

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18622

研究課題名(和文) 軟組織シーリングインプラントアバットメントによる歯周組織再生

研究課題名(英文) Periodontal Tissue Regeneration with Soft Tissue Sealing Implant Abutments

研究代表者

柳 絢子(佐藤絢子)(YANAGI, AYAKO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・医員

研究者番号：70803998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯科インプラントは、天然歯と比べると接着能や防御能が歯周組織よりも弱く、細菌が侵入しやすいと考えられている。インプラントを周囲からの感染から守るに歯肉の防御力を高める必要がある。本研究では、細胞シート培養法を応用した歯肉由来上皮細胞細胞シートおよび口唇由来線維芽細胞シートを用いてインプラント周囲の歯周組織組織の再生を試みた。また、インプラント周囲の調和のとれた組織を獲得するためにDFAT細胞を用いた骨再生誘導を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞シートを応用した歯肉由来上皮細胞細胞および口唇由来線維芽細胞による軟組織再生とDFAT細胞を用いた骨再生により軟組織および硬組織を含めた歯周組織の再生を検討した。これらの再生によりインプラント周囲の生体を模倣した周囲組織の再生の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Dental implants are considered more susceptible to infection than natural teeth because their adhesive and protective capacities are weaker than those of periodontal tissues. Gingival defenses need to be enhanced to protect implants from infection from the surrounding area. In this study, we attempted to regenerate peri-implant periodontal tissue tissues using gingiva-derived epithelial cell sheets and lip-derived fibroblast cell sheets based on the cell sheet culture method. In addition, bone regeneration induction using DFAT cells was performed to obtain harmonious peri-implant tissues.

研究分野：補綴

キーワード：インプラント 細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喪失した歯を回復させる補綴治療として歯科インプラント治療が確立されてきた。インプラントの基本構造であるインプラント体は人工歯根として歯槽骨内に埋入され、歯槽骨と osseointegration にて強固に結合する。アバットメントは上部構造とインプラント体を連結する役割があり、アバットメント - インプラント連結部およびアバットメント - 上部構造連結部は歯肉の内部に位置している。

天然歯の歯肉溝底部では接合上皮が存在し、接合上皮とエナメル質は内側基板を介してヘミデスマゾーム結合により接合上皮性付着が得られている。エナメル - セメント境下では、セメント質が存在し、セメント質と歯肉結合組織はセメント歯肉線維を介して結合組織性付着が得られる。これらの軟組織のシーリングによって細菌の侵入を防いでいる。一方、インプラント周囲組織は天然歯のような結合組織や上皮の付着はあるものの、エナメル質およびセメント質がないため、それに付着するヘミデスマゾーム結合やコラーゲン線維はない。そのため接着力は弱く、感染への防御機能も弱いと考えられている。そこで生体の構造をより再現し、接合上皮性および結合組織性付着を得るためにインプラントの基本構造であるアバットメントに歯肉のシーリング (muointegration) を付与することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は軟組織細胞シートを利用し、アバットメントへ muointegration を付与し、インプラント周囲の細菌感染の防御機構を整えることである。上皮性付着に加え、結合組織付着を得ることでより強固な結合を獲得し、インプラントを周囲の歯周組織と調和のとれたオルガノイド構造として機能させる。また歯肉の薄さや角化歯肉の不足はバリア機能が弱くなる要因ともされ、インプラント周囲の環境を整えるために口蓋歯肉より歯肉を採取・移植する、遊離歯肉移植術や結合組織移植術を行うことも少なくない。接合上皮および結合組織の付着を可能とすることで組織の移植が不要となる可能性も大いに考えられる。そうなればインプラント周囲のバリア機能を高めるだけでなく、患者に与える侵襲を軽減が可能となり QOL の向上も期待できる。

3. 研究の方法

in vitro 研究

1) 歯肉由来上皮細胞および口唇由来線維芽細胞を用いた細胞シートの作製

細胞シートの作製するために温度応答性細胞培養器材等の使用する培養ディッシュの検討を行う。また、再現性のある細胞シートを獲得するために歯肉由来上皮細胞の播種密度や培養ディッシュへのコーティング方法の検討などを行う。さらに、細胞シートの回収が可能となる培養条件および培養時期、回収方法について検証を行う。作製した細胞シートの組織標本を作製して細胞シートの組織学評価を行う。

