

令和 2 年 9 月 7 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11923

研究課題名(和文) 歯と歯周組織同時再生治療の開発 - 歯胚移植の可能性 -

研究課題名(英文) Development of Simultaneous Regeneration Treatment for Tooth and Periodontal Tissue -Possibility of Tooth Germ Transplantation-

研究代表者

芳澤 享子 (Yoshizawa, Michiko)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60303137

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)：本研究はマウス臼歯の大腿筋内移植モデルとすでに確立された骨再生法を併用することで、歯の移植と同時に骨再生を図ることを目的とした。3週齢マウスの臼歯を抜去し、同系マウスの長管骨髓より単核球分画(MNC)を分離した。歯の移植時に -TCPを加える群、TCP+MNCの群、歯のみ(対照群)の3群を設定し、術後4週で摘出し、画像的、組織学的検索を行った。全群で歯根間に新生骨を認めたと、実験群では根側壁に新生骨を認めた。実験群では有意に新生骨が多く、骨梁の成熟、新セメント質形成も認め、未成熟な歯根膜再生も認められた。以上より、本手法によって歯の移植後に歯周組織再生を期待できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の移植は機能していない歯を活用し、移植後に良好な治癒が得られれば正常歯と同様に機能することから、有用な治療法の一つである。しかしながら、成人の歯は歯根膜再生は果たせるものの、失われた歯周組織再生能力は有しておらず、歯移植の成功には受容部の十分な骨と歯肉が不可欠である。本研究では、失われた歯周組織と歯の同時再生をめざす新たな歯の移植治療の開発を目的としたところ、移植後に良好な歯周組織再生が認められた。そのため本研究を基盤にさらに新たな研究を進めることで、これまで歯の移植が困難であった症例にも適応が拡大でき、高齢になっても自分の歯でおいしく食事ができるというニーズに応えることができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the potential of alveolar bone regeneration at the time of tooth transplantation using an animal model. Mononuclear cells (MNCs) were collected from the bone marrow. The molar of 3-week-old mice and -tricalcium phosphate (-TCP) were combined and transplanted with or without MNCs into thigh muscle of syngeneic mice. Tooth alone was transplanted as a control. After 4 weeks, the transplants were harvested and analyzed. Newly formed bone was observed on the lateral wall of the root in the experimental group, while less bone formation was observed in the control group. Bone Volume was significantly larger in -TCP group than that of the control group. Earlier maturation of trabecular bone in MNC+ -TCP group than control group. Regeneration of collagen fibers were noted in all groups, which exhibited periostin. This study showed the accelerated alveolar bone and periodontal tissue regeneration when the tooth transplantation was performed with -TCP.

研究分野：口腔顎顔面外科

キーワード：口腔顎顔面再建外科学 再生医療 歯 歯周組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの歯の移植研究

組織工学的アプローチによる歯の再生はいまだ臨床応用に到達できていない。そのため歯の移植は、機能していない歯を活用し、移植後に良好な治癒が得られれば正常歯と同様に機能することから、歯の欠損を補う方法として有用な治療法の一つである。歯の移植は1950年代より主に歯根未完成歯移植の報告されてきた一方で、わが国で一般的に行われている歯根完成歯移植は主に1980年代より報告されてきた。しかしながらドナー歯の歯根完成度に関わらず、歯の移植における成功基準に関しては、歯根吸収の有無、歯根成長、歯髄の血行再生など、あくまで歯根未完成歯移植における要素が議論の中心であった。そしてAndreasen JO.らによる歯根吸収発生機構の解明や小臼歯移植の予後因子の検討(Eur J Orthod1990)、Schwartz O.らによる根未完成、完成歯移植における予後因子の検討(Int J OralSurg1985)などにより、歯の移植における成功要因はほぼ解明されたと考えられていた。しかし、わが国では成人の智歯を中心とした歯根完成歯移植が多いために、これまでの海外における研究成果と実際の臨床現場での問題点が乖離し、結果的に歯の移植は経験則的な治療と位置づけられてきた。

