

令和元年6月20日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11570

研究課題名(和文)象牙質-幹細胞複合体からなるハイブリッド骨補填材の創製

研究課題名(英文) Development of hybrid bone substitute material consisting of dentin-stem cell complex

研究代表者

田中 雅士 (TANAKA, Masashi)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：10761596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質を骨補填材として応用する簡便な方法を検討するために、ヒト抜去歯から象牙質を取り出し粉碎して顆粒状に調整し、オートクレーブ滅菌を行って、骨補填材としての適用を試みた。さらに、骨補填材として、幹細胞を組合せたハイブリッド材料を作製する方法を考案した。そのために滅菌象牙質顆粒とヒト骨髄由来幹細胞(hBMSC)を共培養して凝集塊状の象牙質/hBMSCハイブリッド骨補填材料を得た。この新しい骨補填材を、既存の人工骨補填材と比較対照として、組織応答を評価するためにヌードマウスの背側皮下に埋植し、その有用性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨の少量の骨造成を目的として、自家骨移植に代わり、移植材採取のための侵襲を回避するため、抜去歯から得た象牙質を骨補填材として応用することを試みた。抜去歯から象牙質を取り出し顆粒状に調整しオートクレーブ滅菌を行って、骨補填材としての有用性を検討した。さらに、幹細胞を組合せたハイブリッド材料も作製した。そのために滅菌象牙質顆粒とヒト骨髄由来幹細胞(hBMSC)を共培養して象牙質/hBMSCハイブリッド骨補填材料を得た。この新しい骨補填材をヌードマウスの背側皮下に埋植したところ、既存の人工骨補填材に比べ周囲組織の石灰化を誘導し、象牙質顆粒が骨補填材として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to investigate a simple method of applying dentin as a bone replacement material, we disinfected dentin obtained from human teeth that had been preserved after extraction with autoclave sterilization, and attempted to apply it as a bone replacement material. We devised a method to create a hybrid material for use as a bone replacement, whereby dentin, crushed into granular form, was co-cultured with human bone marrow-derived stem cells (hBMSCs). We then implanted the dentin/hBMSC hybrid bone replacement material and a hybrid bone replacement material, prepared using existing artificial bone replacement materials, subcutaneously into the backs of nude mice in order to comparatively analyze the biological responses to both materials. We then investigated the effects of dentin itself, and the utility of the cell engineering composite material composed of dentin and hBMSCs.

研究分野：歯内療法学

キーワード：滅菌象牙質 オートクレーブ滅菌 幹細胞 ハイブリッド骨補填材 非侵襲性 硬組織誘導 象牙質基質タンパク質 糖鎖

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来した現在、歯科領域において、腫瘍、歯周病や根尖病巣等の、歯槽骨の喪失や減少を伴う症例が増加している。そのような症例に対して骨増生を目的に自家骨移植や骨補填材の移植を適用するケースも増加しており、自家骨移植と同等の機能を持つ骨補填材の開発が急務となっている。一方、骨誘導能を有する Bone morphogenetic protein (BMP) が Urist らのグループにより骨基質中に (Science 1965) 続いて象牙質基質中に発見されて以来 (Arch Surg 1967) 象牙質の骨補填材への応用研究が世界中で行われている。

このような背景から我々は生体材料として供給可能な象牙質に注目し、象牙質を粉碎し根尖部に応用する方法を検討し、象牙質顆粒が根尖閉鎖と歯槽骨側に硬組織様の組織を誘導することを報告してきた (Yoshida et al. 日歯保存誌 1986 他)。

象牙質顆粒の骨補填材としての応用研究では、我々の先行研究も含め、象牙質中の骨形成作用を有する有機成分に期待して新鮮象牙質を用いるか、あるいは脱灰した象牙質の主に I 型コラーゲンからなる基質を用いる方法が主流である。しかしながら、新鮮象牙質を用いる場合、適用可能な歯や時期が制限され、脱灰象牙質を用いる場合には脱灰操作に時間を要するなどの問題点が挙げられる。そこで、申請者らは象牙質を顆粒状にして整粒した後にオートクレーブにより滅菌して用いる方法を考案し検討してきた。象牙質を骨補填材として用いることは、残存する智歯や矯正治療などで抜歯を余儀なくされた歯を有効に活用することにもなり、自己由来であり、かつ歯由来の生体材料として、骨再生療法への新たな可能性が期待できる。本研究では象牙質を顆粒状にしてオートクレーブ滅菌したものが骨補填材として応用可能かどうかを細胞培養系および動物モデルを用いて検討した。さらに、骨形成に有用なサイトカイン等の産生源として、また、象牙質周囲の骨形成に寄与する細胞源として幹細胞を共に移植材とするために、あらかじめ象牙質顆粒とともに培養して複合体とした象牙質顆粒/幹細胞ハイブリッド骨補填材も作製し、骨補填材としての有用性を検討した。

2. 研究の目的

本研究は、操作性を考慮したオートクレーブ滅菌象牙質顆粒と様々な組織由来の幹細胞を用いた新しい骨再生療法の確立を目指して、あらかじめ象牙質顆粒と幹細胞を共に培養して作製したハイブリッド骨補填材の硬組織誘導能と細胞動態を以下の評価項目について解析することを目的とした。

- (1) 象牙質顆粒存在下での幹細胞の動態解析
- (2) 動物モデルを用いた骨補填材としての機能の検討
- (3) 象牙質顆粒から徐放される有効成分の探索

上記の検討により象牙質の骨再生材料としての機能を解析して、幹細胞を組合せたハイブリッド骨補填材の有用性と生体材料としての象牙質の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 象牙質試料の作製

矯正治療のために便宜的に抜去した歯、機能的に保存不可と診断され抜去されたう蝕のない歯の提供を受け試料とした (朝日大学歯学部倫理委員会承認済 第 23111 号)。抜歯直後にエナメル質、セメント質、歯髄、根尖部 3mm を除去した後、象牙質を凍結粉碎し粒径ごとに分類して - 80 °C で保存し、使用直前にオートクレーブ滅菌して用いた。

(2) 象牙質顆粒と共に培養し複合体形成後の細胞動態の検討

象牙質あるいは人工骨補填材と共に各種幹細胞を 7 日間培養して複合体を形成させた。その後細胞溶解液を回収し全 RNA を調整して逆転写反応、リアルタイム PCR 法にて骨芽細胞、象牙芽細胞のマーカー遺伝子の発現レベルを検討し分化誘導能の有無を検討した。さらに、アルカリホファターゼ (ALP) 活性の測定と染色を行い分化の指標とした。また、複合体をそのまま固定し ALP 活性染色、未分化な状態を保ったままの可能性も考慮して、CD105、CD44 等の間葉系の幹細胞マーカーによる免疫染色も行った。さらに、(3) の動物モデルを用いた検討と並行して、破骨細胞系による吸収等についての評価の一部として、象牙質あるいは人工骨補填材存在下での破骨細胞分化を骨髄細胞の混合培養系で評価した。

(3) 動物モデルを用いた骨補填材としての機能の検討

象牙質顆粒あるいは人工骨補填材と幹細胞を共に培養して形成される凝集塊、骨補填材/幹細胞複合体 (骨補填材/幹細胞ハイブリッド骨補填材) を、ヌードマウス皮下に埋植し、経時的に作製した組織切片の組織化学的、免疫組織化学的解析を行い、幹細胞の組合せの有無による組

織応答変化について解析した。埋植後3週間および埋植後数か月から1年と長期間の経過について検討した。また、長期間経過後の組織解析では骨補填材が代謝回転に組み込まれているかどうか、骨様組織の形成と破骨細胞系による吸収等の代謝回転についての検討も行った。なお、本実験は朝日大学動物実験専門委員会の承認（承認番号 16-025, 17-017）を得て、「朝日大学歯学部動物実験管理規定」を遵守して実施した。

（４）象牙質顆粒から徐放される有効成分のスクリーニング

既に予備実験等で、オートクレーブ滅菌後の象牙質が細胞遊走、接着、増殖を促進する作用を有している可能性を見出したが、それが象牙質から溶出する可溶性ファクターによるものか、培地の血清成分が象牙質に沈着して細胞が利用しているのかを明らかにする必要がある。そのため、新鮮象牙質を比較対照として、タンパク質成分を抽出し SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行って比較検討した。

4．研究成果

象牙質と幹細胞を組合せたハイブリッド材料を骨補填材へと応用するため、（１）組合せる幹細胞の動態解析と、（２）作製したハイブリッド材料の動物モデルへの移植後の評価を行い、さらに（３）象牙質顆粒から徐放される有効成分のスクリーニングを行い以下の結果を得た。

（１）象牙質あるいは比較対照とした人工骨補填材（水酸化アパタイト（HA）、 β -TCP）と共に骨髄由来または歯髄由来幹細胞を7日間培養して複合体を形成させた。一部を固定後、一部はその後も培養を継続し、7日ごとに細胞溶解液を回収して全 RNA を調整し、リアルタイム PCR 法にて骨芽細胞、象牙芽細胞のマーカーの mRNA 発現レベルを検討したところ、象牙質顆粒および HA との複合体で、骨芽細胞マーカーであるⅠ型コラーゲン、アルカリホスファターゼ（ALP）、オステオカルシンの発現レベルが上昇し、象牙質顆粒を用いた群ではⅠ型コラーゲンの発現上昇が顕著であった。また ALP 活性染色でも、象牙質顆粒および HA 群で濃染され ALP 活性の上昇がみられた。

歯髄由来幹細胞を用いた試料では、象牙質顆粒群で象牙質リンタンパク質（DPP）の mRNA 発現上昇がみられ、象牙質顆粒には HA と同等の骨芽細胞様細胞への分化誘導能と、歯髄由来幹細胞においては象牙芽細胞様細胞への分化誘導にも作用することが示唆された。

さらに、骨髄由来細胞混合培養系を用いて破骨細胞分化を検討したところ、象牙質顆粒存在下で活性型ビタミン D を添加し培養した群では TRAP 陽性の巨細胞が多数観察された。これに対して人工骨補填材を用いた群では TRAP 染色性も象牙質群と比較して低く、巨細胞はみとめられなかった。

