

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659891

研究課題名(和文) 生体外象牙質を用いた歯周組織の再現

研究課題名(英文) Mimic periodontal tissue by using in vitro dentin

研究代表者

長塚 仁 (NAGATSUKA, Hitoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70237535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在のインプラントは、直接顎骨骨組織に固定して使用されるため、骨吸収やゆるみが生じる問題点がある。本研究では、ハニカムTCPと象牙芽細胞株(TGC)を用いて象牙質とセメント質などの歯周組織を有する、次世代歯周組織再生型インプラントの開発を目的として研究を行った。骨欠損部位に石灰化誘導を行ったTGCとハニカムTCPを移植したところ、ハニカムTCP上に高円柱状の形態を示す細胞が規則正しく配列していた。以上の結果から、TCP等のscaffoldを用いることにより、骨組織形成環境において高度な極性を有する象牙芽細胞様細胞の誘導が可能であり、細胞を用いた歯牙再生医療への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dental implants, which are in widespread clinical use currently, fix directly to the jaw bone tissue, so these current dental implants cause bone resorption or loosening dental implants. In this study, we carried out to develop the next-generation periodontal tissue regeneration implants that had periodontal tissue such as dentin and cementum by using honeycomb TCP and Tooth Matrix-forming GFP Rat-derived Cells (TGCs). When the honeycomb TCP and TGCs that were induced mineralization were implanted into bone defect site, high columnar cells arranged regularly on the honeycomb TCP. This result showed that we were able to induce odontoblast-like cells having high polar by using scaffold such as TCP in the bone formation environment, and also this result showed the possibility of tooth regenerative medicine using cells.

研究分野：口腔病理

キーワード：再生 インプラント 歯周組織 TCP

1. 研究開始当初の背景

現在のインプラントは、直接顎骨骨組織に固定して使用される。そのため咀嚼時の直接的な衝撃、歯槽骨の過大な応力の結果、骨吸収や、ゆるみが生じる問題点がある。上記の問題点を克服し、インプラントをより理想の治療に高めるため、歯根膜付与インプラント体の研究開発などが行われてきた。しかしながら現在のインプラント研究では、材質や表面性状のみを対象としており、象牙芽細胞等の細胞との相互作用に着目した報告はみられない。

一方、生体材料の開発では、生体親和性に優れた生体材料の開発だけでなく、細胞分化の微小環境、足場としての機能にも注目されている。生体材料の素材が全く同一であっても、マイクロメートルオーダーの幾何学的構造が細胞の増殖や分化に大きな影響をあたえることが知られており、それらの現象を応用した新素材の開発も進められている。

2. 研究の目的

申請者は、細胞分化に及ぼす微小環境の重要性に着目し、新規生体材料の開発を行ってきた。その結果、世界で初めて細胞の微小環境を自由に再現可能なハニカム TCP の開発に成功している。本ハニカム TCP は、成分、貫通孔口径、孔数等を任意に設定可能である。また申請者は GFP ラットより象牙芽細胞株(Tooth Matrix forming-, GFP Rat derived Cell (TGC)) の樹立に成功している。本細胞はシート状の形態を示し、石灰化培地において多量のコラーゲン基質産生、DSP 等の歯、骨に関連した遺伝子を発現する。in vivo 条件下においては、象牙質様の硬組織を形成する唯一の細胞株である。

さらに現在までに、骨髄由来幹細胞の多分化能に関する研究を行っており、GFP マウス骨髄細胞移植実験系において、骨髄幹細胞が歯根膜を含む歯周組織構成細胞に分化することを確認している。

そこで本研究では、申請者が樹立した TGC およびハニカム TCP を用いて細胞間相互作用を利用し象牙質、歯根膜等からなる完全な歯周組織を構築可能な、次世代歯周組織再生型インプラント開発のための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 象牙芽細胞の培養

