

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390359

研究課題名（和文） 歯根膜を有した次世代型人工歯根の開発

研究課題名（英文） Development of next-generation artificial tooth root including periodontal ligament

研究代表者

前田 英史（MAEDA HIDEFUMI）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10284514

研究成果の概要（和文）：

天然歯に近い歯根膜組織を有した次世代型インプラント体の開発を目的とした。本研究において、カルシウム刺激が当研究室で樹立した2種類の未分化なヒト歯根膜細胞株の増殖と骨系細胞への分化誘導作用があることを明らかにした。そこでラット脛骨骨窩洞内へハイドロキシアパタイトの円柱(HAp)とともに未分化なヒト歯根膜細胞を移植した結果、HAp 周囲に、移植細胞に由来した骨様硬組織形成とその周囲に歯根膜様線維組織の形成が観察された。つぎに同ラットの抜歯窩骨窩洞内に埋入した結果、歯根膜様組織の形成が認められた。以上より、HAp および未分化な歯根膜細胞との骨への移植によって歯根膜様組織を有した人工歯根を具現化可能な結果と手段が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In the present study we aimed to develop the next-generation implant close to natural teeth. Our recent study revealed that calcium stimuli promoted the proliferation and osteogenic differentiation of undifferentiated human periodontal ligament (PDL) cell lines. So we prepared the HAp column, and then attached and grew cell lines on its surface. These column-cell complexes were implanted into rat bone cavity. After 4 weeks later, new bone-like tissue and PDL-like fibrous tissues were formed around HAp columns. We also implanted these complexes into healed bone cavity prepared after extracting molar of rats. After 4 weeks of implantation, PDL-like fibrous tissues were observed around HAp. These results indicated that implantation using HAp and undifferentiated PDL cells might lead to develop the implants retaining PDL tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4700000	1410000	6110000
2011年度	7500000	2250000	9750000
2012年度	2600000	780000	3380000
年度			
年度			
総計	14800000	4440000	19240000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療学

キーワード：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

近年、歯を喪失した部位へのインプラン

ト体による治療が主流となりつつあるが、インプラント治療の欠点としては、①歯根膜組織がないために咬合の感覚が欠如していること、②歯根膜の感覚がないためにブラッシングなど患者自身によるメンテナンスが困難であること、③上皮付着がないことからプラークの侵入が容易でインプラント周囲炎を惹起すること、などがあげられる。

## 2. 研究の目的

上記に挙げたインプラント体の問題点を克服するためには、本来の歯根に近い、歯根膜を有した次世代型の人工歯根の開発が望まれる。そこで本研究ではラットを用いて、これまでの歯根膜組織再生機構についての研究から得られた情報を元に、組織工学的的手法を用いて、歯根膜を有した人工歯根材料を作製し、これらを生体内へ移植した後、機能できるような人工歯根の開発を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ①未分化なヒト歯根膜細胞株において発現するタンパクの解析

これまでの私たちの研究成果より、1-11細胞株は未分化な特徴を有しながらも、1-17細胞株よりも分化がやや進んでいることを明らかにしている。そこで、これらの細胞株からの細胞抽出液を用いて、2次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、発現量の異なる因子の検出を行った。

### ②象牙質基質タンパク発現ベクターの解析

広島大学大学院医歯薬学総合研究科の鈴木助教より、象牙質基質タンパクの1つである dentin sialophosphoprotein (DSPP) の発現ベクターの供与を受け、これを HPDLC へ遺伝子導入し、セメント質または骨関連遺伝子発現 (CP23、オステオポンチン (OPN)、オステオカルシン (OCN)、骨シアロタンパク (BSP)) について定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

### ③カルシウムの未分化な歯根膜細胞株への影響

骨およびセメント質の成分であるカルシウムが細胞株の増殖および骨系細胞分化に及ぼす影響について解析した。細胞株を CaCl<sub>2</sub> 存在下で培養し、細胞増殖は、Cell Proliferation Assay kit (Millipore Corp., USA) を用いて、骨系細胞分化は、定量的 RT-PCR 法を用いて、上記した骨関連遺伝子の発現解析と石灰化能を見るために von Kossa 染色および Alizarin Red 染色を用いて行った。

