

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10105

研究課題名(和文) 歯と歯周組織同時再生治療の臨床応用への発展 - 歯の幹細胞の可能性 -

研究課題名(英文) Development of simultaneous regeneration of tooth and periodontal tissue for clinical application - Potential of dental stem cells -

研究代表者

芳澤 享子 (Yoshizawa, Michiko)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60303137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマウス臼歯の皮下移植モデルと骨再生法を併用することで、歯の移植と同時に骨再生を図った。マウス臼歯を抜去し、同系マウスの脛骨と大腿骨の骨髓より単核球分画(MNC)を分離し、骨組織よりCB-MSCsを分離しスフェロイド培養した。歯の移植にアテロコラーゲン群、アテロコラーゲンとMNC群、アテロコラーゲンとCB-MSC群と、歯のみ移植群の4群を設定し、術後4週で摘出し検討した。全群で移植歯周囲に骨形成を認め、特にCB-MSC群は顕著な骨再生と歯根外側にも骨形成を認め、いずれに群でも移植歯周囲に歯根膜様膠原線維を認めた。以上より、歯の移植と同時に歯槽骨の増生および歯根膜の再生が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の移植は、機能していない歯を活用し、移植後に良好な治癒が得られれば正常歯と同様に機能することから、有用な治療法の一つである。しかしながら、成人の歯の移植では、歯根膜再生能力はあるものの、失われた歯周組織再生能力までは有しておらず、歯移植の成功には受容部の十分な骨と歯肉が不可欠である。本研究では、失われた歯周組織と歯の同時再生をめざす新たな歯の移植治療の開発を目的としたところ、骨再生療法を応用した皮下移植モデルにおいて良好な歯周組織再生が認められた。さらに検討を進めることで、歯の移植が困難であった症例にも適応が拡大でき、高齢になっても自分の歯で食事をしたいというニーズに応えることができる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of bone tissue engineering simultaneously with tooth transplantation to enhance the width of the alveolar bone. Bone marrow mononuclear cells or cortical bone-derived mesenchymal stromal cell spheroids (CB-MSCs) were seeded onto atelocollagen sponge and transplanted with freshly extracted molars from mice. New bone formation around the tooth root was evaluated using micro-computed tomography and histological analysis. Tooth alone, or tooth with scaffold but without cells, was also transplanted and served as controls. Micro-computed tomography showed remarkable bone formation outside the root was observed in CB-MSC group. Histological analysis revealed that the space between the new bone and the root was filled with collagen fibers, indicating that the periodontal ligament was maintained. This study demonstrates the potential of simultaneous alveolar bone expansion employing bone tissue engineering approach using CB-MSCs for tooth transplantation.

研究分野：口腔顎顔面再建外科学

キーワード：再生医療 歯 歯周組織

1. 研究開始当初の背景

組織工学的アプローチによる歯の再生はいまだ臨床応用に到達できていない。歯の移植は、機能していない自分の歯を活用し、移植後に良好な治癒が得られれば正常歯と同様に機能するため、歯の欠損に対する有用な治療法の一つである。わが国では歯根完成歯移植が多いが、歴史的には北欧でみられるように歯根未完成歯移植が多く、歯根吸収の有無、歯根成長、歯髄の血行再生などの成功基準に関する多くの研究がなされてきた(Andreasen JO. Eur J Orthod 1990, Schwartz O. Int J Oral Surg 1985)。一方、歯根完成歯移植では、その特有な成功基準に関してほとんど議論されてこなかった状況下で、我々は1,000例以上の歯根完成歯移植症例を解析し、その結果、歯根完成歯は歯根未完成歯のような歯槽骨再生能力は有しておらず、歯根完成歯移植の成功には十分な歯槽骨が不可欠であることを示した(Aoyama S, Yohshizawa M, Niimi N, et al. OS OM OP OR Endo 2012)。近年、歯胚移植による歯の発育と歯周組織を同時に再生させる試み(Plakwicz P, et al. Am J Orthod Dentofac Orthop 2016)もあるが、適応できる時期や不確実な予後より汎用性は低い。また、狭小な歯槽骨幅に対してインプラント治療のように骨増生という選択肢もあるが、移植歯は歯根形態や弯曲などの個体差が大きく、予知性のある必要十分な形態を有する骨増生は困難である。そのため我々は歯の移植と骨再生療法の融合を検討してきた。骨再生療法は間葉系幹細胞(MSCs)と生体材料による組織工学的手法がすでに数多く行われ(Yamada Y. Stem Cells 2013)、我々の研究グループでも臨床応用している(Kagami H. Oral Dis 2015)。この手法を応用し、歯の移植に骨髄単核球細胞(MNC)とβ-TCPブロックを併用した動物モデルを開発したところ、歯根周囲には十分な骨再生が得られた。ただし残念なことに、β-TCPブロックは賦形性に劣り、MNCによる骨再生促進効果も不確かであり、歯根の骨性癒着も認め、臨床応用には課題が残った。

