

令和元年6月24日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11569

研究課題名(和文) bFGFとsimvastatinによる象牙質/歯髄複合体の再生技術の開発

研究課題名(英文) Regeneration of dentin/pulp complex with bFGF and simvastatin

研究代表者

森戸 亮行 (Morito, Akiyuki)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10514854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：褥瘡・皮膚潰瘍の治療薬であり、幹細胞を増殖させる線維芽細胞増殖因子(bFGF)と高コレステロール血症治療薬で知られ、骨や歯の一部である象牙質を作ることが知られているシンバスタチンとを使用して歯髄の再生を試みる方法を開発する目的で研究を開始した。bFGFにより歯髄の細胞が増殖し、シンバスタチンにより象牙質様の構造物を生成することがわかった。またそれら二つの薬を徐放するゼラチンハイドロゲルの作製にも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの歯髄再生の研究の中心は歯髄内の幹細胞を使用して行うことがほとんどであった。しかしながら、その臨床応用には多くの問題点がある。例えば、幹細胞単離において抗体の使用を必要とするが、この手技が煩雑である上感染のリスクがある点、ならびに細胞自体のがん化の可能性がある点などである。これらの点を考えると本研究は細胞を使用せずに既に臨床応用されている薬のみで再生を試みる方法であるため、現実的で社会的に有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop the method for the regeneration of dentin/pulp complex with basic fibroblast growth factor (bFGF) and simvastatin. Basic FGF possess broad mitogenic and cell survival activities. Simvastatin is the drug to treat dyslipidemia and to prevent atherosclerosis-related complications. We demonstrated that human dental pulp stem cells (hDPSCs), cultured with the medium containing bFGF, showed high proliferation ability, and that simvastatin induced the differentiation of hDPSCs into odontoblast-like cells. Here we showed that a biodegradable hydrogel of gelatin could achieve the sustained release of bFGF and water-insoluble simvastatin.

研究分野：象牙質/歯髄複合体の再生

キーワード：象牙質/歯髄複合体 再生 bFGF simvastatin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般的に歯の神経として知られている歯髄の再生は歯科治療における大きな目標の一つであり、これまでも様々な研究が行われている。特に様々な細胞に分化する能力を持つ歯髄幹細胞 (DPSCs) に関しては多くの報告があり、この幹細胞移植による歯髄再生が期待されている。しかしながら、その臨床応用には多くの問題点がある。例えば、幹細胞を採取する際に抗体の使用を必要とするが、この手技が煩雑であるうえ感染のリスクがある点、ならびに細胞自体のがん化の可能性がある点などである。

このように幹細胞移植による歯髄再生治療への応用が期待されている一方で、考慮すべき改良点や安全で確実な治療方法を考える必要がある。そこで既に臨床応用されている薬剤である bFGF および simvastatin による再生方法を提案した。

### 2. 研究の目的

DPSCs の増殖能と様々な細胞に分化する能力 (分化能) を向上させることができる bFGF と骨や歯の一部である象牙質を再生促進する作用をもつ simvastatin の 2 種類の薬剤を同時に作用させることにより象牙質と歯髄の再生を試みることである。

### 3. 研究の方法

bFGF と simvastatin の 2 つの薬剤を徐放できるゼラチンハイドロゲルを使用することにより歯髄を賦活させ、歯髄と象牙質を再生させることを目指して以下の様に計画を進めた。

(1) bFGF と simvastatin の DPSCs ならびに象牙質を形成する象牙芽細胞への作用の解析を行った。

bFGF と simvastatin が増殖能と分化能に与える影響を確認した。DNA 量の測定により細胞数を測定することにより、増殖能を解析した。分化能においては、象牙芽細胞への分化能を検証するためにアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定、Ca 量測定、アリザリン染色、および免疫染色 (DMP1、Nestin ならびに DSP) を行った。

