

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06450

研究課題名(和文) 歯髄・象牙質再生を促進する新規生体材料の開発

研究課題名(英文) The development of new biomaterial promoted regeneration of a dental pulp and odontoblast.

研究代表者

井上 美穂 (INOUE, Miho)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：20271059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄細胞の幹細胞化を応用し、実際の炎症性歯髄において細胞学的、組織学的に検討することで、歯髄組織の修復、回復に効果的な生体材料、さらに象牙質においてはう蝕を抑制する生体材料の開発を行うことを目的として、骨芽細胞様細胞、骨髄細胞を用いて、TNF- α の影響を検討した。それぞれの細胞にTNF- α を短期刺激した後、実験に使用した。細胞増殖能実験において、刺激による有意差は認められなかった。一方、細胞分化能実験において、TNF- α 刺激後、両細胞はALP活性や石灰化基質形成が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：TNF- α is known as one of inflammatory cytokine causing bone resorption, claim and edema of the organization. On the other hand, it was revealed that the TNF participated in an anagenesis by the wound healing process. A study about effect of TNF- α on human dental pulp cell differentiation was carried out in our laboratory in the past. Dental pulp cells are cell group including such as stem cell, primary odontoblast and fibroblast. It was revealed that the ratios of stem cells in the pulp cell increased by stimulation of TNF- α . The purpose of this study was investigated the effect of a short term stimulated TNF- α in osteoblast and bone marrow cells. The cell proliferation was no significant difference between stimulated TNF- α and no stimulation (control). On the other hand, cell differentiation was inhibited the cells of stimulation of TNF- α . In future, we have investigated of the signaling mechanism of a short term stimulated TNF- α .

研究分野：歯科補綴学

キーワード：幹細胞化 骨芽細胞様細胞 骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を有しており、う蝕、磨耗、咬耗、支台歯形成などの歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の修復が起きることが知られている。すなわち、象牙質におよぶ歯の損傷は炎症反応を惹起し、炎症性細胞から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それらの刺激により既存の象牙芽細胞が再活性化され象牙質の再生が生じる。一方、歯髄では、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が活性化され、新たに象牙芽細胞に分化し象牙質の再生が生じると考えられているが、これらの現象の生物学的メカニズムは完全には解明されていない。創傷治癒過程では、炎症性サイトカインの1つであるTNF- α は損傷の局所において初期の段階で発現し、さまざまな成長因子やサイトカインの発現の誘導や、細胞の遊走を促進し組織再生に関与している (Glass et al., PNAS 2011)。我々の研究室では、マウス露髄モデルを作成し、前駆細胞や歯髄幹細胞が露髄刺激により誘導されることを間葉系幹細胞のマーカーである CD146 の免疫染色にて確認した (Ueda et al, Stem Cell Res Thera 2014)。歯髄細胞が未分化な細胞へ誘導された結果、多分化能を有する細胞の比率が上昇するという、大変興味深い結果を得た。このことは、培養ヒト歯髄細胞においてTNF- α は間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させる可能性 (歯髄細胞のリプログラミング効果) があることを示している。

2. 研究の目的

本研究で歯髄細胞に TNF- α を投与することによりリプログラミング (幹細胞化) することを応用し、炎症性歯髄にお

ける幹細胞化の効果を組織学的に検討する。将来的には歯髄組織の修復、回復に効果的な生体材料、さらに象牙質におけるう蝕を抑制する生体材料の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

歯髄細胞の幹細胞化を応用し、実際の炎症性歯髄において組織学的に検討することで、歯髄組織の修復、回復に効果的な生体材料、さらに象牙質においてはう蝕を抑制する生体材料の開発を行うことを目的として、以下の研究計画を立てた。