2. 研究の目的

本研究では、優れた幹細胞性と高い骨再生能を有することが報告されている皮質骨由来多能性間質細胞(Compact bone-derived mesenchymal stromal cells: CB-MSCs)を浮遊培養することで得られるスフェロイドと賦形性に優れたコラーゲンスポンジを担体として採用することで、より臨床応用に適した歯の移植と歯周組織同時再生療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 歯根未完成歯移植モデルの作製

実験動物

C57BL/6J 雄マウスおよび C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid mice (SCID)雄マウス

担体

アテロコラーゲンスポンジ(テルブラグ® S サイズ, オリンパステルモバイオマテリアル株式会社)を直径 8 mm, 高さ 5 mmの半円形に成型した。断面には歯牙を挿入するための陥凹を形成し、一晩 UV 照射を行い滅菌後使用した。

抜歯

3 週齢 C57BL / 6J 雄マウス 30 匹より歯および細胞採取した。ペントバルビタールを腹腔内に過量投与し、安楽死させた後、直ちに根管充填用ピンセットにて上顎の第 1 臼歯 (M1) と第 2 臼歯 (M2) を抜去した。歯の形成段階は Moorrees らの分類で R3/4 であった。実体顕微鏡で歯根膜の状態を確認した。

CB-MSCs スフェロイドの作製

同マウスから脛骨と大腿骨を剖出し、骨髄細胞を採取した。MNC の分離には、密度勾配遠心分離法を用いた。CB-MSCs は、MNC の抽出後に残った骨組織より得られた細胞の 2 継代目の細胞を 55 mm 径の自発的スフェロイド形成用培養ディッシュに 1.5×10^4 細胞 / cm^2 の密度で播種した。播種 24 時間後に CB-MSCs スフェロイドを回収し、凍結保存液中で使用直前まで -80°C にて保管した。使用直前に 38°C のウォーターバスにて急速融解した。

細胞 - 担体複合体作製と移植

6~8 週齢の SCID 雄マウス 29 匹を Tooth 群, Collagen 群, MNC 群, CB-MSC 群の 4 群にランダムに割り当てた(n=7~8)。Tooth 群はアテロコラーゲンを使用せず、抜去した歯のみを移植し

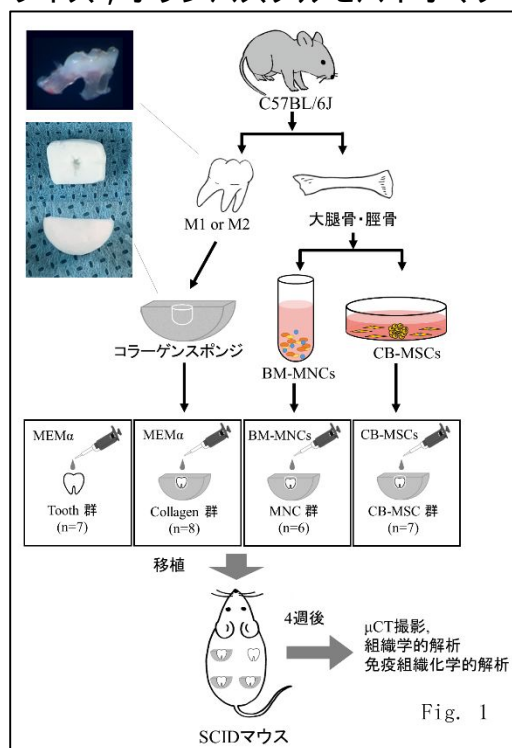


Fig. 1

た。Collagen 群では、抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、50 μ l の培地を滴下して移植した。MNC 群では、抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、 1.0×10^6 個の MNC を播種して移植した。CB-MSC 群では、MNC 群と同様に抜去した歯をアテロコラーゲン内に挿入し、 1.0×10^6 個の CB-MSCs スフェロイドを播種後に背部皮下に移植した。担体のみおよび、担体に CB-MSCs スフェロイドを播種したものも移植した。移植後 4 週間でマウスを安楽死させ、移植物を摘出した。

