

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791448
 研究課題名（和文） 培養エナメル芽細胞を用いたエナメル質の再生と臨床応用
 研究課題名（英文） Regeneration of Enamel using Cultured Ameloblast
 研究代表者
 篠原 義憲（SHINOHARA YOSHINORI）
 九州大学・大学病院・医員
 研究者番号：00423533

研究成果の概要（和文）：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。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エナメル質の部分再生と歯科補綴物への応用を目的として実験を行った。

研究成果の概要（英文）：The fundamental treatment for a tooth defect is to regenerate those teeth that have been lost as a result of the defect. However, in order to apply this tooth organ regeneration to medical treatment, issues such as tooth eruption, control of size and morphology, regeneration period, are left as pitfalls. Thus, this is not regarded as a foolproof treatment. Therefore, at present prosthesis treatments such as bridge, partial denture and dental implant are commonly performed. On the other hand, trauma or congenital/acquired tooth defect is restored by artificial materials, such as metal, ceramic and resin. However, it is true that these artificial materials have various issues in terms of biocompatibility, esthetics, functionality, compared to natural teeth. This study delineates how regenerative therapy is applied to clinical application. As a first step, we examined tooth regeneration which applied tissue engineering technique, especially enamel regeneration and tooth prosthesis material. Recently, enamel regeneration, which utilizes culture tooth bud cell, has been reported. However, it is found that not only does enamel regeneration take a long period to complete tissue regeneration but also turn regenerated tissue premature and small. In addition, it has been reported that the extracellular matrix including collagen type 1 and fibronectin promoted the growth and differentiation of cultured dental epithelial cell. This research examines how cultured odontogenic cell stratification will affect the ability of cell growth and differentiation and tissue regeneration. Then, it intends to prove cell culture and tissue regeneration method quantitatively and qualitatively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯科用材料・歯科理工学

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。高齢者の多くは何ら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、特にエナメル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、成体智歯歯胚から上皮系幹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、エナメル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1 mm以上の厚いエナメル質を再生させるために、in vitroにおいて再現した微少環境を連続的に起こす。つまり表皮、眼の角膜、心筋組織の再生で報告されているような温度応答性培養皿にて細胞をシート状の組織として培養回収し、各シート組織間をエナメル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、エナメル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、人為的に厚いエナメル質を再生させ、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) 臨床応用可能なエナメル芽細胞の分離・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)は成体中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。しかしエナメル質は歯の萌出後にはその形成細胞であるエナメル芽細胞を欠くため、組織再生修復能のない組織である。そこで、成人においてエナメル芽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上皮組織から上皮幹細胞のみを単離し培養増幅した。これまでに歯胚上皮幹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フィーダー細胞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問題が残されている。そこで、単離した上皮幹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法によるエナメル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エナメル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エナメル上皮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。

培養したエナメル上皮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、ポリグリコール酸から作られた組織再生用吸収性メンブレン (GC社製) に10枚に播種した。さらに上皮間葉相互作用させ、分化誘導を促進するためにエナメル上皮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

上記にて作製したエナメル上皮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ヵ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) 臨床応用可能なエナメル芽細胞の分離・増殖技術の開発と評価

単離したエナメル上皮幹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、エナメル芽細胞特異的遺伝子の発現を確認した結果、この培養細胞はエナメル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 (図1) およびエナメル芽細胞特異的遺伝子であるアメロジェニン発現 (図2) が増強された。

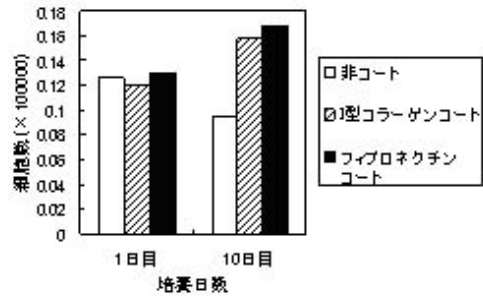


図1 培養エナメル上皮細胞の細胞増殖

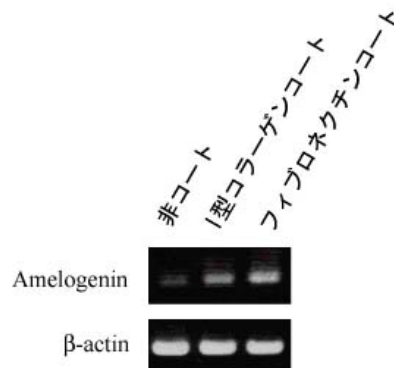


図2 培養エナメル上皮細胞のアメロジェニン発現解析

(2) in vitro における細胞の組織化技術の開発

培養1週間後におけるエナメル上皮細胞層および象牙芽細胞層を積層したブロックのHE染色による組織像を示す (図3)。細胞層間に介在させた組織吸収性メンブレンが観察された。

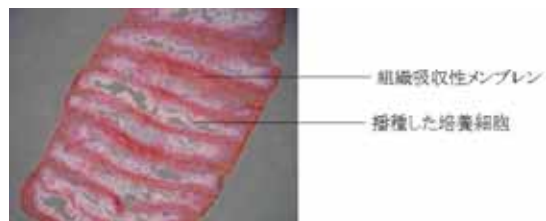


図3 エナメル上皮細胞層および象牙芽細胞層を積層したブロックの組織像

(3) in vivo における再生組織の評価

エナメル上皮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ヵ月後に再生組織を取り出した組織像を示す (図4)。エナメル上皮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比較して再生したエナメル質

および象牙質の厚みに違いは認められなかった。

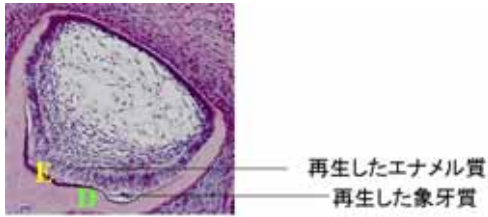


図4 培養細胞ブロックの移植1ヵ月後の組織評価

これらの結果より、ブタ智歯歯胚細胞より採取したエナメル上皮細胞は1型コラーゲンおよびフィブロンectinといった細胞外マトリックスをコートした培養皿で培養することにより増殖能およびエナメル芽細胞の遺伝子的特徴を増強することができた。

またこの培養エナメル上皮細胞および象牙芽細胞を組織吸収性メンブレンに播種し、各メンブレンを積層することで上皮間葉相互作用を起こすような細胞ブロックを作製することに成功した。しかしながら、これらのブロックをヌードラットに移植し、再生した組織はエナメル質、象牙質および歯髄から構成される歯牙様構造を有するものの、各細胞層を単層で積層したものの比較して、再生されたエナメル質の厚さや大きさに違いは認められなかった。

今後さらに様々な細胞間に介在させるメンブレンや培養に用いる接着性蛋白質を用いて細胞増殖能・遺伝子発現解析、in vivoにおける移植条件の検証を行う必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計 件)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 義憲 (SHINOHARA YOSHIHINORI)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：00423533

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：