

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791393

研究課題名 (和文) 歯胚培養技術を応用した新たな歯髄処置法の開発

研究課題名 (英文) Development of new dental pulp therapy using tooth bud organ culture technique.

研究代表者

中 貴弘 (TAKAHIRO NAKA)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：70433539

研究成果の概要 (和文)：

①歯胚と唾液腺は、口腔上皮由来という共通の発生由来を有する器官としてだけではなく、上皮間葉相互作用により形態形成が行われ、生体においても口腔領域の環境構築という上では密接な関連性を有している組織である。歯の発生において重要な関与を示すと言われている Homeobox 遺伝子の一つである Barx 遺伝子群が唾液腺の発生にどのように関与するかを検索する目的で実験を行った。その結果、複雑な形態を有する唾液腺組織の形態形成機構に Homeobox 遺伝子が重要な役割を果たすことが示されただけでなく、唾液腺組織の形態形成機構の解明に対して重要な知見となるものと考えられる。このような基礎的な知見の積み重ねにより、唾液腺組織、ひいては口腔諸組織の再生医療が実現可能になるものと考えられる。したがって、今回の研究成果は非常に意義のあるものである。

②炭酸ガスレーザーは、10.6  $\mu\text{m}$  の波長を示すハードレーザーで、その出力によって組織や細胞を活性化する LLLT 作用と、組織を蒸散させる HLLT 作用を有する。近年、歯周治療やインプラントを用いた療法において LLLT 作用を応用し、歯槽骨の再生を行う試みがなされている。しかしながら、細胞レベルでのエビデンスが少ないまま治療が先行してしまっている感は否めない。我々は炭酸ガスレーザー照射をメカニカルフォースと捉え、その照射により脛骨の骨髄側に骨形成を誘導すること、それには骨細胞の存在が重要であること、そして形成された骨はやがて吸収されてしまうことを報告してきたが、これをインプラント治療に応用できないかと考えるに至った。その結果、炭酸ガスレーザー照射により脛骨骨髄側に誘導された骨は、早期にオッセオインテグレーションを獲得するという結果を得た。したがって、今回の研究成果は非常に意義のあるものである。現在、成果を国際誌に投稿中であり、新たなインプラント埋入法の開発が期待される。

研究成果の概要 (英文)：

①The development of mouse submandibular gland (SMG) begins at embryonic day 11.5-12 (E11.5-12), during which successive rounds of epithelial clefting and branching create complex epithelial tree-like structures. Homeobox genes regulate place-dependent morphogenesis, including epithelial-mesenchymal interactions, and control the expression patterns of signaling molecules. The Barx2 containing Homeobox exerts several key roles in development. The results of this study indicate that Barx2 is associated with early stage epithelial tissue development, and can be a useful epithelial marker of the SMG during early developmental stages.

②Carbon dioxide laser (CO<sub>2</sub> laser) is common laser used in daily dental clinic. But the application of the CO<sub>2</sub> laser is restricted to the treatment of the soft tissue. This study evaluated the application of laser-induced bone therapy (LIBT) using CO<sub>2</sub> laser to reduce implant healing time in rat tibia. Forty-two 10-week-old female Sprague-Dawley (SD) rats were used in this study. The animals were randomly divided into control (Group A) and experimental groups (Group B). The rats in both groups received laser irradiation or bur injury on either side of the tibia. Five days after invasion, titanium implants were inserted in proximal tibia of the experimental group rats. Five, 10, and 20 days after implant placement, the animals were sacrificed and tibiae were collected. After taking soft X-ray images and performing a torque test, the tibiae were decalcified and 8- $\mu$ m-thick sections were prepared. Specimens were stained with hematoxylin and eosin. Soft-X ray images, removal torque values, and histomorphometric analysis data demonstrated a significantly accelerated bone formation in the laser-implant group earlier in the healing process. Until 10 days, this phenomenon was continuously observed. Twenty days after implant placement, comparable results were obtained in both the laser-implant and bur-implant groups. In conclusion, the use of laser irradiation prior to implantation was effective in promoting bone formation and acquiring osseointegration of titanium implants inserted in rat tibia. LIBT may be suitable for use in oral implant therapy.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学・歯内療法学