(2) 近年の国内外における歯の移植研究

代表者が2015年度まで所属し中心的役割を果たしてきた新潟大学医歯学総合病院「歯の移植外来」では、主に歯根完成歯移植をこれまでに約1000例行い、90%の症例が良好に経過している(Sugai T, Yoshizawa M, et al. Int J Oral Maxillofac Surg 2010)。さらに関連各科とのチーム医療や歯の移植のプロスペクティブ研究を行い、歯根完成歯移植における移植歯喪失メカニズムや予後因子について検討した。その結果、歯根完成歯は歯根膜再生は果たせるものの、歯根未完成歯や歯胚とは異なり、失われた歯周組織再生能力は有しておらず、歯根完成歯移植の成功には受容部の十分な骨と歯肉が不可欠であることが示された(長谷川勝紀, 芳澤享子, 他, 日口科誌 2009, Aoyama S, Yohshizawa M, et al. OS OM OP OR Endo 2012)。一方海外では現在、根未完成歯のみならず歯胚を骨・歯肉がない部位に移植し、歯の発育とともに歯周組織の同時再生を誘導する治療が現実味を帯びてきている(Plakwicz P Am J Orthod Dentofac Orthop 2016)。そのため2016年5月にポーランドで開催された第1回歯の移植学会において、代表者が報告したわが国での一般的な歯の移植は特殊な治療として議論された。その一方で我々は、方向異常により萌出困難となった歯胚を顎骨内で外科的に回転させることで、機能歯として発育し良好な萌出が得られた症例を経験していることから(小山貴寛, 芳澤享子, 日口外誌, 2013)、歯胚が今後の歯と歯周組織再生治療の鍵になると考えた。

(3) 口腔領域の再生研究

我々はこれまで歯根膜、歯槽骨、歯肉、口腔粘膜など歯周組織再生に関する研究をさまざまな角度から行ってきた。歯の移植の歯周組織再生の研究としては、ラットの凍結保存歯の皮下移植モデルや臨床症例において凍結保存により歯周組織再生は遅延する傾向にあることを示した(Yoshizawa M et al., Dental traumatol, 2013, Izumi N, Yoshizawa M, et al., Int J Oral Maxillofac Surg, 2007, 科研基盤(C) H25-27, 科研基盤(C) H19-21)。歯の移植へ多血小板血漿(PRP)を応用する動物モデルでは、PRPは歯肉の上皮再生には大きく関与しない一方で、早期からの血管新生および肉芽組織の増生によって歯周組織の再生を促進する可能性を示した(基盤研究(C) H22-25, OS OM OP 投稿中)。さらに歯槽骨再生に関してはラット皮下あるいは頭蓋骨移植モデルを用い、間葉系幹細胞に加えて吸収性プレートおよび骨補填剤を応用した検討を行い、間葉系幹細胞の関与により骨再生が促進される結果も得ている(小島拓, 芳澤享子, 日口外誌 2016, 基盤(C) H27-29, 基盤(C) H22-24, 小野由紀子, 芳澤享子, 日口外誌 2007, 基盤(C) H19-22)。歯肉再生に関しては、口腔粘膜上皮細胞と無細胞真皮より作製した培養粘膜のマウス口腔内あるいは皮下移植モデルによって、培養粘膜により粘膜再生が促進されること、それは培養上皮細胞からの成長因子の放出による早期の再上皮化や血管新生誘導によること、さらには口腔上皮前駆/幹細胞の応用によってすぐれた早期の粘膜再生が望めるなどの結果を得ている(Yoshizawa M, et al, J Oral Maxillofac Surg, 2012, 科研(B) H16-18, 基盤(C) H20-22, H22-25, H26-28)。

2. 研究の目的

本研究では、失われた歯周組織と機能する歯の同時再生をめざす新たな歯の移植治療の開発を最終目的に、歯周組織再生研究で得た手法や結果を応用して、歯胚および歯胚幹細胞、歯根未完成歯の動物移植モデルを開発し、その歯周組織再生メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

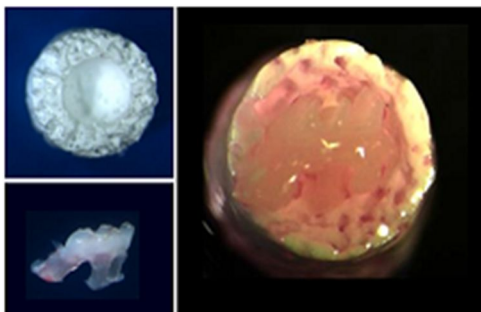
(1) 歯根未完成歯移植モデルの作製

担体として β -TCPブロックを用いて、直径2.8 mm、高さ2 mmの円柱内に歯を挿入するために直径2 mm、深さ1 mm 陥凹を作製した。

3週齢の雄C57BL/6Jマウスの臼歯(M1, M2)の抜去を行った。抜歯したマウスの大腿骨・脛骨をフラッシュアウトにより骨髓細胞を採取し、密度勾配遠心法を用いて骨髓単核