マイクロ CT (μ CT) 撮影および骨形態計測

移植物を μ CT を用いて撮影した。使用した形態計測パラメータは、骨組織体積 (TV), 骨体積 (BV), 骨表面積 (BS), 骨密度 (BV/TV), 骨梁数 (Tb.N), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁間隙 (Tb.Sp), 骨梁中心距離 (Tb.Spac), フラクタル次元, ストラクチャーモデルインデックス (SMI) および骨パターンファクター (TbPf) である。なお, TV, BV/TV については, 全体に加えて, 歯根の外側と内側 (歯根間部) に分けて解析を行った。

組織学的および免疫組織化学的解析

10%緩衝パラホルムアルデヒド溶液で固定されたサンプルを脱灰後パラフィンに包埋した。5 μ m に薄切し, ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色, マッソントリクローム染色と TRAP 染色を行った。さらに骨芽細胞のマーカーとして抗 SP7 抗体 (Anti-Sp7/Osterix antibody ab22552, アブカム) を用いて免疫組織化学的に検索した。(Fig. 1)

統計分析

Easy R (EZR) v3.4.1 ソフトウェアを統計分析に使用した。データは平均 \pm 標準偏差 (SD) として表した。データは, 一元配置分散分析を行い, 事後検定として多重比較に Tukey-Kramer 検定を行った。p<0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

μ CT および形態計測分析

すべての群で移植歯周囲に骨様の不透過性組織を認めた (Fig. 2A-D)。Tooth 群では新生骨様組織は歯根間にほぼ限定されていたが, Collagen 群と MNC 群では, 一部歯根外側にも新生骨様組織を認めた。CB-MSC 群では歯根外側から歯冠周囲にも新生骨様組織が認められた。

TV は, 海綿骨と隣接する骨髓腔を含む組織の体積であり, BV は海綿骨の体積を, BS は骨の表面積を表す。TV, BV, および BS は, Tooth 群と Collagen 群, および Tooth 群と MNC 群とでは有意差を認めず, Collagen 群と MNC 群との間でも有意差は認められなかった (Fig. 2E-G)。一方, Tooth 群, Collagen 群, MNC 群と比較して, CB-MSC 群の TV, BV, BS は有意に大きかった (p<0.01)。骨密度を表す BV/TV は, すべての群間では有意差を認めなかった (Fig. 2H)。

次に, 骨様組織の分布を検討するために, 歯根外側領域と歯根間領域とに分けて評価した。歯根外側領域における TV (TVo) は, Tooth 群と Collagen 群, および Tooth 群と MNC 群とでは有意差を認めず, Collagen 群と MNC 群との間でも有意差は認められなかった (Fig. 2I)。一方, Tooth 群, Collagen 群, MNC 群と比較して, CB-MSC 群では有意に大きかった (それぞれ p<0.05, p<0.01, p<0.05)。歯根外側領域における TV/BV (BVo/TVo) は CB-MSC 群で比較的小さい値であったが, いずれの群においても有意差は認めなかった (Fig. 2J)。歯根間領域における TV (TVr) と BV/TV (Bvr/TVr) は, すべての群間で有意差を認めなかった (Fig. 2K, L)。また, TVo と TVr のパーセンテージを比較すると, CB-MSC 群を除く 3 群では TVo は 60% 程度とおおむね一定であったのに対し, CB-MSC 群では TVo は約 90% と歯根外側領域への骨様組織の新生が顕著であった (Fig. 2M)。

次に, マイクロ CT 画像を使用して骨梁構造を比較した。CT スライス画像からは, 3D 再構成画像と同様に, すべての群で歯の周囲に骨様の不透過像を認めた (Fig. 3A-D)。歯根間領域の骨梁構造には群間で明らかな差を認めなかったが, CB-MSC 群の歯根外側領域の骨様組織はやや疎であり, 骨梁間の連結も少なかった。