### ④カルシウム添加型 4-META/MMA-TBB レジンの作製と生物学的活性

人工歯根の足場材として、まず 4-META/MMA-TBB レジンに CaCl<sub>2</sub> を添加したもの (Ca/SB)

を作製し、その可能性について検討した。CaCl<sub>2</sub> を重量率 0-70 % で添加し、それぞれが初代ヒト歯根膜細胞 (HPDLC) の増殖、骨系細胞分化に及ぼす影響について検討した。増殖解析は、③と同様の方法を用いた。骨系細胞分化については、CaCl<sub>2</sub> 配合濃度の異なる Ca/SB ディスク (径 9 ミリ) を作製し、HPDLC と 14 日間培養した後、total RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法を用いて、上記した骨関連遺伝子発現と免疫細胞染色法を用いて検討した。さらに、Ca/SB 上でのハイドロキシアパタイトの沈着形成について、走査型電子顕微鏡 (SEM)、X 線回折 (XRD)、そしてエネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) を用いて解析した。

### ⑤Ca/SB レジンのラット脛骨への移植

0% または 10% CaCl<sub>2</sub> 配合 4-META/MMA-TBB レジンを、6 週齢の雄性 SD ラットの脛骨近位の骨端に #110 K-file にて形成した骨窩洞内に填入し、4 週間後に灌流固定し、エポキシ樹脂包埋して、組織学的解析を行った。

### ⑥細胞シートの作製とハイドロキシアパタイトへの生着ならびに生体内での動態

上述した 2 種類の細胞株を、それぞれ径 35 ミリの温度応答性細胞培養容器 ((株) セルシード) 上でコンフルエントになるまで培養し、細胞シートを作製した。

一方、人工歯根材料として、ラットの上顎骨内に植立するために、径 1 ミリ、長さ 1.5 ミリのハイドロキシアパタイト円柱を作製した。さらにこの表面に細胞シートを巻き付け、一晚培養し、アパタイトへの生着を蛍光実体顕微鏡下 (オリンパス (株)) で確認した。これを 6 週齢の雄性 F344 ラットの脛骨または上顎骨中に埋入した。

### ⑦ラット脛骨または抜歯窩への移植

顎骨へ埋入する前に、骨との反応性について検討するために、6 週齢の雄性 F344 ラット脛骨近位の骨端に #110 K-file にて骨窩洞を形成し、そこへ細胞シートとアパタイトの複合体を埋入した。

次に、同系のラットを用いて、上顎右側第 1 臼歯の抜歯を行い、抜歯窩の自然治癒を図った。2 週間後、抜歯部位の歯肉のフラップをあけ、治癒した骨に、#130 の K-file にて深さ約 1.5 ミリ程度の骨窩洞を形成した。そこへ、細胞のシートを接着させたアパタイトを埋入し歯肉を縫合して閉鎖創にした。

いずれも 4 週間後に灌流固定し、パラフィン切片を作製して組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### ①ヒト歯根膜細胞分化に関連した分子の検出

分化段階が異なる 2 種類の未分化なヒト歯根膜細胞株を用いて、各々が発現するタンパクのプロテオーム解析を行った結果、石灰化に関与する因子である GRP78 の発現

が、分化と共に発現が増加する可能性が示唆された。しかしながら、歯根膜線維形成に関連した分子の検出には至らなかった。そこで、近年 DSPP が、骨や歯周組織の再生への可能性について検討されていることから、DSPPi 遺伝子導入細胞における影響について検討した。その結果、DSPP ベクターを遺伝子導入した HPDLC は、empty ベクター導入細胞と比較して、BSP, OCN, OPN 発現の有意ではあったが、わずかな増加にとどまった。CP-23 は？したがって、DSPP による歯周組織誘導作用は乏しいと考えられた。

