

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K12000

研究課題名(和文) 結合組織性付着に有効な因子を使った新規歯周組織治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of new periodontal tissue therapy using factors effective for connective tissue attachment

研究代表者

菱川 敏光 (Hishikawa, Toshimitsu)

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：10421249

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)：歯周組織の治癒の安定に重要と考えられる歯のエナメル質とセメント質表層の上皮性および結合組織性付着の再生が有利に誘導できる条件を明らかにすることを目的として、ラットin vivo細胞移植実験を行なった。移植実験のために歯槽骨の欠損を認めない軽度歯周病を模した歯周組織欠損モデルを確立することができた。また、歯肉由来線維芽細胞および歯根膜由来線維芽細胞を採取し、細胞移植治療に用いる担体の検討を行い、適切な担体を選択することができた。ラット歯周組織欠損モデルにおいて、歯肉由来幹細胞を含む細胞群と担体を用いた移植治療による治癒過程を確認し、細胞移植がセメント質の再生に有効に働く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

歯周組織再生に関して、歯槽骨を含む歯周組織欠損をより良く改善するために様々なアプローチが行われてきた。臨床的には創部を封鎖するために、歯肉の上皮性および結合組織性付着が早期に強固なものとなることが重要と考えられる。本研究において、歯肉に局限した創傷治癒に特化した実験モデルを確立し、微小な軟組織欠損に対する細胞移植の方法、およびその治癒過程を示すことができた。今後、このモデルを活用することで、歯肉の歯に対する付着に焦点を絞った再生実験、分析を行うことにより、広く歯周外科処置の治癒に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vivo cell transplantation experiments were conducted in rats to elucidate the conditions that favor the regeneration of epithelial and connective tissue attachments to the surface layers of tooth enamel and cementum, which are thought to be important for the stability of periodontal tissue healing. For the transplantation experiments, we were able to establish a periodontal tissue defect model that mimics mild periodontal disease without alveolar bone loss. In addition, we collected gingival-derived fibroblasts and periodontal ligament-derived fibroblasts, examined the carriers for cell transplantation therapy, and were able to select appropriate carriers.

In a rat periodontal tissue defect model, we confirmed the healing process of transplantation therapy using a group of cells including gingival-derived stem cells and carriers, suggesting that cell transplantation may be effective in regenerating cementum.

研究分野：再生医療

キーワード：歯周組織再生 細胞移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病の有効な治療法の一つである歯周組織再生療法は、歯根表面へのセメント質の再生を基盤として歯根膜、歯槽骨といった歯周組織の改善を目指すものである。その適応は主に残存歯周組織の形態に強く依存し、歯周組織再生の成功は条件の整った局所に限られる。近年、細胞移植による歯周治療に注目が集まり、動物実験では歯周組織の水平的な欠損の回復が報告され<sup>1</sup>、また、臨床的にも自己由来脂肪幹細胞を用いた歯周組織再生療法の臨床研究が行われている<sup>2</sup>。これらの報告は歯周組織再生における幹細胞移植の有効性が高いことを示唆しているが、歯周外科治療後の治癒に重要なエナメル質とセメント質表面に誘導される上皮性および結合組織性付着の再生が有利に誘導される条件は明らかにされていない。

歯周組織再生は常に外力と感染に脅かされている最前線の組織で再生を成功させる必要がある点に困難が伴う。そのため、処置後の治癒過程では、まず歯と歯肉の付着が形成されることにより歯肉の外部からの防御機能が回復され、歯周組織が再生可能な環境を確保することが重要であると考えられる。一方で、GTR法の原理とされている Melcher の仮説<sup>3</sup>からは、生育の早い上皮細胞の根尖側への伸長を阻害し、歯根膜由来の細胞を歯根面に誘導するためのスペースを確保することが重要であると考えられている。細胞移植による歯周組織再生療法はこのどちらの条件にも適切な治療法と考えられるが、多くの研究が歯槽骨や歯根膜の再生に注目しており、術後初期の歯肉の機能回復について、特に歯面への上皮性付着および結合組織性付着の形成速度、その過程および形成される付着の性質については明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究ではいずれも歯周組織再生に有効と考えられている2種の間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生治療を行い、上皮性付着および結合組織性付着の形成を経時的に観察・比較し、細胞移植治療によって得られる付着様式の特徴を明らかにする。また、再生された組織の網羅的な遺伝子解析によって、上皮性付着および結合組織性付着を促進させる因子を明らかにし、予後の安定に寄与する因子を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット由来幹細胞の採取

6週齢雄性SDラットに3種混合麻酔(ドミツール・ミダゾラム・酒石酸ブトルファンール)の腹腔内投与を行い、安楽死・断頭後に口蓋側歯肉の採取し、コラゲナーゼ処理により組織を分散させたのち、10%ウシ胎児血清(FBS)、200 µg/ml のペニシリン・ストレプトマイシンを添加した -MEM にて、37.5 °C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で選択培養を行い、4日ごとに培地の交換を行い、3継代の歯肉由来細胞線維芽細胞の採取を行った。