培養細胞は以前の研究において樹立した Tooth Matrix forming-, GFP Rat derived Cell (TGC) を用いた。TGC の培養は抗生剤を添加した 10%FBS を含む Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) を用いて、37 度で二酸化炭素濃度 5% の条件下で行った。培地は

3 日毎に交換し、細胞がコンフルエントに達した時期に経代を行った。

(2) ハニカム TCP の作製と生体反応

TCP は CaCO_3 と $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 粉末を 1:2 の割合で混和、ボールミルにて蒸留水とともに 24 時間粉碎混合させスラリーを作製した。スラリーを乾燥後、1100、1150、1200、1250、1300、1500 度の異なる温度で焼成作製した。作製したハニカム TCP は X 線回折法を用いて位相解析を行なった。X 線回折は (XRD BRUKER D8 Advance) を用いて行った。X 線分析後のハニカム TCP はマウス骨欠損部に埋入し、炎症等の生体反応について観察した。その後、最も生体親和性の高かった TCP を選択し、TCG と共に培養を行い細胞形態の観察を行った。

(3) ハニカム TCP の形状が象牙芽細胞の分化に及ぼす影響

コンフルエントに達した TGC にアスコルビン酸、 β -グリセロリン酸を添加した石灰化培地にて処理を行い、マトリゲルと混和した後、ハニカム TCP 孔内に充填し SCID マウス大腿部筋中に移植した。用いたハニカム TCP は、1200 度で焼成した孔径 75、300、500 μm の内径の異なる貫通孔を有する試料を用いた。移植後 3 週目に摘出、定法にて固定、パファフィン切片を作製、HE 標本作製し組織学的解析を行った。

(4) 骨組織形成環境中および TGF- β 存在下における象牙芽細胞分化

TGC と骨組織形成環境中における影響について観察するため、ハニカム TCP 孔内にマトリゲルと共に β -グリセロリン酸にて石灰化誘導、および TGF- β を用いて誘導を行った細胞を充填し埋入体を作製した。ハニカム TCP は厚さ 1 mm に直径 300 μm の貫通孔を形成した試料を使用した。埋入体は SCID マウス顎骨骨組織にダイヤモンドバーで約 1 ミリの骨欠損を作製、骨欠損部に接触するように移植した。移植した埋入体は 2、4 週後に摘出、定法にて標本作製、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ハニカム TCP の作製と生体反応

1100 から 1500 度の各焼成温度で作成したハニカム TCP は X 線回折法において解析したところ、1200 度以下では β 型のみ検出された。しかし 1250 度以上では α 型が検出され、温度上昇に伴い α 型含有量が増加する傾向が認められた。ハニカム TCP の構造は 1100 度では顆粒状の粒子構造が破断面および表面に観察され、小さな間隙を有してしていたが、焼成温度の上昇に伴い、粒子同士が融合し大きくなる傾向が認められた。

八ニカムTCPが生体におよぼす影響について検討したところ、焼成温度1100度では、激しい異物反応が生じた。しかし1200度までは温度の上昇に伴って炎症反応が減少する傾向が認められ、1200度では新生骨組織が形成された。1250度では再び炎症反応が強くなり、焼成温度が上昇するにつれて炎症反応が増加する傾向が認められた。以上から1200度で焼成した八ニカムTCPが最も象牙質形成に適した材料であると考えられた。1200度で焼成作製した八ニカムTCPと象牙芽培養細胞を培養、検討した結果、形態から細胞の性格には大きな相違は認められなかったことから、培養条件下において細胞毒性等の影響はないものと思われた。