球細胞 (BM-BNCs)を採取した。BM-MNCs は、CD105, CD90.2, CD29, PE/Cy7, Sca-1, CD15 (SSEA-1), CD11b, CD45 を用いて flow cytometry で分析した。

β -TCP ブロックに BM-MNCs (1.0×10^6 cells) を β -TCP に滴下, 抜去した歯を挿入し細胞-担体複合体を作製した。



<細胞 - 担体複合体>

(2) 細胞-単体複合体を大腿筋内に移植, 定量的, 組織学的, 免疫組織学的観察

細胞-担体複合体を6週齢の雄 C57BL/6J マウスの大腿筋内に移植を行った群を MNC 群とし, β -TCP に培養液を滴下し歯を挿入, 移植した群を β -TCP 群とした。歯のみを大腿筋内へ移植した群を対照群とした。移植後4週後に周囲組織を含めて切除し, 摘出した。

摘出物を動物用 μ CT で撮影, TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering)を用いて, 骨組織体積 (TV), 骨体積 (BV), 骨密度 (BV/TV), 骨表面積 (BS), 骨量幅 (Tb Th), 骨梁数 (Tb N), 骨梁間隙 (Tb Sp), 骨梁中心距離 (Tb Spac), 骨パターンファクター (Tb Pf), ストラクチャーモデルインデックス (SMI), フラクタル次元について定量的に観察した。

摘出物をホルマリン固定, パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

Periostin, Osteopontin, Osteocalcin に対して免疫組織化学的に検索した。

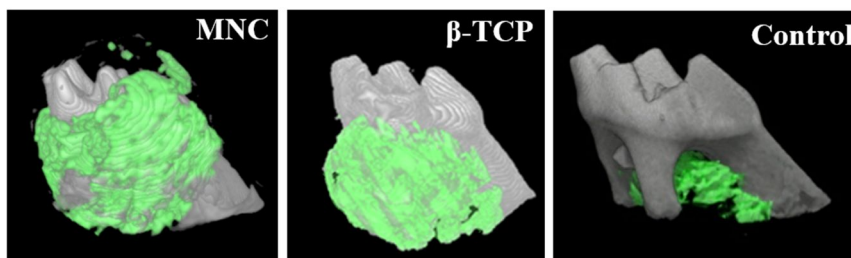
4. 研究成果

(1) Flow cytometry の分析

CD105+細胞は 14.5%, CD90+細胞は 7.1%, CD105+/CD90+細胞は 3.4%であった。CD29+細胞は 96.7%, Sca-1+細胞は 10.4%, CD11b+細胞は 27.1%, CD45+細胞は 89.1%, CD29+/CD90+/CD45-細胞は 0.5%であった。SSEA-1 は陰性であった。

(2) 移植実験

1) 新生骨の定量的観察



< μ CT-3D 画像>

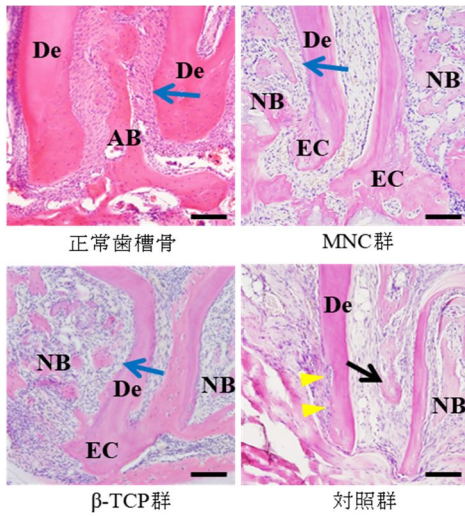
全群で根管中隔に新生骨の形成が認められた。実験群 (MNC 群, β -TCP 群) ではともに歯根外側への新生骨の形成を認めた。