(1) 歯髄・象牙質複合体を応用できる生体材料の開発

コラーゲンスポンジ上での歯髄細胞を用いたリプログラミング効果の検討

コラーゲンスポンジ上での象牙芽細胞を用いた再石灰化、およびう蝕抑制効果の検討

(2) TNF- α 、フッ素コーティングコラーゲンスポンジをマウス露髄モデルに埋入した組織学的検討

4. 研究成果

骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に TNF- α 刺激を行い、細胞分化能、細胞増殖能の検討を行った。細胞増殖能は MTS アッセイ、細胞数のカウントを行った。TNF- α の濃度に関係なく、細胞は増殖した (図 1)。細胞分化能は、ALP 活性 (図 2)、石灰化の検討 (図 3)、培養細胞から RNA を抽出し、定量性 RT-PCR 法を用いて検討した。TNF- α 刺激をおこなった細胞は、分化能が停止、あるいは遅延する結果となった。現在これらの結果をもとに論文を執筆中である。

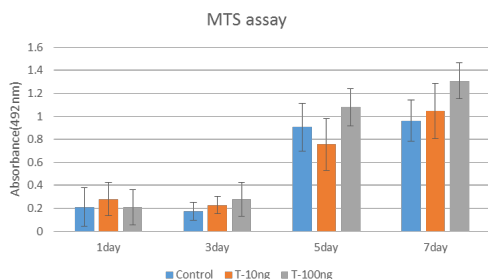


図 1: 細胞増殖能試験 (MC3T3-E1)

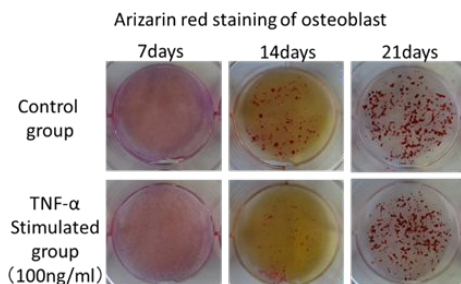


図 2: アリザリンレッド染色

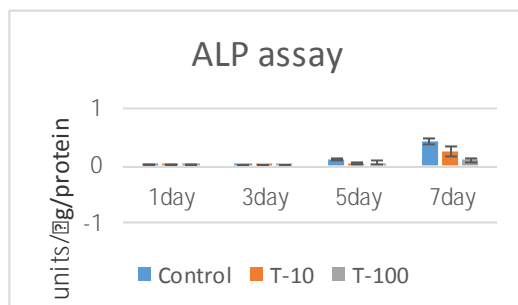


図 3: 細胞分化能(ALP 活性) (MC3T3-E1)

ラットの骨髄細胞(BMC)において、5週齢 SD ラットから骨髄を採取し、検討を行った。骨髄細胞でも同様に、増殖能に影響はなかった(図 4)。骨芽細胞分化誘導培地においては、ALP 活性は TNF-刺激により抑制される結果となった。現在、軟骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地、神経分化誘導培地を用いて、検討を行っている。

骨髄細胞では、歯髄細胞、骨芽細胞様細胞とは、異なる結果が得られ、様々な細胞集団であることを考えると当然の結果と考えられた。今後は、TNF- がどの骨髄細胞に影響しているかを検討すること

が必要であると考えられる。

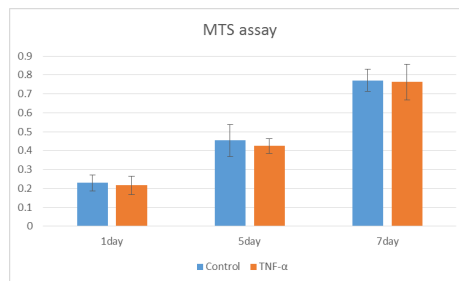


図 4 : 細胞増殖能試験 (BMC)

また、生体材料として、コラーゲン、炭酸アパタイト、水酸化アパタイト、-TCP を 8 週齢 SD ラットの上顎第一大臼歯の歯髄腔内、脛骨骨髄内に埋め込んで、1 週間、2 週間で検討した。現在は、切片を作製中で今後の検討が期待される。

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 0 件)

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 出願年月日 :
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
 発明者 :
 権利者 :
 種類 :
 番号 :
 取得年月日 :
 国内外の別 :

〔 その他 〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 美穂 (INOUE, Miho)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：20271059

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ()