

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11602

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子を用いたセメント質の再生

研究課題名(英文) Regeneration of Cementum applied by Magnetic Nanoparticles

研究代表者

篠原 義憲 (SHINOHARA, YOSHINORI)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：00423533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の歯科医療において、超高齢化に伴う蝕や歯周病などによる歯や歯質の損失増加から生活の質(QOL)の向上が求められている。故に歯科治療のゴールは従来からの単に欠損部外観の回復や機能回復のみならず、より高いレベルでの咬合維持や口腔諸組織の長期保全に加え、高次元での審美性の回復が求められている。本研究において我々は歯科補綴臨床へより近づけるその一歩として、細胞組織工学的手法を用いた歯周組織、特にセメント質の再生と歯科補綴物への応用を目的として研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日常の歯科補綴臨床において、義歯の鉤歯、パラファンクションによる外傷歯、インプラントの対合となる天然歯に対し、異常な外力が歯根に加わり、歯周組織が損傷する特にセメント質の剥離や吸収する症例によく遭遇した。そこで本研究では、エナメル上皮とも関連性の深いマラッセ上皮細胞に着目し、これを利用したセメント質の組織再生を考えている。セメント質の再生により、歯槽骨および人工歯根が天然組織構造を有したまま結合することが可能となりきわめて生体安全性の高い歯科用インプラント治療に臨床応用することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：At present prosthesis treatments such as crown/bridge, removable denture and dental implants are commonly performed. On the other hand, trauma or tooth loss restored by artificial materials have various issues in terms of biocompatibility, esthetics, functionality compared with natural tooth and periodontal tissues. This study elucidates how regenerative therapy is applied to clinical dentistry. As a first step, we examined tooth regeneration which applied tissue engineering techniques, in particular cementum.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は史上類を見ない超高齢化社会に突入しようとしている。高齢者の多くは何かの身体の機能障害を抱えており、重症の場合には臓器移植あるいは人工臓器の装着を余儀なくされ、その必要性は益々高まっている。しかし前者では脳死臓器移植に限定され、後者においては人工関節やペースメーカーなど一部の臓器は日常臨床に定着しているが、他の多くの組織や臓器においては技術的な面から一般化に至っていない。一方で細胞とマトリックスおよび調節因子の組み合わせで自在に生体組織や臓器を構築する細胞組織工学(ティッシュエンジニアリング: 多種類の細胞を生体中にある状態と同様に組織化し、組織・臓器の持つ高次な機能を再現するための工学)による再生医療に対する期待は大きい。例えば、生体工学で作られた皮膚は火傷や糖尿病性潰瘍の治療に、腱は筋骨格性疾患の治療に用いられている。

また歯科医学の分野において、高齢化に伴う蝕や歯周病などによる歯や歯質の損失増加から QOL の向上が求められている。故に歯科治療のゴールは単に欠損部外観の回復や機能回復のみならず、より高いレベルでの咬合維持や口腔諸組織の長期保全に加え、高次元での審美性の回復が求められている。それら理想的な歯科補綴治療を達成するのが、細胞組織工学技術により再生した歯・歯周組織を従来の歯科医療に応用することであると考えている。歯の損失に対する根本的治療は損失してしまった歯を再生することであり、これまでに歯胚細胞と生体分解性ポリマーを担体として用いた組織工学的手法によって歯の構造は再構築することを確かめられている(J Dent Res. (2002) 81: 695-700)。しかし、歯の包括的な組織再生を医療として応用するためには、萌出、大きさ・形態の制御、再生期間の短縮などの課題が残されており、完全に達成されていない(Arch Histol Cytol. (2005) 68: 89-101)。

現在の歯科医療では全身あるいは歯科疾患、外傷により欠損した歯や歯質は、金属、陶材、レジンといった人工材料でできた補綴物(クラウン、ブリッジ、床義歯)により置換されている。これらの人工材料には、天然の歯の組織に比較し、生体親和性・審美性・機能性といった点において様々な課題が残されている。例えば、レジンや金属では経年的な劣化・着色、生体アレルギー、陶材では、その強度ゆえ対合歯に過度の摩耗を起こしたり、修復歯それ自体に咬合性外傷を引き起こすなどの難点が認められ、決して理想的な修復材ではないと考えられる。以上のことから、本研究において我々は歯科補綴臨床へより近づけるその一歩として、細胞組織工学的手法を用いた歯の諸組織、特にセメント質の部分再生と歯科補綴物への応用を目的としている。