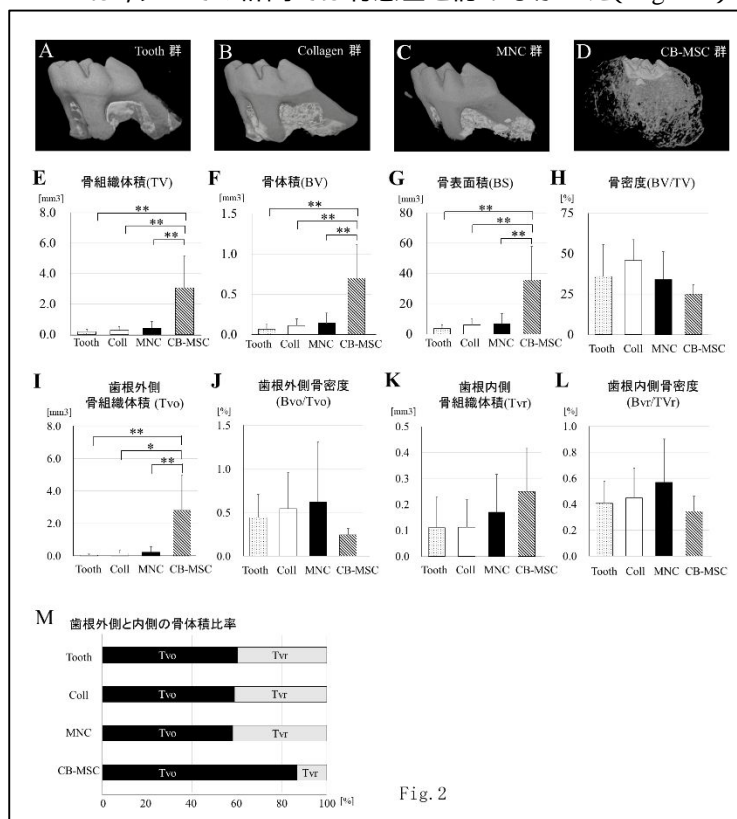
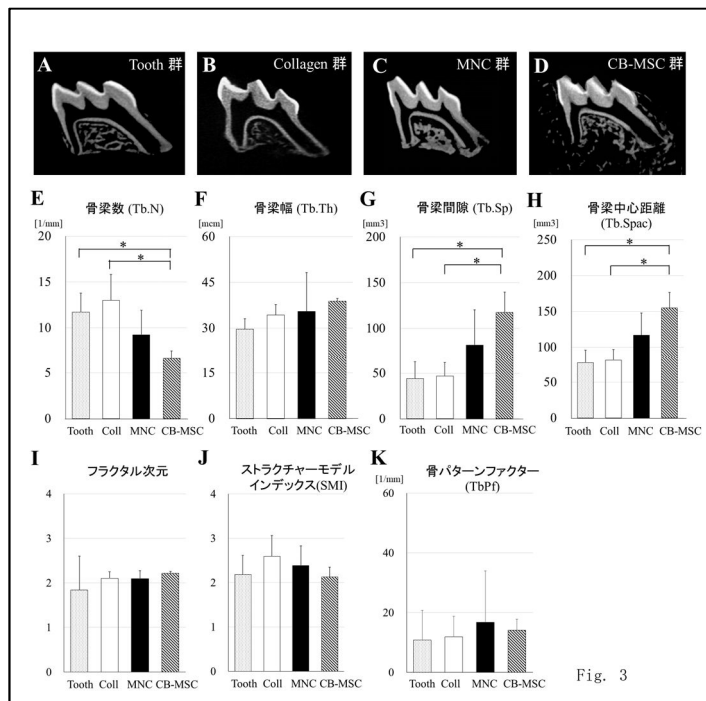