キーワード：歯髓組織・組織培養・再生療法

#### 1. 研究開始当初の背景

歯髓組織の保存は、歯科保存学の究極の目的である。しかしながら、日常臨床においては安易な抜髄処置が行われることが多い。今回の研究では、このような抜髄処置を受けた歯に対し、歯髓組織由来の幹細胞を利用し、歯胚の培養技術を応用することにより、歯髓組織を再生させることができれば、国民のQOL向上に間違いなく貢献できると考えられる。

#### 2. 研究の目的

この幹細胞を利用し、歯髓組織から象牙質までを再生する、象牙質歯髓複合体を中心とした歯の再生を目標とする。象牙質歯髓複合体の再生を中心に考え、歯科保存学的処置に新たな流れを開拓するための基礎的データの収集を行う。最終的には、人工歯髓組織を生体より再生させることを目指す。

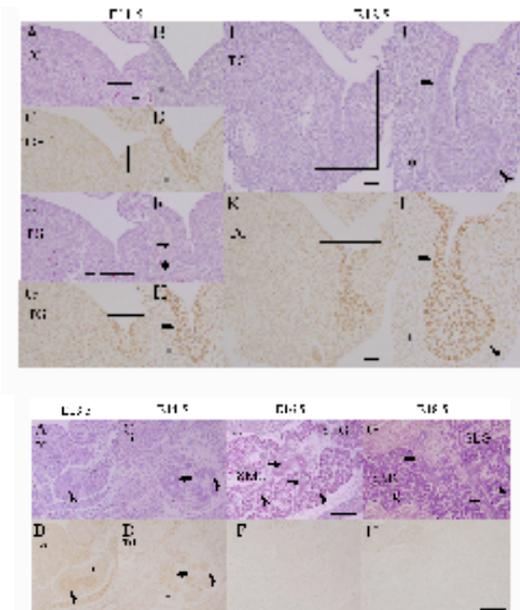
### 3. 研究の方法

初年度は、器官培養・ビーズを用いた発育誘導実験・切片の作製（切片はヘマトキシリンエオジン染色（HE 染色）、各種免疫組織化学的染色ならびに *in situ* Hybridization 法を用いた解析に供する。）により解析を実施する。2 年目は、遺伝子発現の解析・遺伝子産物の発現の解析ならびに動物個体への遺伝子の導入によりさらなる基礎的知見の収集を実施する。

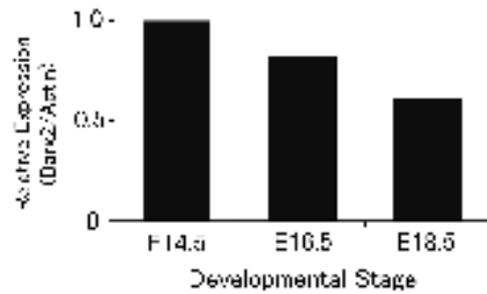
### 4. 研究成果

#### (1) 初年度の成果

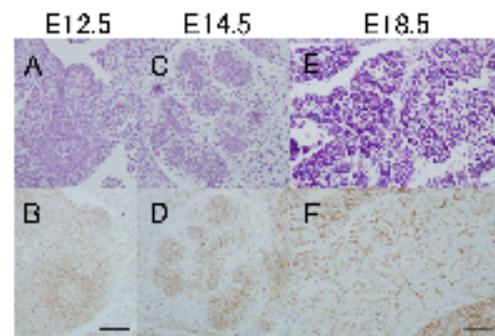
歯胚と唾液腺は、口腔上皮由来という共通の発生由来を有する器官としてだけではなく、上皮間葉相互作用により形態形成が行われ、生体においても口腔領域の環境構築という上では密接な関連性を有している組織である。今年度は、口腔領域に属する器官の発生に対する基礎的な知見を得ることを目的として研究を計画した。その中でも、唾液腺（顎下腺および舌下腺）の発生に着目し、歯の発生において重要な関与を示すとされている Homeobox 遺伝子の一つである Barx 遺伝子群が唾液腺の発生にどのように関与するかを検索する目的で実験を行った。具体的には、形態学的な検索法として免疫組織化学的手法を、生化学的手法として real-time PCR を応用し、Barx2 遺伝子がマウス胎仔顎下腺および舌下腺の発生へどのように関与