新生骨の TRI/3D-BON による解析では骨組織体積 (TV), 骨体積 (BV), 骨表面積 (BS) はいずれも MNC 群が一番大きく, 次に β -TCP 群, 対照群が一番小さい傾向を示した。実験群は対照群と比較し有意に大きく, 実験群で骨形成量が増大している事を示した。また, 骨梁の性状を示す骨梁幅と, 骨梁構造の複雑さを示すフラクタル次元では, 対照群と比較し, MNC 群で有意に大きく骨梁の成熟と骨梁表面の凹凸が複雑であることを示した。MNC 群と β -TCP 群では MNC 群が骨形成量と骨梁の成熟を示す項目の増大傾向を認めたが, いずれの項目でも有意差はなかった。

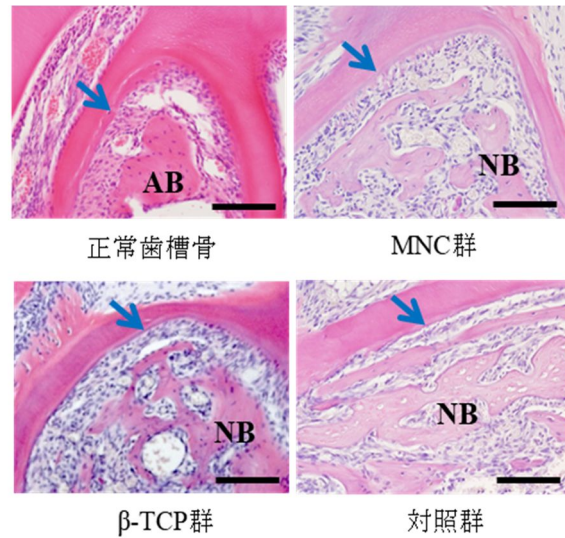
2) 新生骨および歯周組織の形態学的観察

<HE 染色>

歯根外側



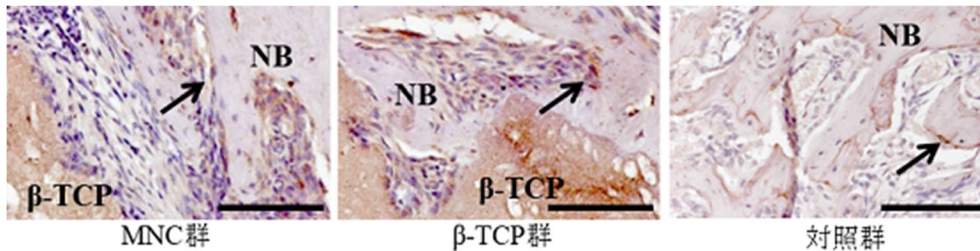
根管中隔



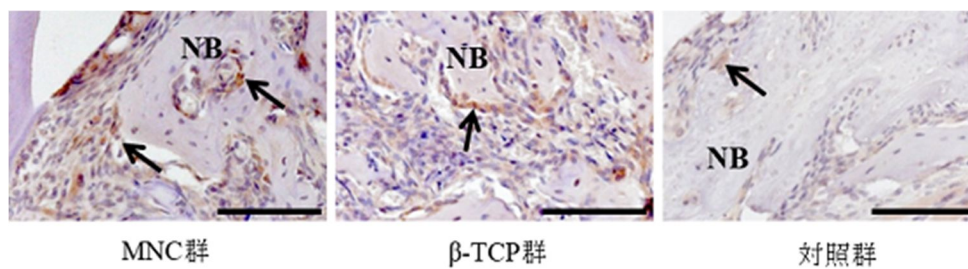
正常歯槽骨と比較し全群で未熟な新生骨を認めた．新生骨と歯根間には結合組織で保たれていた（青矢印）．根尖部は実験群においてセメント質様組織の肥大が観察された．対照群では歯根吸収が時折観察された（黄矢頭）．また全群において半数を超えるサンプルで歯髄腔内に骨様組織（黒矢印）を認めた．