Fig. 2

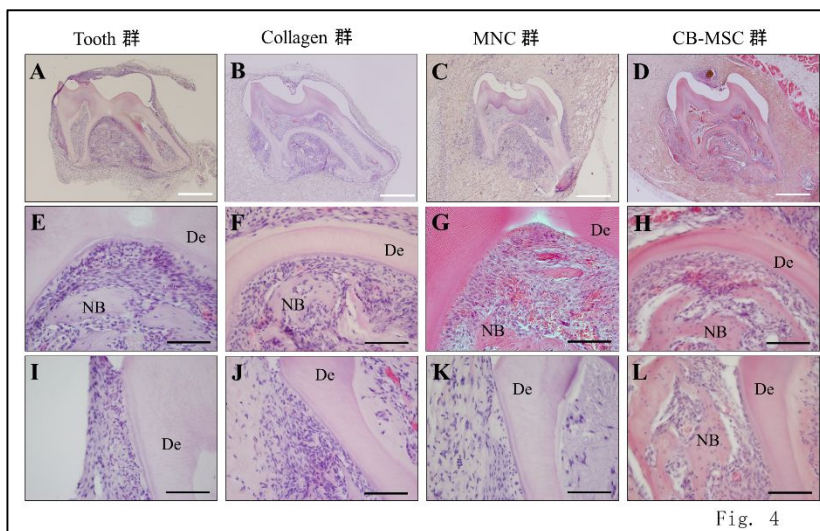
さらに、TRI / 3D-BON を用いて骨梁構造を定量的に解析した(Fig. 3E-K) . Tb.N は単位距離あたりに存在する骨梁の平均数を表し、Tb.Th.は領域内の骨梁幅の平均を示す . Tb.Sp は骨梁間の平均距離を表し、Tb.Spac は骨梁中心距離の平均を表す .Tb.N が Tooth 群、Collagen 群と比べてCB-MSC 群で有意に少なかった ($p < 0.05$) (Fig. 3E) .一方、Tb.Th.にはすべての群間で有意差は認められなかった (Fig. 3F) . Tb.Sp, Tb.Spac では、Tooth 群、Collagen 群と比べてCB-MSC 群で有意に大きい値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 3G, H) .

フラクタル次元は、骨表面の不規則性の複雑さの程度を表す SMI は骨梁の構造の指標であり、理想的な板状の場合は 0、棒状の場合は 3、球状の時は 4 とし、その混合状態を中間値で示す . TBPf は 3D 空間上で骨梁の表面近傍体積の変化に対する表面積の変化量を計算したものであり、凹面構造の多い骨梁は負となり凸面構造の多い骨梁は正の値を示す .すべての群間で、フラクタル次元、SMI、TBPf は有意差を示さなかった (Fig. 3I-K) .



組織学的および免疫組織化学的検討

HE 染色により、4 群とも歯根間領域を中心として新生骨 (NB) を認めた (Fig. 4A-D) . 新生骨は歯根周辺に見られたが、CB-MSC 群のみ歯から離れた部位にも骨形成が認められた(Fig. 4D) . 一部の標本では、根尖部の象牙質に連続する肥大したセメント質様硬組織形成を認めた(Fig. 4B) . これらの根尖部付近においては、セメント質様組織と NB との境界は不明瞭であり、すべての群で認められた . 根分岐部周辺では、NB と歯根象牙質 (De) とは不連続であり、De 表層のセメント質と NB の間には結合組織が介在していた (Fig. 4E-H) . 各群間での違いは認められなかった . 歯根外側では De 周囲に結合組織が分布していた (Fig. 4I-L) . 歯根外側に新生骨が多く見られた CB-MSC 群では、根分岐部と同様に NB と De 間には結合組織が介在し、歯根との癒着は認められなかった (Fig. 4L) .



< 免疫組織化学 >

すべての群で骨再生が顕著な根分岐部付近では、新生骨周囲に多くの SP7 陽性細胞が認められ、群間の違いは明らかではなかった (Fig. 5A~D) . 歯根外側において、CB-MSC 群では新生骨部で SP7 強陽性の細胞が認められたが(Fig. 5D) , 他群では新生骨は少なく、結合組織中には SP7 弱陽性細胞が分布していた (Fig. 5C) . TRAP 染色では、これまでの実験から陽性細胞が確認されていたサンプル (β -TCP を担体として CB-MSCs を播種し、ヌードマウスの背部皮下に移植後 4 週で取り出した標本) を陽性コントロールとした (Fig. 5E) . 同時に行った染色では、いずれの群においても、TRAP 陽性細胞は認められなかった (Fig. 5F~I) . HE 染色による標本を用いて、形態学的に破骨細胞様の形態を示す多核巨細胞を検索したが、Collagen 群のごく一部に認められたのみであり (Fig. 5J) , 他の標本では明らかな多核の破骨細胞様の細胞は認められなかった .

