

令和元年6月20日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20473

研究課題名(和文)新規リン酸カルシウム系歯内療法材料の開発と生体反応の分子基盤構築

研究課題名(英文) Development of a novel calcium phosphate-based endodontic material and assessment of this material to which based on the cellular responses

研究代表者

長谷川 智哉 (HASEGAWA, Tomoya)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：80761585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：覆髄剤としては水酸化カルシウム製剤が一般的であり、抗菌特性を有し、被覆組織の迅速な形成を可能にし、そして露出領域の治癒および閉鎖を促進すると考えられているが、その強いアルカリ性により歯髄に著しい刺激をもたらす、広範囲の歯髄壊死を引き起こす。このため、良好な生体適合性を有しそして硬組織被覆の形成を促進する新しい覆髄剤を開発する試みがなされてきた。本研究では、 α -TCP / Te-CPからなるセメントを3種開発し、培養ヒト歯髄幹細胞およびラット露髄モデルを用いてセメントの硬組織誘導性、生態親和性を評価し、水酸化カルシウム製剤よりも細胞親和性に富みながら、同等の硬組織誘導能を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄保存は、歯の長期保存にとって重要であるが、う蝕等によって歯髄が露出した場合は保存が難しい。このような場合、水酸化カルシウム製剤が直接覆髄剤として最も一般的である。しかしながら、強アルカリ性であり組織親和性の点で問題がある。そこで、本研究では細胞親和性、組織親和性に優れた覆髄剤を開発するためリン酸カルシウム系の α -TCP / Te-CPからなるセメントを3種開発した。そして、培養ヒト歯髄幹細胞とラット露髄モデルを用いてセメントの硬組織誘導性、生態親和性を評価し、水酸化カルシウム製剤よりも生態親和性、細胞親和性に富みながら、同等の硬組織誘導能を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp preservation is important for the long-term preservation of teeth. When pulp is exposed because of caries, it is considered difficult to preserve even a small amount, and therefore pulp removal is performed. In such cases, a calcium hydroxide preparation is most commonly used as a direct pulp-capping agent. Although this preparation is thought to have marked antibacterial properties, enabling rapid formation of a hard covering tissue, and promoting healing and closure of the exposed area, its strong alkaline properties results in significant irritation of the dental pulp and may cause extensive pulp necrosis. In this study, we investigated the cell biological effects of our three types of α -TCP/Te-CP cements using the cultured human dental pulp-stem cells (hDPSCs). We also histochemically evaluated dental pulp tissue responses in a rat pulp exposure model and attempted to optimization for implementation of α -TCP/Te-CP cement as a pulp-capping agent.

研究分野：歯内療法学

キーワード：リン酸カルシウムセメント 導 歯髄細胞 生体親和性 TCP/Te-CP 水酸化カルシウム製剤 MTAセメント 直接覆髄 硬組織誘

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

1. 研究開始当初の背景

近年、水酸化カルシウム製剤に代わって様々な歯内療法材料が開発され、接着性レジンシステムや Mineral Trioxide Aggregate (MTA)セメントが臨床応用されている。特に MTA セメントは直接覆髄や穿孔部の封鎖に用いられ、生体親和性と辺縁封鎖性が高いと報告されており、広く歯内療法に使用されてきているが、硬化であり、操作性の点でも問題があると報告されている。また、生体に及ぼす作用のメカニズムについても未だ明らかとなっていない。一方、リン酸カルシウム化合物は生体親和性が良好と報告されており、硬組織誘導能を期待できる材料とされていることから、硬組織の無機成分であるヒドロキシアパタイトと同等の Ca/P 比からなる β -リン酸三カルシウム (β -TCP)/リン酸四カルシウム (Te-CP) 混合セメントを作製して、その覆髄薬としての特性を解析してきた。しかしながら、既存の歯内療法材料を含め、歯髄組織や歯の周囲組織の細胞応答に関しては未だ不明な点が多数残っている。また近年では、硬組織の形成過程でのクロマチン上のエピジェネティック因子の関与が報告されるようになってきた。そこで、本研究は、独自に開発した β -TCP/Te-CP 混合セメントと、比較対照として既存の歯内療法材料である水酸化カルシウム製剤や MTA セメントを用い、歯髄由来の細胞や歯根膜細胞、骨芽細胞、線維芽細胞等を歯内療法材料存在下で培養し、遺伝子発現変化等の細胞応答の解析に加え、エピジェネティック因子の関与について解析した。

2. 研究の目的

近年、水酸化カルシウム製剤に代わって様々な歯内療法材料が開発され、臨床応用されてきている。しかしながら、歯内療法材料に対する生体の応答についての詳細な解析はなされていない。一方、硬組織形成の過程では、クロマチン上でのエピジェネティック因子の関与が、近年明らかとなってきており、歯とその周囲の組織由来の培養細胞を用いて、歯内療法材料存在下での遺伝子発現変化等の細胞動態解析に加え、細胞のクロマチン構造の変化を解析することは、将来的に歯質再生の人為的コントロールや新たな歯科材料開発につながると期待できる。このような背景から、そこで、本研究は歯内療法材としてヒドロキシアパタイトと同等の Ca/P 比からなる β -リン酸三カルシウム (β -TCP)/リン酸四カルシウム (Te-CP) 混合セメントを適用した場合の、材料周囲の細胞の動態や応答調節機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット露髄モデルへの直接覆髄あるいはマウス皮下組織での材料周囲組織の応答解析 ラット露髄モデルへの直接覆髄実験