(2) bFGF と simvastatin の 2 種類の薬剤を同時に徐放することができるゼラチンハイドロゲルの製作技術を確立した。

(3) ゼラチンハイドロゲルの分解性と分解に伴う bFGF と simvastatin の徐放性の検証を行った。

(4) bFGF および simvastatin 徐放性ゼラチンハイドロゲルの歯髄・象牙質の再生能をラットの断髄モデルを使用して検証した。

ラット歯髄内にゼラチンハイドロゲルを移植し組織学的解析を行っている。現在研究が遅れていて、実験途中の状態である。

### 4. 研究成果

(1) DPSCs に対する bFGF と simvastatin の作用

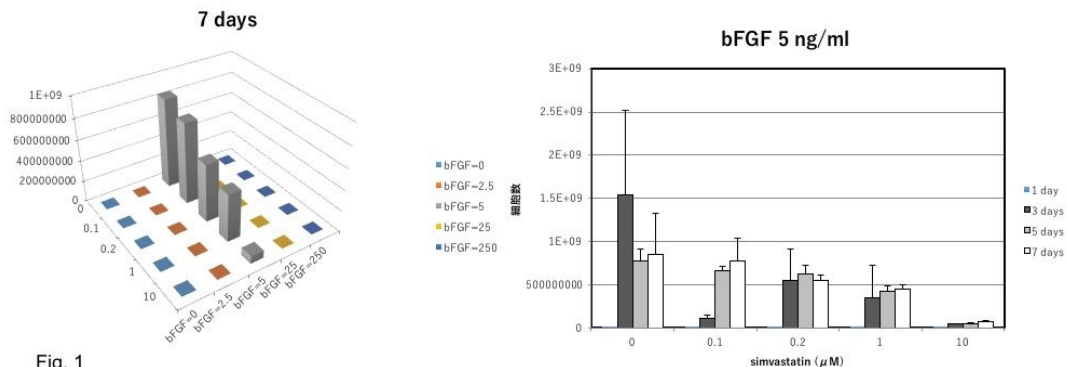


Fig. 1

bFGF は DPSCs の増殖能を上昇させ、5 ng/ml の時に最も上昇させることを示した。一方 simvastatin は、濃度依存的に細胞増殖能を低下させたが 0.2 μM で使用することにより細胞増殖能に影響を与えないことがわかった (Fig.1)

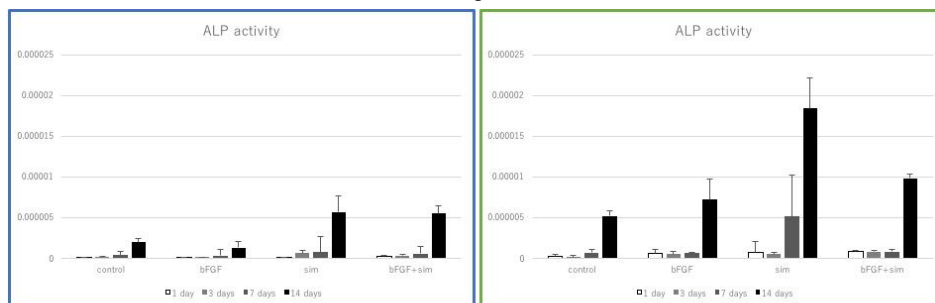


Fig. 2

分化能においては、DPSCs に simvastatin 含有培地で培養することにより、ALP 活性ならびに Ca 量の上昇は培養 7 日目以降に認められたが、上昇程度は低かった (Fig. 2a)。一方、DPSCs を石灰化誘導培地で培養し得られた細胞 (象牙芽細胞様細胞) は、simvastatin により ALP 活性 (Fig. 2b) が DPSCs を培養した時よりも上昇することがわかった。

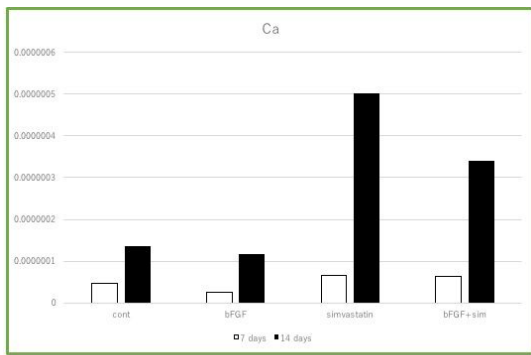


Fig. 3

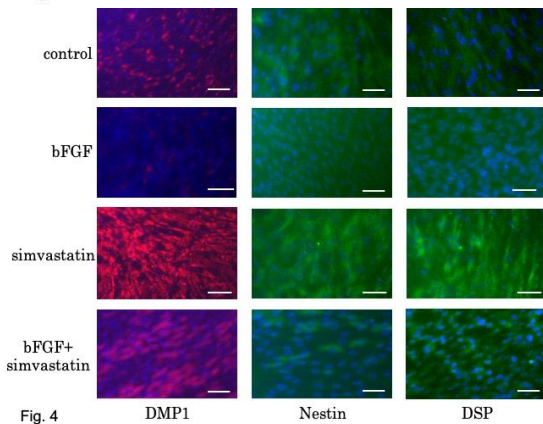


Fig. 4

また DPSCs を simvastatin 含有培地で培養しても上昇が認められなかった Ca 量は象牙芽細胞様細胞においては、上昇し (Fig. 3)、かつ DMP1、Nestin、および DSP 陽性細胞 (Fig. 4) であった。さらに simvastatin 含有培地で培養することで *bmp2* 遺伝子の発現 (Fig. 5) が認められた。これらにより、bFGF は DPSCs の増殖能を上昇させ、simvastatin は象牙芽細胞に作用し BMP2 の作用を介して、さらに分化させることがわかった。Pei-Yu らによると、simvastatin は骨芽細胞に対して作用し Ras/Smad/Erk/BMP2 経路を介して BMP2 を発現し、その BMP2 が間葉系幹細胞に作用し石灰化を導く、としている。上記結果から歯髄内に bFGF と simvastatin を作用すると同様な現象が起こり、再生を導くと予測している。