## ②カルシウムの影響

5mM の CaCl<sub>2</sub> 存在下で培養した 1-11 細胞株及び 1-17 細胞株は、ともに非添加群と比較して有意に増殖が促進した。また両細胞株は、培養 7 日目以降で、一連の骨関連遺伝子発現が亢進し、4 週間後には、石灰化基質が形成されることが明らかになった。そこで、そのメカニズムを解明するために、カルシウム感知レセプター (CaSR) ならびに L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (L-VDCC) の関与に着目し、各々の拮抗薬を用いて解析を行った。その結果、両細胞株の石灰化は CaSR によってブロックされており、さらに CaSR は L-VDCC によって発現が調整されていることが明らかになった。CaSR による石灰化調整は、骨芽細胞とは逆の反応を示したことから、細胞によってその機能が異なるという興味深い結果が得られた。また、未分化な歯根膜細胞の増殖や骨系分化におけるカルシウムの有用性について明らかにすることができた。以上の結果より、人工歯根の材料にはカルシウムが必須であると判断し、以降の実験を進めた。

## ③Ca/SB の生物学的活性

Ca/SB に添加する Ca の濃度に依存して細胞の増殖速度は低下したが、I 型コラーゲンの遺伝子発現は濃度に依存して促進した。また 0% と比較して、50% までは OPN の遺伝子発現が上昇し、30% までは BMP2 および BSP の遺伝子発現が亢進した。中でも 10% Ca/SB は、これら骨関連遺伝子発現において、他の濃度よりも顕著だった。また CaCl<sub>2</sub> の代わりに CaO を用いた場合でも、10% の重量濃度でこれらの遺伝子発現が促進した結果を得ることができた。さらに HPDLC を 10%Ca/SB と培養した場合、Ca/SB から放射状に細胞が配列し、BMP2 の亢進した発現が観察された。これらの結果より、カルシウムの存在が HPDLC の骨系細胞に必要であることが明らかになった。

つぎに Ca/SB のハイドロキシアパタイト沈着効果について検討した。0% または 10%Ca/SB を培養液中に浸漬し、約 50 日間後のディスク表面を SEM 観察し、さらに XRD

および EDX 解析を行った結果、10%Ca/SB は、その表面に、ハイドロキシアパタイトが沈着することが明らかになった。一方 0%Ca/SB 上にはアパタイトの形成は観察されなかった。

0% または 10%Ca/SB をラット脛骨の骨窩洞内に填入し、形態観察の結果、Ca/SB 周囲に骨が形成されることが明らかになった。しかしながら、新生骨と Ca/SB との境界にはわずかな間隙が生じており、骨と癒着した像は観察されなかった。これは、4-META/MMA-TBB レジンからの未重合モノマーの溶出が関与している可能性が推察されたため、カルシウムとリンから構成されるハイドロキシアパタイトそのものの人工歯根としての可能性について解析した。

## ④細胞シートが生着したハイドロキシアパタイトの解析

ラット脛骨骨窩洞内への移植の結果、アパタイト周囲に、骨様硬組織形成とその周囲に、歯根膜様線維組織の形成が観察された。これらの組織は、ヒト Vimentin 抗体に対して陽性反応を示し、移植細胞によって形成されたことが示唆された。そこで、抜歯窩での動態について解析することにした。

## ⑤免疫不全ラットの抜歯窩への移植

顎骨に埋入したアパタイト周囲には骨から線維が伸張し、Sharpey 線維様の像を呈した歯根膜様線維組織の形成が認められた。この歯根膜様組織は、アパタイトの全周にわたって形成されたものではなかったが、広い範囲で観察することができた。また Sharpey 線維様の組織は、骨窩洞の口腔内側よりも深部側で観察することができた。これは、埋入後は閉鎖創であっても、食物の摂取などによる機械的刺激によって、形成が促された可能性が考えられた。

本研究結果より、ハイドロキシアパタイトを足場材とした材料に、未分化な歯根膜細胞を生着させた状態で、顎骨内に移植することによって、歯根膜組織を有した人工歯根が具現化できる可能性が示唆された。

## 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 16 件)

- ① Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor- $\beta$ 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. Cell Tissue Res. 査読有り (in press)

