

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18538

研究課題名(和文) ナノハイドロキシアパタイト含有レジンを用いた新規接着性直接覆髄材の創製

研究課題名(英文) Development of a novel direct dental pulp-capping material using 4-META/MMA-TBB resin with nano hydroxyapatite

研究代表者

吉田 晋一郎 (Yoshida, Shinichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30778866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：優れた歯質接着性を示す4-META/MMA-TBBレジン(SB)に、硬組織誘導能を有するnano hydroxyapatite(naHAp)を含有させて(naHAp/SB)新規直接覆髄材としての有用性について検討した。naHApを30%含有する30%naHAp/SBは、SBと同様に優れた歯質接着性および生体親和性を示し、CaSR-MEK/ERK経路を介してヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様細胞分化を促進した。またラット露髄部においては、細管構造を有した修復象牙質形成による露髄面の封鎖を示した。以上の結果より、30%naHAp/SBは新規直接覆髄材として有用であ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

これまでに歯質接着性を有した直接覆髄材は存在せず、辺縁漏洩による術後感染のリスクが存在する。本研究で開発した新規直接覆髄材は歯質接着性を有しており、辺縁漏洩のリスクを抑え長期的な予後を見込むことができる。また、材料の諸性質の解析に加えて、修復象牙質形成の主役となる歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化に及ぼす影響ならびにその細胞内シグナル経路の解明を行った。さらに、動物実験モデルでは良好な修復象牙質形成効果を認めており、今後臨床応用へと繋げていくことができると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study was to evaluate the dentin-adhesive 4-META/MMA-TBB resin including osteo-conductive nano hydroxyapatite as a novel direct pulp capping material. The 30% naHAp/SB showed a good sealing ability and biocompatibility as SB does, and also induced odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells through a CaSR-MEK/ERK pathway. In addition, 30% naHAp/SB sealed the pulp exposure site by inducing reparative dentin with dentin tubules in a rat artificial pulp exposure model. These results indicate that 30% naHAp/SB can be used as a novel direct pulp capping material.

研究分野：保存修復

キーワード：4-META/MMA-TBB resin Nano hydroxyapatite dental pulp stem cells reparative dentin direct pulp capping

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在日本では、超高齢社会の進行が大きな社会問題となっており、歯の保存の重要性が広く世の中に提唱されてきている。近年の報告では、残存歯数が少ないほど高齢者の認知症やアルツハイマー病の発症率が高いことが明らかにされている(Paganini-Hill A et al., J Am Geriatr Soc, 2012, Takeuchi K et al., J Am Geriatr Soc, 2017)。また、抜髄となった歯牙は健康歯髄を伴った歯牙と比較して歯の寿命が短くなることが報告されている (Yoshino K et al., Clin Oral Investig, 2015)。ゆえに、偶発的に露出した歯髄の抜髄を避け保存を図ることは、歯牙を長期維持していくうえで重要な課題である。現状では、直接覆髄材を露髄面に作用させることで修復象牙質形成を促し、露髄面を封鎖させる直接覆髄法が実施されている。既存の直接覆髄材には歯質接着性がないため、辺縁漏洩による術後感染が生じ抜髄に至るケースも少なくない。現在最もよく使用されている MTA セメントは良好な予後が期待できるという報告がある一方で、形成される修復象牙質が不均一で細菌の侵入経路となりうる欠落した領域が存在する(Al-Hezaimi K et al., J Endod, 2011)ことが報告されている。また、練和時の混水比のわずかな違いが不十分な水和物形成を招き術後経過に影響を及ぼしうる(小林千尋著：MTA の臨床, 医歯薬出版株式会社, 2013)ことに加えて、材料そのものは歯質接着性を有していない。ゆえに良好な歯質接着性を有し、緻密な修復象牙質形成を促進することができる新規直接覆髄材の開発が望まれている。

2. 研究の目的

良好な歯質接着性と生体親和性を有する 4-META/MMA-TBB resin (Super-bond: SB)に、優れた硬組織誘導能と生体親和性を有する nano hydroxyapatite (naHAp)を含有 (naHAp/SB)させた新規直接覆髄材を作製し、材料の諸性質の解析に加えて歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化および直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

naHAp を 0, 10, 30, 50%含有する naHAp/SB を作製し、走査型電子顕微鏡で表面構造の解析を行う。また、牛歯とアクリル棒を用いて引張試験を行う。細胞親和性に関しては、ディスク上にヒト歯髄幹細胞(Yoshida et al., J Dent Res, 2016)を播種して走査型電子顕微鏡にて細胞形態の観察を行い、WST-1 proliferation assayにより細胞増殖について検討する。また、ヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化に及ぼす影響について qPCR, western blotting, Alizarin Red S 染色および von Kossa 染色法を用いて検討する。細胞内シグナル経路の探索については、Calcium assay kit を用いて naHAp/SB から Ca^{2+} リリースの有無を検討する。また、qRT-PCR, western blotting を用いて inhibitor assay により確認する。直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響については、ラット露髄モデルを用いて組織学的に評価する。