また DPSCs を simvastatin 含有培地で培養しても上昇が認められなかった Ca 量は象牙芽細胞様細胞においては、上昇し (Fig. 3)、かつ DMP1、Nestin、および DSP 陽性細胞 (Fig. 4) であった。さらに simvastatin 含有培地で培養することで *bmp2* 遺伝子の発現 (Fig. 5) が認められた。これらにより、bFGF は DPSCs の増殖能を上昇させ、simvastatin は象牙芽細胞に作用し BMP2 の作用を介して、さらに分化させることがわかった。Pei-Yu らによると、simvastatin は骨芽細胞に対して作用し Ras/Smad/Erk/BMP2 経路を介して BMP2 を発現し、その BMP2 が間葉系幹細胞に作用し石灰化を導く、としている。上記結果から歯髄内に bFGF と simvastatin を作用すると同様な現象が起こり、再生を導くと予測している。

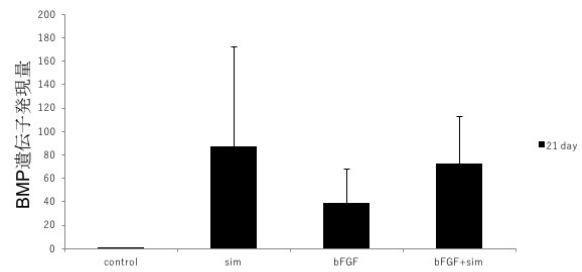


Fig. 5

## (2) bFGF と simvastatin 徐放性ゼラチンハイドロゲルの作製と機能

上記左の図はゼラチン分子に乳酸オリゴマーを導入する模式図である。分子量 20,000 と

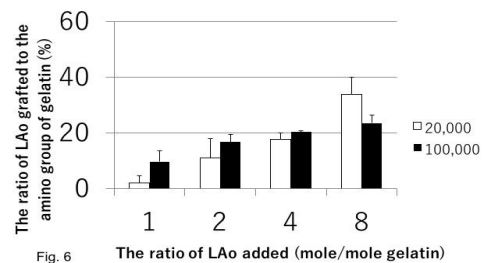
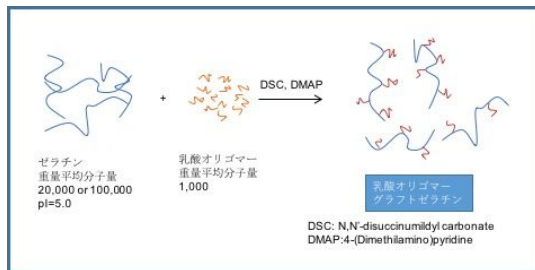


Fig. 6

100,000 の乳酸オリゴマーのどちらにおいても、ゼラチン: 乳酸オリゴマーが 1:8 (モル比) で調整した乳酸オリゴマーグラフトゼラチンで、ゼラチンに乳酸が最も導入されていた (Fig. 6)。

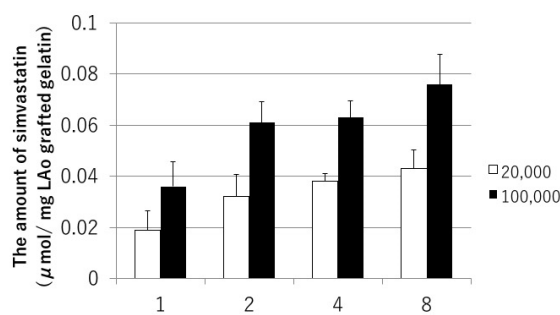
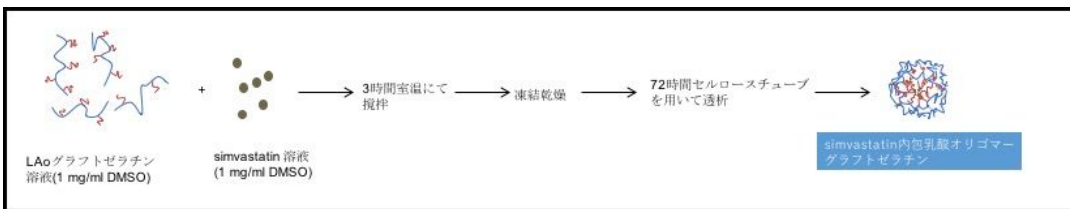


Fig. 7

The ratio of LAO added (mole/mole gelatin)