（２）象牙質顆粒あるいは人工骨補填材と幹細胞を共に培養して形成される凝集塊状のハイブリッド材料を、ヌードマウス皮下に埋植し、埋植3週間後および6週間後に固定後、組織化学的、免疫組織化学的に検討したところ、埋植後3週間の組織で、象牙質ハイブリッド材料埋植群に顕著に TRAP 陽性細胞が観察された。また、形態を観察すると、象牙質顆粒周囲に管腔構造が多数みられ、血管内皮細胞マーカーの免疫染色を行ったところ、象牙質ハイブリッド材料群で CD34 陽性細胞が多数観察された。

埋植後6週間では、象牙質ハイブリッド材料群で移植材料周囲に一層の骨様組織が形成されており、骨様組織誘導能がみとめられた。また移植した幹細胞については、ヒト核抗原陽性の骨髄由来細胞は骨芽細胞マーカー陽性であり、歯髄由来細胞は未分化幹細胞マーカーである CD105 陽性細胞が散見され、いずれも移植後の組織で生存するも分化動態は異なっていることが示された。特に、象牙質ハイブリッド材料群で移植材料周囲にオステオカルシン陽性かつヒト核抗原陽性細胞が多数みられ、骨髄由来幹細胞が埋植後も組織で生存し、骨芽細胞様に分化していた。

（３）滅菌象牙質中の有機成分について、新鮮象牙質と比較検討したところ、滅菌象牙質では、タンパク質の溶出量が新鮮象牙質と比べて減少しており、また、低分子化もしていたが、新鮮象牙質の抽出物と同様の電気泳動パターンを示し、タンパク質の糖鎖成分であるシアル酸や複合多糖類のムコ多糖も検出された。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. 堺 ちなみ, 木方 一貴, 田中 雅士, 長谷川 智哉, 堀 雅晴, 赤堀 裕樹, 瀧谷 佳晃, 吉田 隆一, 河野 哲. 上顎小白歯に 3 根管を認めた二症例. 日本歯内療法学会雑誌. 40:37-42. 2019.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. オートクレーブ滅菌象牙質顆粒の骨補填材としての機能評価. 第 144 回日本歯科保存学会平成 28 年度春季大会. 2016 年 6 月 9 日~10 日. 宇都宮.
2. Hayashi Y, Kawaki H, Hori M, Hasegawa T, Tanaka M, Kawano S, Yoshida T, Tamaki Y. Characteristics of experimental calcium silicate as a pulp capping material. International Dental Materials Congress 2016. 2016 年 11 月 4 日~6 日. Bali, Indonesia.
3. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 長谷川智也, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 滅菌象牙質顆粒・幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会. 2016 年 7 月 23 日~24 日. 名古屋.
4. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質骨補填材顆粒より溶出する有機成分の解析. 第 146 回日本歯科保存学会平成 29 年度春季大会. 2017 年 6 月 8 日~9 日. 青森.
5. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 梅村直己, 高山英次, 神谷真子, 河野 哲, 近藤信夫. オートクレーブ滅菌象牙質骨補填材顆粒に残留する有機成分の解析. 第 59 回歯科基礎医学会総会学術大会. 2017 年 9 月 17 日. 塩尻.
6. 木方一貴, 住友伸一郎, 田中雅士, 服部真丈, 堺ちなみ, 三上恵理子, 加藤友也, 長谷川智哉, 堀 雅晴, 瀧谷佳晃, 河野 哲, 吉田隆一. 薬剤関連顎骨壊死から歯髄疾患を生じたと思われる一症例. 第 147 回日本歯科保存学会平成 29 年度秋季大会. 2017 年 10 月 26 日~27 日. 盛岡.
7. 小栗 健策, 木方 一貴, 住友 伸一郎, 江原 道子, 田中 雅士, 堺 ちなみ, 三上 恵理子, 加藤 友也, 富田 昌嗣, 長谷川 智哉, 堀 雅晴, 瀧谷 佳晃, 永山 元彦, 吉田 隆一, 河野 哲. 根管治療されている下顎左側側切歯に内部吸収を認めた症例. 第 148 回日本歯科保存学会学術大会. 2018 年 6 月 14 日~15 日. 横浜.
8. 木方 一貴, 田中 雅士, 堺 ちなみ, 赤堀 裕樹, 長谷川 智哉, 堀 雅晴, 瀧谷 佳晃, 吉田 隆一, 河野 哲. 内部吸収を認めた根管治療済み下顎左側側切歯の一症例. 第 39 回日本歯内療法学会学術大会. 2018 年 7 月 7 日~8 日. 福岡.

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田隆一
ローマ字氏名：YOSHIDA Takakazu
所属研究機関名：朝日大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80102127

研究分担者氏名：玉置幸道
ローマ字氏名：TAMAKI Yukimichi
所属研究機関名：朝日大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80197566

研究分担者氏名：川木晴美
ローマ字氏名：KAWAKI Harumi
所属研究機関名：朝日大学
部局名：歯学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70513670

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。