4. 研究成果

走査型電子顕微鏡解析の結果、naHAp/SB ディスク表面には naHAp 粒子の存在が観察され、これは EDX 解析でカルシウムをマッピングすることにより naHAp として確認した。いずれの naHAp においても歯髄幹細胞がディスク上に接着している像が観察された。一方で、引張試験の結果、10%および 30% naHAp/SB は SB と同等の歯質接着性を示したが、50% naHAp/SB の引張強さは SB と比較して有意に減少した。WST-1 proliferation assay の結果、10%および 30% naHAp/SB は SB と同等の細胞増殖能を示したが、50% naHAp/SB ディスク上に播種した歯髄幹細胞の細胞増殖能は優位に減少した。

次に、naHAp/SB がヒト歯髄幹細胞の石灰化に及ぼす影響について検討するために、それぞれのディスク上でヒト歯髄幹細胞を培養し、Alizarin Red-S 染色および von Kossa 染色を行った結果、naHAp の濃度依存的に陽性領域の上昇が認められた。更に、qRT-PCR および Western blotting の結果、30% naHAp/SB ディスク上で培養したヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞マーカー(DSPP, DMP1)の遺伝子・タンパク発現が他の試験群と比較して有意に上昇した。ゆえに、30% naHAp/SB をヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進することができる至適濃度として決定し、以下の実験を行った。

次に、30% naHAp/SB がヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進する細胞内シグナル経路の探索を行った。naHAp に存在するカルシウムが関与している可能性が強く考えられたため、naHAp/SB を -MEM 中に浸漬し、Ca イオンリリースの有無を検討した。その結果、naHAp/SB はヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進するに足る Ca イオンはリリースしないことが明らかとなった。ゆえに、naHAp/SB ディスク上に存在する naHAp 粒子のカルシウムに歯髄幹細胞が直接接触することによってシグナル伝達が行われるのではないかと仮説を立てた。その結果、カルシウム感知受容体(CaSR; Mizumachi et al., Bone, 2017)を介してヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化が促進されることが明らかとなり、これは CaSR の阻害剤である NPS2143 を用いた inhibitor assay によっても確認した。さらに、western blotting を用いてその下流のシグナル因子を検討

した結果、30% naHAp/SB はヒト歯髄幹細胞における MEK/ERK 経路のリン酸化を促進していることが明らかとなった。そこで、NPS2143 が MEK/ERK 経路のリン酸化に及ぼす影響について検討した結果、NPS2143 は MEK/ERK のリン酸化を阻害したことから、30% naHAp/SB は CaSR-MEK/ERK 経路というシグナルカスケードを介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進することが明らかとなった。

最終的に 30% naHAp/SB を新規直接覆髄材としてラット露髄面に応用し、直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響について検討した。その結果、30% naHAp/SB は直接覆髄 4 週後の露髄面直下歯髄組織において、象牙細管構造を伴う修復象牙質形成を促進し露髄面の封鎖が認められた。

以上の結果より、30% naHAp/SB は新規直接覆髄材として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida S, Sugii H, Itoyama T, Kadowaki M, Hasegawa D, Tomokiyo A, Hamano S, Ipposhi K, Yamashita K, Maeda H.	4. 巻 130
2. 論文標題 Development of a novel direct dental pulp-capping material using 4-META/MMA-TBB resin with nano hydroxyapatite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications	6. 最初と最後の頁 112426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2021.112426	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Masataka Kadowaki, Tomohiro Itoyama, Daigaku Hasegawa, Atsushi Tomokiyo, Sayuri Hamano, Keita Ipposhi, Kozue Yamashita, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 4-META/MMA-TBB resin including Nano-hydroxyapatite as a direct pulp capping material.
3. 学会等名 The 99th General Session & Exhibition of the IADR.（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田晋一郎、杉井英樹、糸山知宏、門脇正敬、一法師啓太、山下梢、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、前田英史。
2. 発表標題 Nano Hydroxyapatite 含有 4-META/MMA-TBB レジンは、Calcium-sensing receptor-MEK/ERK 経路を介してヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進する。
3. 学会等名 第 154 回日本歯科保存学会春季学術大会。
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------