8週齢の雄性 Wistar ラットの右側上顎第一臼歯を歯科用エンジンにて露髄させ、2M リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした β -TCP/Te-CP 混合セメントあるいは比較対照として水酸化カルシウム製剤を填入する群を作製し覆髄部での歯髄組織の反応、および被蓋硬組織形成過程でどのような細胞が機能しているかを検討するため、パラフィン包埋切片を経時的に作製して組織化学的・免疫組織化学的解析を行った。本実験は朝日大学動物実験専門委員会の承認(承認番号 16-024, 17-016)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。

HE 染色による組織化学的解析

覆髄部および皮下埋植部の組織の経時的な変化と、被蓋硬組織形成や硬組織誘導の有無、形成された組織の形態を比較検討した。特に直接覆髄モデルでは象牙芽細胞様の細胞の有無、象牙細管様の構造の形成、被蓋硬組織の裂隙の有無等を詳細に観察した。

免疫染色による免疫組織化学的解析

細胞増殖マーカー Ki67 およびマクロファージマーカー CD68 を検出するため免疫染色を行った。また、覆髄直下の組織での細胞死を観察するため TUNEL 染色を行った。

(2) 歯内療法材料存在下での周囲組織由来細胞の動態解析

歯内療法材料存在下での細胞の遺伝子発現変動解析

β -TCP/Te-CP 混合セメント、あるいは水酸化カルシウム製剤や MTA セメントを塗布した培養皿、または各種セメントを浸漬した培養液を用いて歯髄由来幹細胞 (hDPSC) を培養し、セメントあるいはセメントからの溶出物存在下での培養細胞から経時的に総 RNA を回収し、骨芽細胞や象牙芽細胞等のマーカー遺伝子の発現解析を行い、石灰化促進能、硬組織形成細胞への分化誘導能について検討した。

歯内療法材料存在下での細胞の分化動態解析

で培養した細胞の骨芽細胞様細胞や象牙芽細胞様細胞への分化の指標となる、アルカリホスファターゼ (ALP) の活性や石灰化の度合いを検討し、mRNA 発現変化との相関性を検討した。

で得られた試料をもとに、リアルタイム PCR 法によりエピジェネティックな因子の探索を

行った。また、遺伝子の転写制御、細胞の分化調節に重要なヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の関与を阻害剤の1つであるトリコスタチン A (TSA)を用いて評価した。

(3) 歯内療法材料存在下での細胞応答に關与するエピジェネティック因子のスクリーニング DNA メチル化解析として、バイサルファイト処理した試料を用いて、骨芽細胞分化に必須の転写因子の発現調節領域を中心にメチル化部位特異的 PCR にて解析するための試料収集を行った。

4. 研究成果

ラット露髄モデルへの直接覆髄による材料周囲組織の応答解析とマウス皮下組織埋入実験および各種セメントに対する培養細胞の応答解析行い以下の結果を得た。

(1) ラット露髄モデルへの直接覆髄実験として、8週齢の雄性 Wistar ラットの右側上顎第一臼歯を露髄させ、2M リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした -TCP/Te-CP 混合セメントあるいは比較対照として MTA セメントや水酸化カルシウム製剤を填入する群を作製し覆髄部での歯髓組織の反応、および被蓋硬組織形成過程でどのような細胞が機能しているかを経時的に切片に作製し、組織化学的・免疫組織化学的解析を行ったところ、覆髄後 7~14 日で、-TCP/Te-CP 混合セメント覆髄群に被蓋硬組織形成がみとめられ、列をなす象牙芽細胞様細胞が観察された。

(2) ラット露髄モデルへの直接覆髄後の覆髄部での歯髓組織の反応として、炎症反応の有無を解析するために覆髄後 7~14 日で CD68 等、マクロファージマーカーの免疫組織学的解析と、形態学的な炎症の有無を検討したところ水酸化カルシウム製剤覆髄群では覆髄 7 日後で炎症反応が顕著にみられたのに対し、-TCP/Te-CP セメント覆髄群では炎症反応はみとめられなかった。

(3) 各種セメントから溶出する成分を含む培地を用いて hDPSC 培養系での評価を行ったところ、水酸化カルシウム製剤からの溶出物を含む培地は pH8.8~9.0 となり細胞属性、細胞増殖阻害を示したが、-TCP/Te-CP 混合セメントからの溶出物を含む培地は MTA セメントと比較しても細胞増殖を阻害せず、両者ともに細胞毒性を示さなかった。さらに、固定した細胞を用いてアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色を行ったが、-TCP/Te-CP 混合セメントで経時的に染色性が増加した。また、MTA セメントと比較して、TCP/Te-CP セメントからの溶出物を含む培地は骨芽細胞マーカーであるアルカリホスファターゼやオステオカルシン、象牙芽細胞マーカーでもある DMP-1 の mRNA 発現量が顕著に増加し、-TCP/Te-CP セメントが硬組織形成細胞への分化誘導能を有することが示された。

(4) (3) と同様に各種セメントからの溶出物を含む培地を用いて hDPSC を培養した試料を DNA メチル化解析キットを用いて解析し、メチル化特異的 PCR の試料として回収した。

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. 上顎小臼歯に 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 5 件)

1. 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.
2. 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.
3. 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髓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.
4. 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.

5. 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

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯内療法学ホームページ
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~hozon/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(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。