< マッソントリクローム染色 >

4 群とも移植歯周囲には膠原線維が認められた (Fig. 6A~D). 歯根分岐部では, 新生骨と歯根表層のセメント質間に歯根膜様の膠原線維が走行し, 一部では歯根には垂直に入り込む像が認められた (Fig. 6E~H). 歯根外側でも膠原線維の走行は認められ, CB-MSc 群では新生骨と歯根との間に介在していた (Fig. 6I-L).

5. まとめと考察

コラーゲン担体のみを歯と移植した群では, 歯のみを移植した群と比較して骨新生の増加は見られなかった. アテロコラーゲンスポンジそのものには骨形成能や骨分化能はなく, β -TCP

と比較すれば骨誘導能も低いことを反映している. しかしながら, 骨欠損の形態に応じて柔軟に形態を合わせることができるコラーゲンスポンジの操作性の良さは明らかであり, 骨再生用の担体として使用することが可能となれば, 今後自家歯牙移植への臨床応用には有利であろう.

骨形成性細胞として CB-MSCs 由来スフェロイドを用いた. CB-MSc 群では Collagen 群と比較して有意に新生骨量が増加した. 近年の研究から, CB-MSCs 中の骨形成性細胞は, これまで骨再生に広く利用されてきた骨髄間質細胞と比較しても高い骨分化能や骨形成能を持つことが知られている. さらに, CB-MSCs を 3 次元培養して得られたスフェロイドを本研究では用いているが, これは平面培養された CB-MSCs よりさらに高い骨分化能と骨形成能を持つ. 吸収期間が短いアテロコラーゲンスポンジを担体として骨再生に用いる場合には, CB-MSCs スフェロイド, あるいはそれと同等の高い骨形成を有する細胞を使用が必要と考えられた. その一方で, CB-MSCs 群では Collagen 群と比較して骨量の増加は見られたものの, 骨梁解析の結果からは Tb.N の減少と Tb.Sp や Tb.Spac の増加が見られた. これは比較的疎な骨梁が形成されていることを意味しているため, 移植歯の安定性については不利な条件と考えられる. 歯槽骨の状態はリモデリングによって応力の影響を受けるため, より長期間の経過観察によって再生骨の成熟の程度を見る必要がある.

CB-MSc 群以外のすべての群において, 歯根間領域を中心とした骨新生が認められ, この部分では歯根膜由来の骨形成細胞が重要な役割を果たしていることが推測された. CB-MSc 群以外では歯根間領域と歯根外側領域とで骨形成能の違いが見られた. この原因は不明だが, ティッシュエンジニアリングによる組織再生には, 細胞や担体の他に生理活性物質が必要とされている. 細胞が骨形成の方向に誘導されるためには, 骨形成性蛋白などが必要であるが, 歯根間といった比較的閉鎖的な空間では, このような骨形成性因子が保持されやすかったものと考えられた.

新生骨と歯根の間には膠原線維が存在し, 一端は歯根に嵌入している像が認められたことから, これらは未熟な歯根膜と考えられた. アテロコラーゲンスポンジを歯の移植の担体として用いることは, 操作性のみならず, 骨性癒着の予防からも歯の移植には有利であると考えられた.

本研究の結果から, CB-MSCs スフェロイドとアテロコラーゲンスポンジによる担体を併用することで, 歯の移植と同時に歯槽骨の増生が得られる可能性が初めて示された. CB-MSCs の採取は歯科領域でも容易であり, 5 mm 程度のわずかな骨片からでも十分な細胞数が得られる. また, 賦形性に優れたアテロコラーゲンスポンジとの組み合わせで骨新生が見られたことから, 今後臨床的にも応用可能な技術となることが期待される.