また simvastatin の導入率を比較すると、同様にモル比 1:8 で最も内包することが判明したが、分子量 20,000 と 100,000 の乳酸オリゴマーを比較すると分子量 100,000 の方が多量に simvastatin を内包していた (Fig. 7)。すなわち分子量 100,000 の乳酸オリゴマーを導入した分子量 100,000 のゼラチンが最も simvastatin を内包することができた。

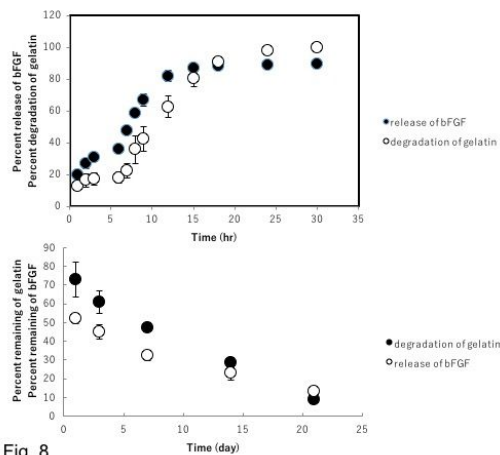
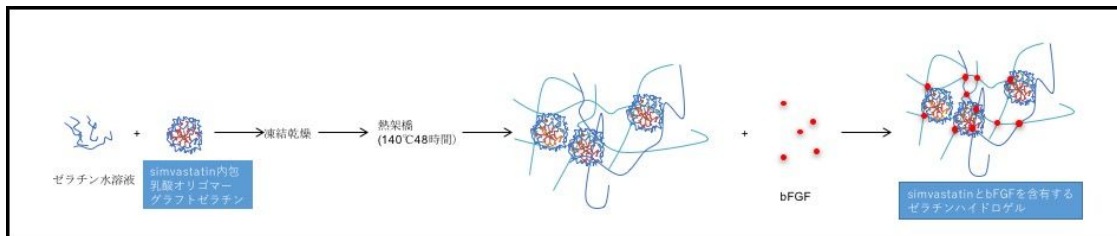


Fig. 8

in vitro おけるゼラチン分解試験と bFGF 徐放試験の結果において、分解および徐放プロファイルはウイルス再生医科学研究所の既存データから 2 週間分解性のゼラチンハイドロゲルであることがわかった。また in vivo におけるゼラチン分解試験ならびに徐放試験において、ゼラチンは 2 週間で分解し bFGF と simvastatin が徐放することが認められた (Fig.8)。

このことにより移植する担体が完成した。  
(3) bFGF および simvastatin 徐放性ゼラチンハイドロゲルの歯髄・象牙質の再生能

現在研究が遅れ、ラット歯髄内にゼラチンハイドロゲルを移植し現在組織学的解析を行っているところである。

### 今後の展望

最近の研究では細胞、担体、ならびに増殖因子を使用する tissue engineering を応用することで象牙質/歯髄複合体の再生を試みるものが多い。しかし前述のように幹細胞単離において抗体の使用が必要であり、感染のリスクがある。細胞自体のがん化の可能性などの問題もある。加えて細胞回収と増殖等にかかるコストも考えなければならない。細胞の移植なしに歯髄/象牙質再生を行うためには、歯髄内に存在している DPSCs を増殖させ分化させた象牙芽細胞もしくは既存の象牙芽細胞により象牙質を生成する必要があるがあるが、本研究で bFGF と simvastatin はそれを可能にすることを示した。またそれらを徐放する担体であるゼラチンハイドロゲルの設計も作製することができた。現在進行が遅れているが、今後この機能を in vivo で確認することができれば、臨床応用に向かって前進することができる。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

森戸亮行、前田光平、山本 淳、小野 駿、細矢哲康、bFGF ならびに simvastatin による象牙質/歯髄複合体の再生、日本歯科保存学会学術大会(第 150 回)、2019 年

森戸亮行、吉田拓正、小野 京、湯本琴美、田畑泰彦、細矢哲康、歯髄幹細胞および象牙芽細胞に対する simvastatin ならびに bFGF の作用、第 37 回日本炎症・再生医学会、2016 年

森戸亮行、吉田拓正、湯本琴美、田畑泰彦、細矢哲康、歯髄幹細胞および象牙芽細胞における simvastatin ならびに bFGF の効果、日本歯科保存学会学術大会(第 144 回)、2016 年

### 6. 研究組織

#### (1)研究分担者

研究分担者氏名：田畑 泰彦

ローマ字氏名：Tabata Yasuhiko

所属研究機関名：京都大学

部局名：ウイルス再生医科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：50211371

研究分担者氏名：細矢 哲康

ローマ字氏名：Hosoya Noriyasu

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：00157033

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。