根の短縮が起こる。しかしながら、現在の歯科医療では、歯根短縮の回復が不可能とされ、歯科再生医療技術を応用した歯根再生法の開発が、歯科医療の基盤を向上させる極めて重要な研究課題であると考えられる。

歯の再生へ応用される再生医療技術の一つとして、細胞の足場となる生体吸収性の担体を歯の形態に成形して、細胞を播種して再構築する組織工学的方法が知られている。細胞工学的方法では、担体の材料の適性が極めて重要である。多糖誘導体リン酸化プルランは、従来品では不可能であった強固な接着性、生体親和性、生体吸収性を特徴とした、新規の生体吸収材料であり、このリン酸化プルランを歯科再生研究に応用することによる組織工学的手法による歯科再生の推進が期待される。

歯根の再生研究として、歯根膜幹細胞の歯周組織の損傷部への細胞移植によってセメント質と歯根膜の複合組織の再生が報告された。また、歯根形態の生体親和性材料を用いて根尖部歯乳頭幹細胞と歯根膜幹細胞を複合させた方法や、歯根膜シートやゼラチンによる歯根膜細胞移植が報告された。このように、歯根再生を目指した研究が活発に推進されているものの、現段階では、セメント質、象牙質、歯根膜の複合組織の部分的な再生が示されるに留まっている。

2. 研究の目的

本研究では、新たな生体材料であるリン酸化プルランを担体とした歯根再生技術の開

発を目指した基礎的知見を得るために、リン酸化プルランが歯根膜細胞に及ぼす生物学的影響の解明を目的とした。また、ヒトから採取可能である分化段階後期の歯組織由来の細胞を用いた歯根再生技術開発を目指した基盤研究を行うため、同時期の発生段階にあると考えられるマウス歯胚の歯乳頭および歯小囊細胞培養系の確立を目指した。さらに、歯根再生に必須な細胞操作技術確立のため、歯根膜細胞シートの作製を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス歯乳頭および歯小囊細胞の培養系の確立

胎生18日齢C57BL6Jマウスの下顎から歯胚を摘出し、ディスパーゼを用いて歯乳頭および歯小囊組織を分離した。得られた歯乳頭組織をコラゲナーゼ処理することにより歯乳頭細胞を単離し、培養を行った。同様の方法で、歯小囊細胞の培養を行った。

(2) リン酸化プルランがヒト歯根膜細胞の増殖および石灰化に及ぼす影響の解析

リン酸化プルランをCaCl₂溶液に溶解した。0、0.1、および1%のリン酸化プルラン溶液を培養プレートに加え、コーティングを行った。リン酸化プルラン溶液を除去した後、第5継代のヒト歯根膜細胞を播種した。37°C、5%CO₂下にて5日間培養後、細胞増殖試験を行った。また、骨芽細胞誘導培地を用いて28日間培養後、アリザリンレッド染色を行った。

(3) 歯根膜細胞シートの作製

ヒト歯根膜細胞を温度感受性ディッシュ上に播種した。3週間培養した後、20°Cでインキュベートすることにより、細胞をディッシュから剥離し、細胞シートとして回収した。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、同様に温度感受性ディッシュ上で培養し、