歯根膜由来細胞についても、同様の方法で6週齢雄性SDラットを安楽死させたのち、第一臼歯、第二臼歯を抜歯し、1mg/ml ゲンタマイシン、25 µg/ml ファンギソン、500 µg/ml ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した PBS(-) 中で光学顕微鏡を用いて歯根膜組織の剥離を行い、ACCUMAX (Innovative Cell Technologies, San Diego) 処理により組織を分散させたのち、10%ウシ胎児血清(FBS)、1mg/ml ゲンタマイシン、25 µg/ml ファンギソン、500 µg/ml ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した -MEM にて、37.5 °C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で静置培養を行い、7日ごとに培地の交換を行い、3継代の歯根膜由来細胞線維芽細胞の採取を行った。

#### (2) 歯肉欠損移植治療モデルの確立

歯周組織欠損は10週齢雄性SDラットの第一臼歯の近心および口蓋側の歯肉に対して、ENAPを模して歯肉内縁をメスにより切離し、歯肉欠損内部に露出したセメント質を超音波スケーラーにて削除することで作成した。

続いて歯肉の微小欠損に対する細胞移植に適した移植担体の検討として、µGel 40 (BRTI, Minnesota, USA)、2%アテロコラーゲンインプラントおよびコラーゲンスポンジハニカム CSH-10 (ともに KOKEN Co., LTD, Tokyo, Japan) に歯肉由来線維芽細胞  $1 \times 10^5$  を播種し、歯肉欠損に対する移植実験を行った。

#### (3) 組織切片・マイクロCTの分析による歯周組織の評価

移植後7日、14日、21日(各群3頭)の安楽死を行い、エナメル質表面を含めた歯周組織の状態を確認するため、摘出後の上顎組織を川本法に則り非脱灰凍結標本を作成した。イソペンタンおよび液体窒素を用いてSCEM(ライカマイクロシステムズ)に包埋し、クリオスタットを用いて薄切後、10%PFAにて組織の固定を行った上で、HE染色を行い歯肉組織の形態計測を行った。また、歯周組織欠損作成に伴う侵襲による骨の状態変化を確認するため、マイクロCT(Cosmoscan GX; Rigaku Co., Tokyo, Japan)により撮像し、OsiriX(Pixmeo SARL, Geneva, Swiss)で分析を行い歯槽骨形態の確認を行なった。

#### 4. 研究成果

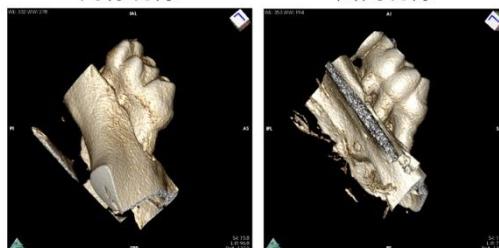
##### (1) ラット由来幹細胞の採取

歯肉由来細胞線維芽細胞は、口蓋歯肉組織から 0.2% コラゲナーゼを用いた組織分散を行うことで採取した。初代培養において明らかに上皮細胞群と認められたコロニーを排除することで、線維芽細胞のみを培養することができた。3 継代の歯肉由来細胞線維芽細胞を用いて CFU-F アッセイを行い、得られた線維芽細胞の約 30% に高い増殖活性を確認することができた。歯肉由来細胞については実験に供するに十分な細胞数を凍結保存することができた。一方、歯根膜由来細胞については、実験開始当初は歯肉由来細胞と同様の採取・培養方法を行なったが、組織片が微細であるため初代培養が困難で、また、口腔内細菌によるコンタミネーションを繰り返した。歯根膜組織の採取・培養方法に改良を重ね、各種抗菌薬を添加した PBS(-) 中で光学顕微鏡を用いて歯根膜組織を採取すること、組織分散に用いる酵素剤の種類を検討することで、組織片や細胞のロスを少なくし、静置培養の培地量を調整することで組織片からの外生細胞の付着を促すことで、歯根膜由来細胞線維芽細胞の採取を行うプロトコルを完成することができた。しかしながら、歯根膜由来細胞については増殖活性が乏しく、採取した細胞の質の問題が今後の課題となった。

##### (2) 歯肉欠損移植治療モデルの確立

歯周組織欠損は再現性を持って作成することができた。マイクロ CT の分析より、歯肉欠損作成時の骨に対する侵襲が骨吸収を惹起することが示唆されたため、歯肉付着が再構築される過程を明らかにすることを目的とした本実験において、適切な歯周組織欠損モデルは歯肉内縁およびセメント質欠損とした。