2. 研究の目的

本研究では、成体智歯歯胚から歯小囊細胞を単離しそれらを培養増殖させ、in vitro においてこれらの細胞を用いて、セメント芽細胞へ分化誘導させ得るような生体に極めて近い環境を再現する。さらに臨床応用可能な厚いセメント質を再生させるために、in vitro において再現した微小環境を連続的に起こす。つまり磁性ナノ粒子を用いて、磁力により細胞をシート状の組織として培養回収し、各シート組織間を細胞外マトリックス蛋白質を含む人工基底膜で介在させ積層する。これにより細胞はその極性を保ち天然に近い環境で強い相互作用を誘導し、セメント芽細胞への分化促進および強固な細胞間接着の獲得が可能となる。最終的には積層化した組織を実験動物に移植することにより、人為的に厚いセメント質を再生させ、上記に示した臨床応用可能な量的質的細胞培養および組織再生技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 臨床応用可能な歯小囊細胞の分離・増殖技術の開発と評価

歯の象牙質は(Proc Natl Acad Sci USA. (2000) 97:13625-13630)や歯周組織(Lancet. (2004) 364:149-155)は成体に存在する象牙芽細胞や歯根膜細胞を培養増殖し動物に移植することで部分再生したという研究は報告されている。しかしセメント質はその形成細胞であるセメント芽細胞が未だ人為的に作製できないため、組織再生修復能のない組織である。そこで、成人においてセメント質形成細胞つまり歯小囊細胞が存在する未萌出の智歯歯胚を想定し、その実験モデルとして生後6ヶ月のブタ智歯歯胚を採取した。その後酵素的に歯胚間葉組織から歯小囊細胞を単離し培養増幅した。これまでに歯胚細胞の培養法について多数報告されているが(Eur J Oral Sci. (1999) 107: 276-81, Biochem Biophys Res Commun. (2003) 308 :834-9, Arch Oral Biol. (2005) 51:282-90)これらの培養方法は動物由来の血清やを使用するため臨床応用を考えた場合に感染や免疫拒絶といった課題が残されている。そこで、単離した歯小囊細胞を各種細胞外マトリックスでコートした培養皿で無血清培地にて培養を行い、細胞増殖能およびPCR法によるセメント芽細胞特異的遺伝子の発現を解析した。

(2) in vitro における細胞の組織化技術の開発

臨床応用可能な厚いセメント質再生のための組織化技術の開発を行った。そのために必要となるのが、第一に生体内では単層のセメント芽細胞層を人工的に積層化させるような培養環境の形成である。培養したセメント芽細胞層をトリプシンなどの蛋白質分解酵素により回収し磁性ナノ粒子を取り込ませた。さらに細胞間相互作用させ、分化誘導を促進するためにセメント芽細胞層間に同様に培養象牙芽細胞層を介在させた。これを1週間血清含有培地にて培養し、細胞を定着させた。

(3) in vivo における再生組織の評価

上記にて作製したセメント芽細胞層および象牙芽細胞層を積層したブロックを免疫不全ラットの腹部大網組織に移植した。さらに移植 1 ヶ月後に再生組織を採取し、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 臨床応用可能なセメント芽細胞の分離・増殖技術の開発と評価

単離した歯小囊細胞を各種細胞外マトリックスでコートした培養皿で無血清培地にて培養を行い、細胞増殖能、セメント芽細胞特異的遺伝子の発現を確認した結果、この培養細胞はセメント芽細胞としての特徴を有することが示唆された。また 1 型コラーゲンやフィブロネクチンといった接着性蛋白でコートされた培養皿にて培養した細胞はノンコートにて培養した細胞よりも細胞増殖能およびセメント芽細胞特異的遺伝子であるアメロジェニン発現が増強された。

(2) *in vitro* における細胞の組織化技術の開発

培養 1 週間後におけるセメント芽細胞層および象牙芽細胞層を積層したブロックを作製することができた。細胞層間に介在させた組織吸収性メンブレン吸収は認められなかった。

(3) *in vivo* における再生組織の評価

歯小囊細胞層および象牙芽細胞層を積層したブロックをヌードラットに移植し、1 ヶ月後に再生組織を取り出した。歯小囊細胞および象牙芽細胞をメンブレンに播種し各々単層で積層したものをコントロールとした。積層させた細胞ブロックを移植した実験群はコントロール群と同様再生した歯冠部の再生認められたものの、歯根部の再生は認められなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO) (80304450)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	諸井 亮司 (MOROI RYOJI) (70325471)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	