(2) 八ニカム TCP の形状が象牙芽細胞の分化に及ぼす影響

八ニカムTCPの様々な形状、細管の内径等が生体におよぼす影響について検討した。その結果、孔径75、300、500 μ mの全ての八ニカムTCP孔端およびTCP外面周囲に象牙質様硬組織形成が認められた。しかし孔内部には粘液様の間質を伴った紡錘形細胞侵入が認められるのみで、硬組織の形成は認められなかった。各八ニカムTCPの孔径の違いによる硬組織形成様式に大きな差は認められず、これらのサイズの孔径では細胞に及ぼす影響は極めて限定的であると考えられた。細胞の極性に焦点を絞って観察してみると、八ニカムTCP表面に形成した象牙質様硬組織では、部分的ではあるがTCP細粒の極小さな間隙に細胞突起を伸ばしている細胞が規則正しく配列していた。またこれら細胞の一部では細胞核は八ニカムTCPと接触した反対側に局在しており、極性を有する細胞分化が生じたことを示唆する像が認められた。これらの組織学的所見は八ニカムTCPに骨組織を誘導した際には観察されず、TGCに特異的な象牙芽細胞様の性格を示すと考えられた。

(3) 骨組織形成環境中および TGF- β 存在下における象牙芽細胞分化

TGCと骨組織形成環境中およびTGF- β 存在下における反応性について観察を行った。TGCをTGF- β で誘導を行った試料においては、TGCは八ニカムTCP上で塊状の組織を形成し、塊状組織の周囲で極性の認められる細胞を認めたが、大部分において不規則な細胞配列であった。TGCを β グリセロリン酸で石灰化誘導を行った試料においては、TGCは八ニカムTCP上にほぼ一層の細胞層をなして接触しており、細胞は高円柱状を示し核はTCPと反対側に位置し高度に極性を示していた。しかしながら骨組織との直接の結合性は認められず、セメント質や歯根膜等の歯周組織の明らかな形成は認められなかった。以上の結果から、骨組織形成環境中において八ニカムTCP等のscaffoldを用いることにより、高度な極性を有する象牙芽細胞様細胞の誘導が可

能であり、細胞を用いた歯牙再生医療への可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8件)

. Takabatake K, Yamachika E, Tsujigiwa H, Takeda Y, Kimura M, Takagi S, Nagatsuka H, Iida S. Effect of geometry and microstructure of honeycomb TCP scaffolds on bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 査読有, 102(9):2952-2960. 2014. doi: 10.1002/jbm.a.34966.

. Shoumura M, Matsuda S, Osuga N, Nakano K, Tsujigiwa H, Kawakami T. Mouse Subcutaneous Tissue Reaction to Calcium Hydroxide-based Root Canal Filling Material. *J Hard Tissue Biology*. 査読有, 23(4):435-438. 2014. doi.org/10.2485/jhtb.23.435

. Yuan Y-W, Tamamura R, Lei L, Katase N, Ara S G, Ito S, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. The Ability of Transplanted Bone Marrow-Derived Cells to Differentiate into Parenchymal Cells of Salivary Glands. *J Hard Tissue Biology*. 査読有, 22(4):433-438. 2013. doi.org/10.2485/jhtb.22.433

. Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Okafuji N, Nagatsuka H, Kawakami T. Promotion of Transplanted Bone Marrow-derived Cell Migration into the Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress. *Int J Med Sci*. 査読有, 10(10):1321-1326. 2013. doi: 10.7150/ijms.6631.

. Noda Y, Nishizaki K, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Yamada M. The engraftment and differentiation of transplanted bone marrow-derived cells in the olfactory bulb after methimazole administration. *Acta Otolaryngol*. 査読有, 133(9):951-956. 2013. doi: 10.3109/00016489.2013.803153.

. Tsujigiwa H, Katase N, Lefevre M, Yamachika E, Tamamura R, Ito S, Takebe Y, Matsuda H, Nagatsuka H. Establishment of odontoblastic cells, which indicate odontoblast features both in vivo and in vitro. *J Oral Pathol Med*. 査読有, 42(10):799-806. 2013. doi: 10.1111/jop.12080.

. Tsujigiwa H, Hirata Y, Katase N, Buery RR, Tamamura R, Ito S, Takagi S, Iida S, Nagatsuka H. The Role of Bone Marrow-Derived Cells During the Bone

Healing Process in the GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model. Calcif Tissue Int. 査読有, 92(3):296-306. 2013.
doi: 10.1007/s00223-012-9685-3.