- ② 前田英史. 組織再生工学を応用した歯の保存治療法の開発を目指して.. 日歯保存誌 55(5):301-303, 2012
- ③ Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Hori K, Koori K, Yamamoto N, Teramatsu Y, Akamine A. Alternation of extracellular matrix remodeling and apoptosis by activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in human periodontal ligament cells. J Cell Biochem. 査読有り 113(10):3093-3103, 2012
- ④ Yamamoto N, Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Kono K, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A. Expression and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on periodontal ligament cells. J Clin Periodontol. 査読有り 39(6):556-564, 2012.
- ⑤ Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Koori K, Yamamoto N, Teramatsu Y, Akamine A. A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. J Cell Physiol. 査読有り 227(5) :2040-2050, 2012.
- ⑥ Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A. Potentials of periodontal ligament stem/progenitor cell lines in regeneration studies. Oral Craniofac Tissue Eng. 査読有り 1(4): 289-299, 2011.
- ⑦ Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res. 査読有り 46(4):438-447, 2011.
- ⑧ Wada N, Bartold PM, Gronthos S. Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells. Stem Cells Dev. 査読有り 20(4):647-659, 2011.
- ⑨ Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Akamine A. Promise of periodontal ligament stem cells in regeneration of periodontium. Stem Cell Res Ther. 査読有り 2(4):33, 2011.
- ⑩ 前田英史、友清淳、郡勝明、藤井慎介、門野内聡、和田尚久、河野清美、山本直秀、寺松陽子、赤峰昭文. レジンシーラーの細胞親和性について—スーパーボンド根充シーラーと AH Plus との比較— 日歯内療誌 査読有り 32(2):97-101, 2011.
- ⑪ Maeda H, Tomokiyo A, Koori K, Monnouchi S, Fujii S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Saito T, Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Int Endod J 査読有り 44(5):425-431, 2011.
- ⑫ Kwon SM, Kim SA, Fujii S, Maeda H, Ahn SG, Yoon JH. Transforming Growth Factor  $\beta$  1 Promotes Migration of Human Periodontal Ligament Cells through Heat Shock Protein 27 Phosphorylation. Biol Pharm Bull 査読有り 34(4):486-489, 2011.
- ⑬ Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Hori K, Akamine A. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. J Dent Res 査読有り 90(2):181-185, 2011.
- ⑭ Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, Akamine A. The effects of TGF- $\beta$  1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human PDL stem/progenitor cell line. Cell Tissue Res 査読有り 342(2):233-242, 2010.
- ⑮ Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. Mineral Trioxide Aggregate Induces Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Calcification in Human Periodontal Ligament Cells. J Endod 査読有り 36(4):647-652, 2010.
- ⑯ Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. J Endod 査読有り 36(2):260-263, 2010.
- [学会発表] (計 2 2 件)
- ① Yamamoto et al. Roles of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor in Periodontal Ligament Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. March 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ② Koori et al. Extracellular Calcium Regulates Osteoblastic Differentiation of Undifferentiated PDL Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ③ Wada et al. Conversion of periodontal ligament cells into multipotent