<免疫染色>

Osteopontin



Osteocalcin

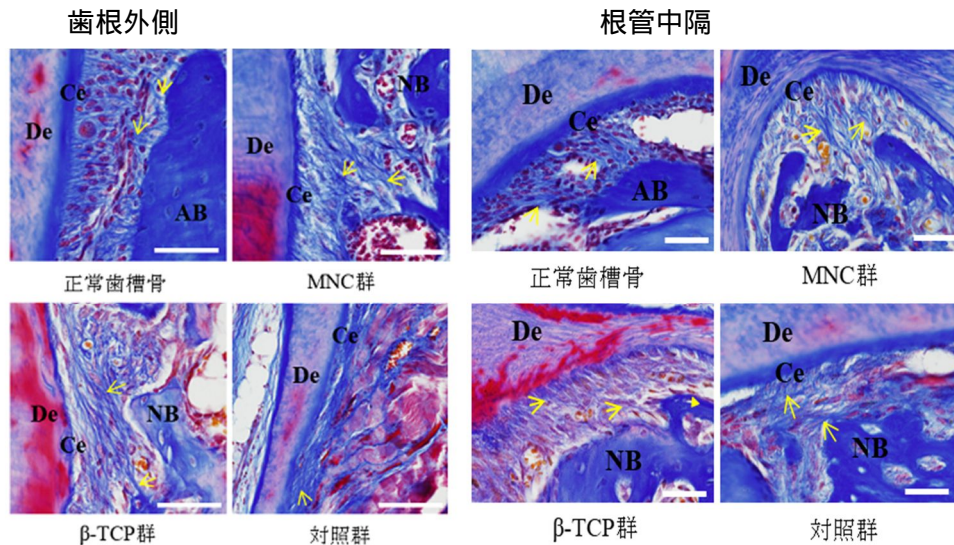


OPN 陽性細胞，OCN 陽性細胞は全群で新生骨周囲に観察された（黒矢印）．OCN 陽性細胞は，MNC 群，β-TCP 群の新生骨内部にわずかに反応した．

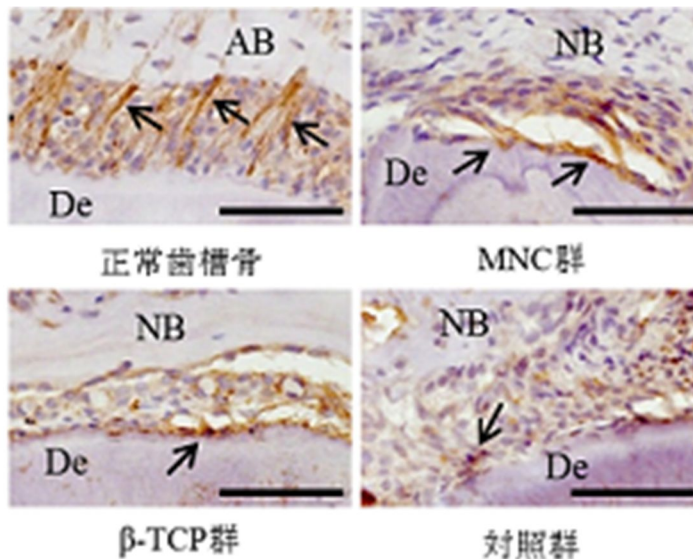
3) 歯根膜の形態学的観察

< Masson's trichrome 染色 >

実験群では歯根膜腔に膠原線維（黄矢印）が観察された．歯根外側において，実験群では，垂直または斜走する膠原線維が確認された．根管中隔において実験群では，膠原線維は新生骨とセメント質の間を垂直方向に走行していた．一方対照群では，歯根外側，根管中隔どちらにおいても，平行に走行する線維も観察された



<免疫染色>
Periostin



実験群では、歯根と新生骨の間の膠原線維は、Periostin にわずかに陽性反応を示した(黒矢印)。しかし、染色強度は低く、新生骨への侵入は、正常歯槽骨と比較して明確でなかった。群間のペリオスチン陽性構造に形態的差異は観察されなかった。

(3) まとめと考察

Flow cytometryの結果では CD105+細胞は 14.5%、CD90+細胞は 7.1%、CD105+/CD90+細胞は 3.4%であった。また、CD29+/CD90+/CD45-細胞は 0.5%であった

これらは過去の報告と類似しており、MNC の分離が成功したと考えられた。

実験群では、歯根外側に新生骨形成が観察され、定量的に対照群と比較し有意に骨量の増加が認められた。これは、β-TCP の骨伝導効果と多孔質構造である事による血管侵入のスペース確保によるものが考えられた。また、β-TCP には骨髄間葉系幹/間質細胞による骨再生を促進、ALP を活性化させ、Runx2、Osteopontin、Osteocalcin などの骨形成に関連する遺伝子の発現を促進する環境を生成する事が示唆されており、この性質が骨形成に影響を与えた可能性があった。