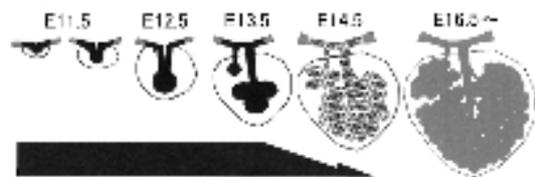
しているのかを検討した。その結果、Barx2 は唾液腺発生の初期（胎生 11.5~14.5 日）における、上皮組織を構成する細胞の核内における、上皮組織を構成する細胞の核内のみ発現することが示され、Barx2 は細胞接



着因子の一つである NCAM-L1 の発現を、上皮組織の側で調節している可能性が示唆された。このことは、複雑な形態を有する唾液

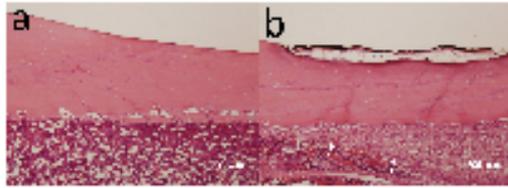


腺組織の形態形成機構に Homeobox 遺伝子が重要な役割を果たすことが示されただけでなく、唾液腺組織の形態形成機構の解明に対して重要な知見となるものと考えられる。このような基礎的な知見の積み重ねにより、唾液腺組織、ひいては口腔諸組織の再生医療が実現可能になるものと考えられる。したがって、今回の研究成果は非常に意義のあるものである。



## (2) 2年目の成果

炭酸ガスレーザーは、 $10.6\mu\text{m}$ の波長を示すハードレーザーで、その出力によって組織や細胞を活性化する LLLT 作用と、組織を蒸散させる HLLT 作用を有する。近年、歯周治療やインプラントを用いた療法において LLLT 作用を応用し、歯槽骨の再生を行う試みがなされている。しかしながら、細胞レベルでのエビデンスが少ないまま治療が先行してしまっている感は否めない。我々は炭酸ガスレーザー照射をメカニカルフォースと捉え、その照射により脛骨の骨髄側に骨形成を誘導すること、それには骨細胞の存在が重要



であること、そして形成された骨はやがて吸収されてしまうことを報告してきたが、これをインプラント治療に応用できないかと考えるに至った。そこで、10 週齢のメス SD ラットを用い、A 群は右脛骨にレーザー照射を行った後、インプラント埋入を行い、左脛骨にはレーザー照射のみを行った。B 群は右脛骨に疑似手術を行い、左脛骨にはインプラントの埋入を行った。埋入後、7 日～21 日で試料の回収し、固定後に軟エックス線撮影を行った後、脱灰しパラフィン切片を作製、ヘマトキシリンエオジン（以下 H-E）染色を行い観察した。その結果、炭酸ガスレーザー照射により脛骨骨髄側に誘導された骨は、早期にオッセオインテグレーションを獲得するという結果を得た。このような基礎的な知見を積み重ねることにより、物理的刺激を応用した新たなインプラント埋入法の確立が可能になると考えられる。したがって、今回の研究成果は非常に意義のあるものである。現在、成果を国際誌に投稿中である。

## 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 1 件)

- ① Takahiro Naka and Satoshi Yokose, Immunohistochemical localization of Barx2 in the developing fetal mouse submandibular glands. *Acta Histochemica et Cytochemica* 査読あり, 42, 2009, pp47-53.

[学会発表] (計 2 件)

- ①インプラント治療におけるレーザー誘導骨形成法の確立にむけて、第 39 回日本口腔インプラント学会、平成 21 年 9 月 27 日、大阪
- ②マウス胎仔顎下腺における Barx2 の発現と局在、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 25 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中 貴弘 (TAKAHIRO NAKA)  
奥羽大学・歯学部・助教  
研究者番号：70433539