Nagatsuka H, Siar CH, Tsujigiwa H, Naomoto Y, Han PP, Gunduz M, Sugahara T, Sasaki A, Nakajima M. Heparanase and cyclooxygenase-2 gene and protein expressions during progression of oral epithelial dysplasia to carcinoma. Ann Diagn Pathol. 査読有, 16(5):354-61. 2012.
doi:10.1016/j.anndiagpath.2012.02.004.

[学会発表](計13件)

伊藤 聡、辻極秀次、武部祐一郎、高島清文、河合穂高、長塚 仁 . 移植骨髄由来細胞の唾液腺組織への移行、分化に関する研究 . 第 59 回公益社団法人口腔外科学会総会・学術大会 2014 年 10 月 18 日 千葉

高島清文、辻極秀次、武部祐一郎、伊藤 聡、藤井昌江、河合穂高、于 湊、長塚 仁 . 八二カム β -TCP を用いた細胞外微小環境再現による硬組織再生 . 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 27 日 福岡

高島清文、辻極秀次、山近英樹、武部祐一郎、高木 慎、飯田征二、長塚 仁 . 硬組織形成過程における細胞外微小環境としての八二カム TCP . 第 68 回口腔科学会学術大会 2014 年 5 月 9 日 大阪

伊藤 聡、片瀬直樹、玉村 亮、武部祐一郎、山近英樹、高木 慎、長塚 仁 . 八二カム β -TCP 細胞外微小環境下での硬組織形成 . 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2013 年 10 月 12 日 福岡

河合 穂高、辻極 秀次、伊藤 聡、中野敬介、于 湊、川上 敏行、長塚 仁 . 骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与 . 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013 年 9 月 22 日 岡山

辻極秀次、伊藤 聡、片瀬直樹、玉村 亮、于 湊、李 海テイ、武部祐一郎、河合穂高、長塚 仁 . 硬組織形成過程における細胞外微小環境としての八二カム β -TCP . 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 24 日 栃木

伊藤 聡、玉村 亮、片瀬直樹、長塚 仁 . TCP を用いた頭頸部領域の骨組織再建 . 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2012 年 10 月 19 日 横浜

辻極秀次、片瀬直樹、飯田征二、長塚 仁 . 骨治癒過程における骨髄由来細胞の動態

および機能解析 . 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012 年 9 月 16 日 福島

富田美穂子、中野敬介、村岡理奈、中村貴美、浅沼直和、辻極秀次、長塚 仁、川上敏行 . メカニカルストレスが骨髄由来細胞の歯周組織への移動に及ぼす影響 . 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012 年 9 月 16 日 福島

長塚 仁 . インプラントの骨組織反応と将来への展望 . 日本再生歯科医学会 設立 10 周年記念セミナー 2012 年 9 月 2 日 神戸

袁 瑶薇、辻極秀次、玉村 亮、片瀬直樹、于 湊、李 海婷、長塚 仁 . 骨髄由来細胞の唾液腺組織構成細胞への分化能についての検討 . 第 21 回硬組織再生生物学会学術大会・総会 2012 年 8 月 25 日 愛知

Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nagatsuka H, Kawakami T. Transplanted bone marrow-derived cell migration into periodontal tissue induced by orthodontic mechanical stress. 24th International congress of the transplantation society July 16 Berlin, Germany 2012

Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Asanuma N, Nagatsuka H, Kawakami T. Migration of the transplanted bone marrow-derived cells into periodontal ligaments due to orthodontic mechanical stress. Physiology 2012 July 3 Edinburgh, UK 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長塚 仁 (NAGATSUKA Hitoshi)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号 : 70237535

(2)研究分担者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号 : 70335628

玉村 亮 (TAMAMURA Ryo)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号 : 00403494

片瀬 直樹 (KATASE Naoki)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 30566071

山近 英樹 (YAMACHIKA Eiki)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号 : 10294422