2) 上皮細胞シートおよび線維芽細胞シートの積層

作製した歯肉由来上皮細胞シートと口唇由来線維芽細胞シートを積層し軟組織複合シートの作製を検討する。積層方法を確立させるため、温度応答性細胞培養ディッシュの冷却時間や積層時の細胞シート同士の接着に必要な時間を検証する。

3) チタンディスクの作製および細胞シートのインテグレーションの獲得

チタンプレートを作製し、上記で作製した細胞シートとチタンプレートのインテグレーションの検討を行う。

in vivo 研究

1) 軟組織シートアバットメントの生体内における機能の評価

ラットの口腔内にて抜歯を行い、インプラント体を埋入する。免荷期間後に2次手術を行い、インプラント体に作製したアバットメントを装着し、縫合を行う。アバットメントと周囲組織との再生、修復の効果を明らかとするために経日的にサンプリングを行い、以下の項目を評価する。

マイクロCTによる埋入部の治癒状態の評価を行う。

組織標本を作製してアバットメント周囲の組織学的な検索を行う。

周囲組織とのシーリングを評価する。

対照群として従来のアバットメントのみを装着したものを使用する。また、インプラント体周囲組織の足場を強化するために骨再生の研究も行う。

2) DFAT 細胞を用いたラット頭蓋骨欠損への骨再生誘導

ラット頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を作製後、骨欠損に2次元培養および3次元培養を行った DFAT 細胞を補填し、骨形成能の効果を明らかとする。経日的にサンプリングを行い、以下の項目を明らかにする。

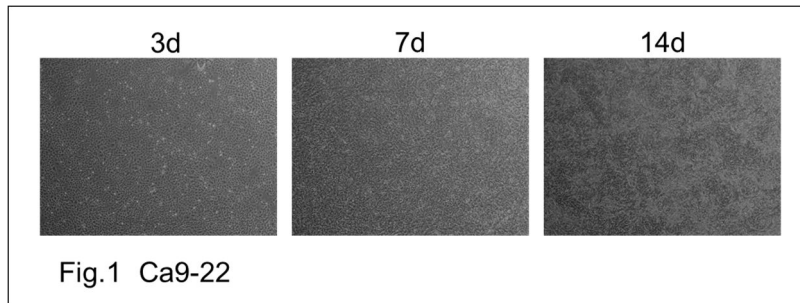
マイクロCTによる埋入部の骨硬化状態の評価を行う。

組織標本を作製して組織学的な検索を行う。

4. 研究成果

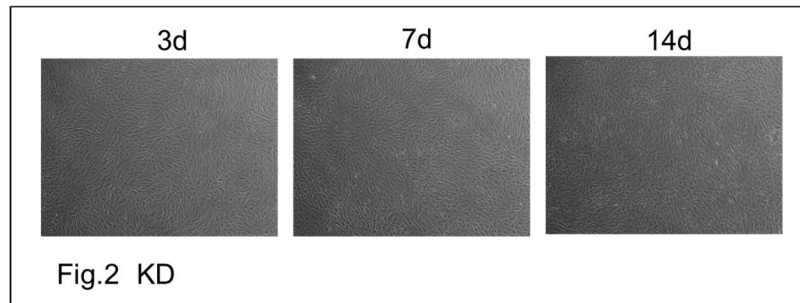
1) 歯肉由来上皮細胞を用いた細胞シートの作製

温度応答性細胞培養皿に歯肉由来上皮細胞 (Ca9-22) を播種し、細胞シートを作製した。細胞シートを作製するために適切な細胞数、培養日数、コーティング処理の検討を行った。検討の結果、細胞を播種する前の前処理は無処理、ゼラチン処理に変化はなく、前処理無しで行うこととした。(Fig.1)