細胞シートを作製した。さらに、これらの細胞シートを複数枚重ねることにより、重層化細胞シートを作製した。

4. 研究成果

(1) マウス歯乳頭および歯小囊細胞培養系の確立

胎生18日齢C57BL6Jマウスの歯胚から単離した歯乳頭および歯小囊細胞の培養系を確立した(図1、2)。

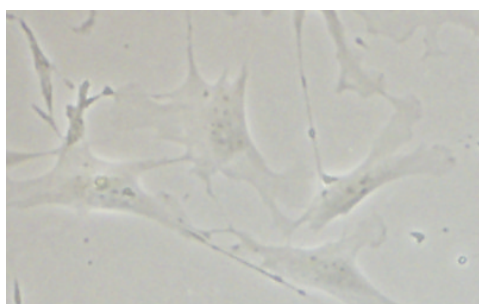


図1. マウス歯乳頭細胞の位相差顕微鏡像

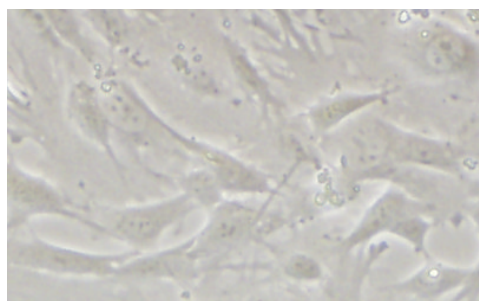


図2. マウス歯小囊細胞の位相差顕微鏡

(2) リン酸化プルランがヒト歯根膜細胞の増殖および石灰化に及ぼす影響

0、0.1、および1%のリン酸化プルランでコートした培養プレート上で、ヒト歯根膜細胞を5日間培養し、細胞増殖を解析した結果、リン酸化プルランの濃度依存的に細胞増殖が促される傾向が示された(図3)。

また、リン酸化プルランコートされた培養プレート上で、ヒト歯根膜細胞を28日間培

養し、アリザリン染色を行った。その結果、リン酸化プルラン濃度依存的に石灰化が亢進する傾向が示された(図4)。

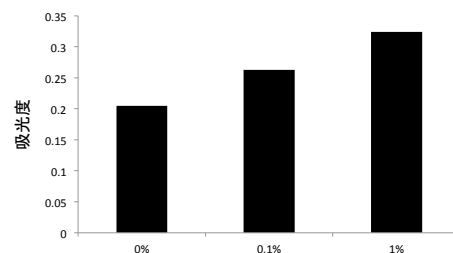


図3. リン酸化プルランがヒト歯根膜細胞増殖に及ぼす影響

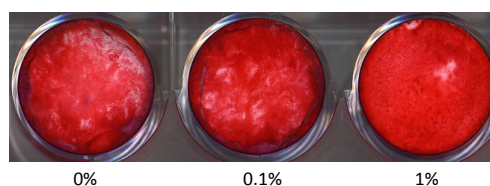


図4. リン酸化プルランがヒト歯根膜細胞の石灰化に及ぼす影響

(3) 歯根膜細胞シートの作製

温度感受性ディッシュを用いて、ヒト歯根膜細胞シートを作製した(図5)。また、同様の方法でHUVECの細胞シートを作製し、これらの細胞シートを複数枚重ねることにより、血管内皮細胞を含む重層化歯根膜細胞シートを作製した。



図5. 歯根膜細胞シートの位相差顕微鏡像

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Masanari Iwasasaki, Masahiro Seiryu, Nobuo Takeshita, Etsuko Ikeda, Yoshihiko Yokoyama, Yusuke Tsutsumi, Teruko Takano-Yamamoto,
The potential of Zr-based bulk metallic glasses for use as biomaterials, The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, 2014年1月20-21日、仙台
- (2) 川津正慶、宿南知佐、滝本昌、岩崎将也、清流正弘、池田悦子、山本照子、歯根膜細胞における伸展刺激二応答した Scleraxis 発現調節メカニズムの解析、第72回日本矯正歯科学会、2013年10月7-9日、松本
- (3) 原真美子、池田悦子、岩崎将也、高野郁子、大島正光、辻孝、山本照子、再生歯胚のサイズに及ぼす IGF-1 の影響、第71回日本矯正歯科学会、2012年9月26-28日、盛岡
- (4) 岩崎将也、池田悦子、原真美子、高野郁子、堤祐介、横山嘉彦、山本照子、歯科医療における Zr 貴金属ガラスの生体材料としての有用性、第71回日本矯正歯科学会、2012年9月26-28日、盛岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 悦子 (Ikeda Etsuko)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20509012

(2) 研究分担者

山本 照子 (Yamamoto Teruko)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00127250

竹下 信郎 (Takeshita Nobuo)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50431515