一方、MNC 群と β-TCP 群間では新生骨量の有意差がなかった。CD29+/CD90+/CD45-細胞として定義された BM-MNCs の MNC の割合は、0.5%と比較的低い割合であり、移植した領域で骨形成を補助するには不十分な可能性が考えられた。一方、骨梁構造について MNC 群は対照群と比較して有意に大きかった。BM-MNCs の血管新生と内皮細胞の成長を刺激する成長因子を分泌する事が知られており、骨の成熟に対して影響している可能性が示唆された。

移植された歯根周囲には歯根膜腔が保たれており、新生骨と歯根に付着する歯根膜の再生が確認できた。歯根膜は未熟であったが、Periostin 陽性細胞の存在は移植後の歯根膜の存在を示唆していた。但し、歯周組織の成熟には機械的刺激を加えてから比較的長期間を要する事が報告されており、機械的刺激を与える同所移植モデルの使用の必要性が考えられた。

β-TCP による歯の同時移植は、マウスの異所性歯移植モデルにおける歯周組織再生を促進させ、BM-MNCs が歯周組織の成熟を促進する機能を持っている可能性があることを示した。本研究は十分な骨幅のない患者にとって、歯の移植のための有望なアプローチである可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li X, Li N, Chen K, Nagasawa S, Yoshizawa M and Kagami H	4. 巻 24
2. 論文標題 Around 90° Contact Angle of Dish Surface Is a Key Factor in Achieving Spontaneous Spheroid Formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part C Methods.	6. 最初と最後の頁 578-584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEC.2018.0188.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka M, Yamashita-Mikami E, Akazawa K, Yoshizawa M, Arai Y and Ejiri S	4. 巻 20
2. 論文標題 Trabecular bone microstructure and mineral density in human residual ridge at various intervals over a long period after tooth extraction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Implant Dent Relat Res	6. 最初と最後の頁 375-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cid.12591.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen K, Li X, Li N, Dong H, Zhang Y, Yoshizawa M and Kagami H	4. 巻 2019
2. 論文標題 Spontaneously Formed Spheroids from Mouse Compact Bone-Derived Cells Retain Highly Potent Stem Cells with Enhanced Differentiation Capability.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/8469012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li N, Li X, Chen K, Dong H and Kagami H	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-019-1283-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内川恵里, 芳澤享子, 松村奈穂美, 李 憲起, 各務秀明
2. 発表標題 歯の移植と歯槽骨再生同時治療のための基礎的研究.
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chen K, Li X, Li N, Dong H, Yoshizawa M, and Kagami H
2. 発表標題 Generation and analysis of sphere-forming cells from mouse compact bone
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li N, Li X, Chen K, Dong H, Yoshizawa M, and Kagami H
2. 発表標題 Characterization of sphere-forming cells from mouse oral mucosa
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 芳澤享子
2. 発表標題 歯の移植 - 歯根完成歯から未完成歯、そして歯胚移植へ -
3. 学会等名 第32回甲北信越矯正歯科学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内川恵里, 芳澤享子, 李憲起), 各務秀明
2. 発表標題 歯担体と細胞を併用した歯の移植に関する基礎的検討.
3. 学会等名 第73回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li N, Li X, Chen K, Dong H, Yoshizawa M and Kagami H
2. 発表標題 Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells.
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen K, Li X, Li N, Dong H, Yoshizawa M and Kagami H
2. 発表標題 Generation and analysis of spheroid from mouse compact bone-derived cells.
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchikawa E, Yoshizawa M, Matsumura N, Li X and Kagami H
2. 発表標題 The basic study about transplantation of teeth combined with bone regeneration therapy.
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村奈穂美, 李 憲起, 内川恵里, 李 二, 陳 凱, 董 宏偉, 芳澤享子, 各務秀明
2. 発表標題 コラーゲン担体および骨髄単核球細胞がマウス歯牙移植モデルにおける歯周組織再生に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔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	各務 秀明 (Kagami Hideaki) (80242866)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授 (33602)	
研究分担者	小出 雅則 (Koide Masahiro) (10367617)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授 (33602)	
研究分担者	小山 貴寛 (Koyama Takahiro) (30444178)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	