大きな歯肉欠損では骨吸収が惹起された  
内縁切除                      歯肉切除

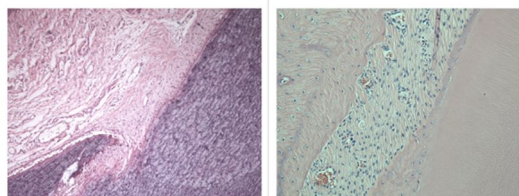


歯肉欠損に用いる移植担体の検討では、移植細胞の定量性の観点から  $\mu$  Gel 40 を第一選択と考えた。ラット歯肉由来線維芽細胞  $1 \times 10^5$  を播種する予備実験を行なった。無菌操作および担体に対する細胞播種性に優れていたが、ゲル中に均一に細胞を播種・培養することは困難であった。微細な歯肉欠損に対して定量的な移植を行うためには担体中に細胞を均一に分布させた上で、担体を小さく形態を整えて移植できることが条件と考えられたが、本品では困難であった。また、キトサンを含む本品の組成が分析時に問題となる可能性が示唆された。このため、アテロコラーゲンインプラントおよびコラーゲンスポンジハニカムを候補として同様の検討を行った。アテロコラーゲンインプラントはシリンジからゲルを直接利用できる点で操作性に優れていたが、ゲル内に細胞を均一に分散させること、および細胞播種後の担体の大きさを規定して安定的に移植することが困難であった。一方、コラーゲンスポンジハニカムについても、細胞を担体内に均一に播種すること、細胞を定量して定着させること、は他の担体同様に困難であったが、ハニカム構造を利用して他の担体に比べて細胞播種・培養時に大きな体積であっても移植時に縮小することができ、小さな歯肉欠損の内部に留置することが可能であったため、歯肉欠損モデルに最も適した担体として採用することを決定した。

##### (3) 組織切片・マイクロ CT の分析による歯周組織の評価

歯肉切除による歯周組織欠損の内面に存在する歯根表面は 0.8mm から 1.0mm 程度であった。全ての実験群で欠損内部に面するセメント質を完全に除去することができた。組織の状態評価のために非脱灰凍結切片を作成する川本法と、脱灰組織を用いた従来のパラフィン切片の組織像を比較したところ、歯周組織の歯肉線維の走行や象牙質内の構造の観察にはパラフィン切片が適していると考えられた。一方、本研究において注目するエナメル質に対する歯肉の付着状態や、セメント質の状態は非脱灰切片による観察が適していた。

歯槽骨頂付近のセメント質および歯根膜の観察



非脱灰凍結切片

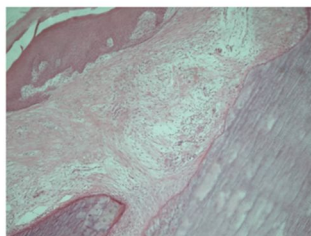
脱灰パラフィン切片

歯肉切除後の治癒に関して、コラーゲンハニカムのみを移植した場合には、移植後 7 日では炎症性細胞浸潤をみとめ、術後 14 日後において歯根表面に対する歯肉の付着を認めた。以降術後 21 日に至ってもセメント質の再生は認められることはなく、一部で長い上皮性付着と考えられる歯肉上皮細胞の歯根面に沿った増殖が認められた。コラーゲンハニカムおよび歯肉由来線維芽細胞の移植実験では、術後 7 日で移植を伴わない場合に比べ強度の炎症性細胞浸潤を認め、歯肉固有層での歯肉組織の再構築が起こっていたが、セメント質の再生は認められなかった。術後 14 日時点で、被験部位の歯根象牙質表面に明らかな一層の線維芽細胞様細胞の集積と染色を

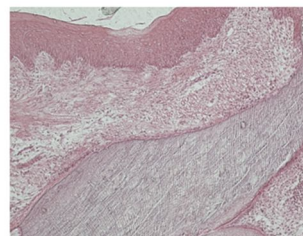
認め、セメント質の再生を伺う所見と考えられた。術後21日で歯肉内部は炎症の消退と組織のリモデリングが継続していた。また、エナメル質表面に対する歯肉上皮の付着に関して、細胞移植の有無にかかわらず、組織切片の比較によって明らかな差は認められなかった。これらの所見より、歯肉由来線維芽細胞の担体を伴った移植がセメント質の再生を促す効果があることが示唆された。この結果より、歯髄細胞や歯根膜細胞など細胞の採取にあたり

侵襲が大きく、また細胞培養に困難性のある細胞群を用いなくとも、比較的採取が容易な歯肉由来線維芽細胞を用いた細胞移植治療による歯周組織再生治療の可能性が示唆された。

歯肉線維芽細胞の有無による治療状態の比較（術後14日）



担体のみ



担体および歯肉由来線維芽細胞

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	鳥海 拓  (Toriumi Taku)  (40610308)	愛知学院大学・歯学部・講師    (33902)	
研究分担者	本田 雅規  (Honda Masaki)  (70361623)	愛知学院大学・歯学部・教授    (33902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関