2) 口唇由来線維芽細胞を用いた細胞シートの作製

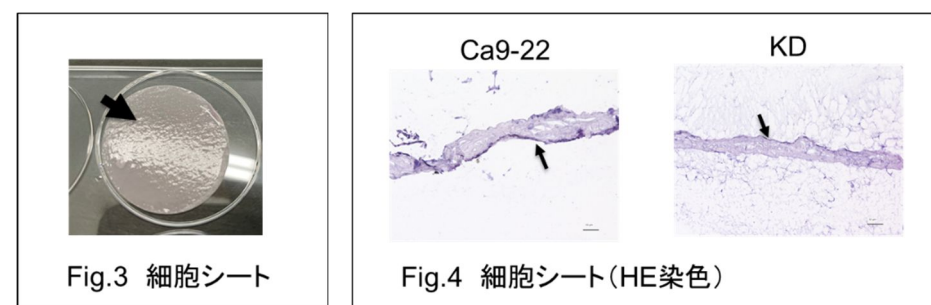
温度応答性細胞培養皿に口唇由来線維芽細胞 (KD) を播種し、細胞シートを作製した。細胞シートを作製するために適切な細胞数、培養日数、コーティング処理の検討を行った。歯肉由来上皮細胞シートと同様に前処理は処理、ゼラチン処理に変化はなく、前処理無しで作製可能であることがわかった。(Fig.2)



3) 細胞シートの回収

経日的に観察を行い、温度応答性細胞培養皿 37°C から 20°C に冷却し、細胞シート回収用支持体を用いて各種細胞シートを回収した (Fig.3)

細胞シートの回収時間は細胞シートとディッシュの接着具合を観察しながら行う必要があることがわかった。それぞれ組織標本を作製し、HE 染色および免疫組織染色を行い、組織的分析を行った (Fig.4)

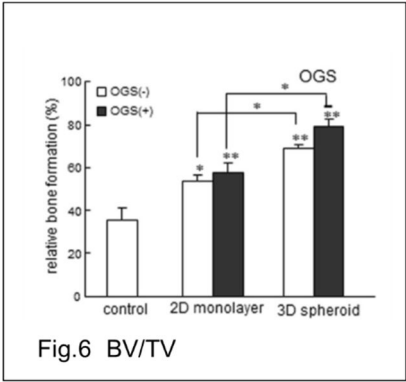
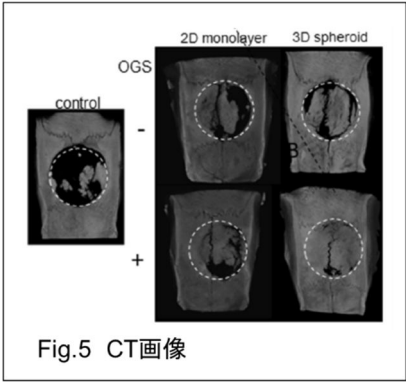


3) チタンプレートへの muointegraion の獲得

直径 20mm×1.5mm のチタンディスクを作製した。チタンディスク上に各種の細胞シートを播種し、インテグレーションの獲得を検討した。

4) DFAT 細胞を用いたラット頭蓋骨欠損への骨再生誘導

ラット頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を作製し、骨欠損に 2 次元培養および 3 次元培養を行った DFAT 細胞を補填して骨形成能の評価を行った。3 次元培養をした DFAT 細胞を埋入した群では 2 次元培養と比較し有意に骨形成が認められた。また、骨分化誘導を行った 3 次元培養 DFAT 群においても骨分化誘導を行った 2 次元培養 DFAT 群と比較して有意に骨形成が認められ、インプラント周囲の環境を整えることが可能と考えられた (Fig.5,6)



(Fig.5,6 : Regenerative Therapy 18, 2021 より改変)

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 1件）

1. 著者名 Yanagi Tsukasa, Kajiya Hiroshi, Fujisaki Seiichi, Maeshiba Munehisa, Yanagi-S Ayako, Yamamoto-M Nana, Kakura Kae, Kido Hirofumi, Ohno Jun	4. 巻 18
2. 論文標題 Three-dimensional spheroids of dedifferentiated fat cells enhance bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 472 ~ 479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.10.004	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
---------------------------	-----------------------	----

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