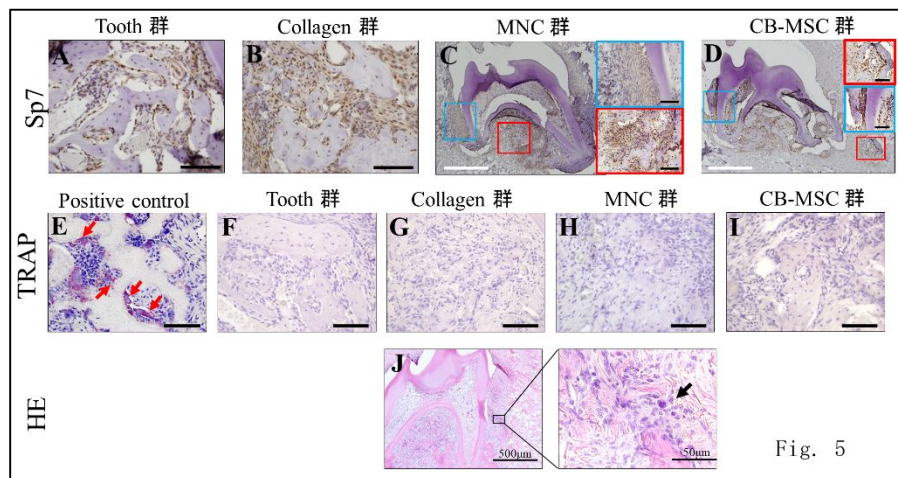


Fig. 5

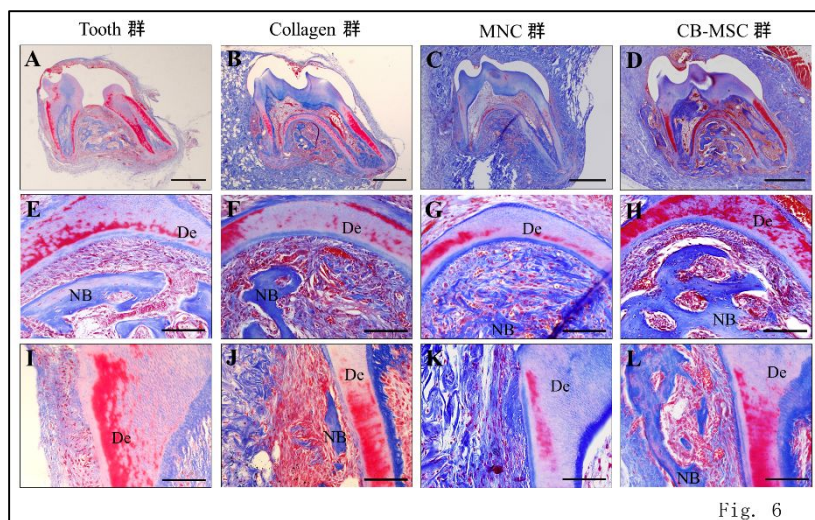


Fig. 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumura N, Li X, Uchikawa KE, Li N, Dong H, Chen K, Yoshizawa M and Kagami H	4. 巻 19
2. 論文標題 Tissue engineering with compact bone-derived cell-spheroids enables bone formation around transplanted tooth.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Eng Regen Med	6. 最初と最後の頁 377-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13770-021-00423-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村奈穂美、李 憲起、北谷（内川）恵里、董 宏偉、芳澤享子、栗原祐史、各務秀明
2. 発表標題 皮膚骨由来細胞スフェロイドは移植歯周囲への骨形成を促進する
3. 学会等名 第64回NPO法人日本口腔科学会中部地方部会 2021年10月（オンデマンドWEB開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村奈穂美、李 憲起、内川恵里、芳澤享子、各務秀明
2. 発表標題 マウス歯牙移植モデルにおいて骨髄単核球細胞が歯周組織再生に及ぼす効果
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会（インターネット学術集会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内川恵里、李 憲起、松村奈穂美、芳澤享子、各務秀明
2. 発表標題 骨髄由来単核球を用いた歯の移植に関する基礎的研究
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会（インターネット学術集会）
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
研究分担者	新美 奏恵 (Niimi Kanae) (20397136)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	
研究分担者	李 憲起 (Li Xianqi) (60350831)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	
研究分担者	各務 秀明 (Kagmi Hideaki) (80242866)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授 (33602)	

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
---------	---------