- stem-like cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ④ Maeda et al. CaCl<sub>2</sub>-added Resin Exerts Bioactive Effects on Periodontal Ligament Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013. Seattle, USA.
- ⑤ 長谷川大学 他. 分化能の異なるヒト歯根膜細胞クローンの単離及びキャラクターゼーション. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑥ 祐田明香 他. CTGF が未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑦ 濱野さゆり 他.  $\beta$ 2アドレナリン受容体の非作動薬であるPropranololがヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012. 11. 22-23. 広島
- ⑧ 和田尚久 他. Sema3A がヒト歯根膜細胞の幹細胞/未分化細胞誘導に及ぼす影響. 第136回日本歯科保存学会春季学術大会. 2012. 6. 28-29. 宜野湾市
- ⑨ Maeda H et al. Potency of Mechanical Load in Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells. 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2011. Nov. 11-13, 2011 Beijing International Convention Center, Beijing, China (招待)
- ⑩ 寺松陽子 他. EGF がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について. 第135回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2011. 10. 20-21. 大阪
- ⑪ Monnouchi et al. Stretched periodontal ligament cells up-regulate Interleukin-11 to regenerate osteoblastic metabolism. 59th Annual Meeting of JADR 2011. Oct 8-9, 2011. International Conference Center Hiroshima, Hiroshima
- ⑫ 門野内聡 他. ヒト歯根膜細胞への伸展刺激は Interleukin-11 の発現を促進する. 第134回日本歯科保存学会春季学術大会. 2011. 6. 9-10. 千葉
- ⑬ Maeda H. An *In Vitro* Evaluation of Resin-based Sealers on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. 2011 AAE ANNUAL SESSION. April 13-16th, 2011. at San Antonio Convention Center, San Antonio, USA
- ⑭ Monnouchi et al. The roles of stretch loading in human periodontal ligament cells. The 6th International Joint Symposium on “Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration” and “Oral Health Science”. 4-5th March, 2011, at Fukuoka Recent Hotel, Fukuoka, Japan
- ⑮ Maeda et al. Contribution of mechanical load to the regeneration of human periodontal ligament tissues. International Biomedical and Technology & Healthcare Management Summit, Nov. 26-27, 2010 Jiangyin International Hotel, Jiangyin, China (招待)
- ⑯ 山本直秀ら. GDNF がヒト歯根膜細胞の走化性に及ぼす影響について. 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010. 10. 28-29. 岐阜
- ⑰ 郡勝明ら. 未分化なヒト歯根膜細胞株の分化に及ぼすカルシウムの影響について. 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010. 10. 28-29. 岐阜
- ⑱ 河野清美ら. bFGF が未分化なヒト歯根膜細胞株の線維芽細胞様分化に及ぼす影響について. 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010. 10. 28-29. 岐阜
- ⑲ 和田尚久ら. ヒト歯根膜および歯髓細胞の免疫抑制特性に関する研究. 第133回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010. 10. 28-29. 岐阜
- ⑳ 前田英史ら. スーパーボンドシーラーの特性について - ヒト歯根膜細胞の増殖と分化に与える影響 -. 第31回日本歯内療法学会学術大会. 2010. 7. 24-25. 東京
- 21 Monnouchi et al. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. 88th General Session & Exhibition of the IADR. July 14-17, 2010 Barcelona, Spain
- [図書] (計 5 件)
- ① 前田英史 赤峰昭文: 「接着性レジンシーラーの細胞親和性 スーパーボンド根充シーラーVSリアルシール SE シーラー」 日本歯内療法学会編「ENDO で臨床を大きく変えよう!」 クインテッセンス出版 pp138-143.
- ② Maeda H, Wada N, Fujii S, Tomokiyo A, and Akamine A (2011) Periodontal ligament stem cells. In: Gholamrezanezhad A (ed) Stem Cells. InTech, Rijeka, Croatia, pp619-636.
- ③ Maeda H, Tomokiyo A, Wada N, Akamine A (2012) INDUCTION OF BMP-2 IN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS BY

CALCIUM-BASED BIOMATERIAL. In: Anja Nohe (ed) Bone Morphogenetic Proteins: New Research. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY pp187-202.

- ④ Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Akamine A (2012) Differentiation of Periodontal Stem/Progenitor Cells: Roles of TGF-beta1. In: M.A. Hayat (ed) Stem Cells and Cancer Stem Cells : Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 4. Springer, Heidelberg, Germany, pp51-58.
- ⑤ 前田英史 (2013) :「歯肉縁下では、こんなことが起こっている！」 クインテッセンス出版 「日常臨床で必ず使える！ 歯内療法克服の一手」 pp36-43.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 英史 (MAEDA HIDEFUMI)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：10284514

### (2) 研究分担者

赤峰 昭文 (AKAMINE AKIFUMI)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：00117053

和田 尚久 (WADA NAOHISA)  
九州大学・大学病院・講師  
研究者番号：60380466

門野内 聡 (MONNOUCHI SATOSHI)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：30609558

### (3) 連携研究者

該当者なし