

平成 23 年 5 月 18 日現在

機関番号：37114  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791858  
 研究課題名 (和文) 各種サイトカインの段階的・連続的徐放による象牙質-歯髄複合体再生療法の検討  
 研究課題名 (英文) Establishment of Dentin-Pulp Complex Regeneration with  
 研究代表者 諸富 孝彦 (MOROTOMI TAKAHIKO)  
 福岡歯科大学・歯学部・講師  
 研究者番号：10347677

研究成果の概要 (和文)：歯髄は進行した齲蝕や歯の破折により強い刺激を受けることがあり、それらの刺激が重篤であれば歯髄除去療法を受けることとなる。歯髄を除去された歯は感染や破折の危険性が著しく高まるため、本研究では重篤な炎症に陥った歯髄における歯髄組織や象牙質の再生療法を確立することを目的として研究を行った。その結果、象牙質及び歯髄の再生療法における成長因子 (FGF-2 および BMP-2) や、ヒアルロン酸の有用性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Dental pulp is sometimes insulted by various stimuli such as caries progression and fracture. These stimulus often induce irreversible damages of the dental pulp, and the pulp is removed by dentist. Teeth without vital pulp lost defensive abilities. Therefore, pulp regeneration therapy is important to overcome the limitations of conventional therapy. In the present study, we aimed the establishment of the dental pulp regeneration therapy. Our results showed the utilities of growth factors such as FGF-2 and BMP-2, and hyaluronic acid for regeneration of dental pulp and dentin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：再生療法, 象牙質-歯髄複合体, FGF-2, BMP, ヒアルロン酸, 熱刺激, 断髄, 虚血

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄は歯の知覚・栄養・免疫及び修復など歯の保存に重要な役割を果たす組織であるが、周囲を硬組織に囲まれた特殊な環境下であり、応諾性の低い組織である。そのため不可逆性の歯髄炎に陥りやすく、その際には抜髄処置が必要となる。

抜髄後の歯は再感染や破折への抵抗性の

低下が顕著であり、抜歯へといたる危険性が高まる。そのため、歯髄の保存・再生療法の確立が望まれる。

## 2. 研究の目的

前述の通り、歯髄の保存・再生療法の確立は歯を保存する上での重要な因子となり、国民の QOL の向上への貢献が期待される。その

ため、これまでに我々が報告してきた FGF-2 とドラッグ・デリバリーシステム (DDS) を応用した象牙質-歯髄複合体再生療法を臨床応用するための知見を得ることが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 象牙質-歯髄複合体再生療法に適した FGF-2 濃度の検討

各種濃度の FGF-2 を含浸させたゼラチンハイドロゲルを作製し、ラット上顎第 1 臼歯の断髄部にコラーゲンスポンジと共に埋入し、効果を確認した。

#### (2) 象牙質-歯髄複合体再生療法のスキャホールドとしてのヒアルロン酸スポンジの可能性について

我々の樹立したラット下顎切歯由来象牙芽細胞様細胞株 KN-3 細胞をヒアルロン酸スポンジとコラーゲンスポンジ上に播種し、細胞接着状態を走査型電子顕微鏡にて確認した。さらにラット上顎第 1 臼歯の断髄部にそれぞれのスポンジを埋入し、1, 3 週間後に炎症細胞数を計測した。

#### (3) BMP-2 の象牙質-歯髄複合体再生療法への応用について

BMP-2 を培地に添加して KN-3 細胞を培養し、DSP および DMP-1 の発現量の変化をウェスタンブロットティング法により確認した。

#### (4) 断髄時の発熱及び虚血状態の影響について

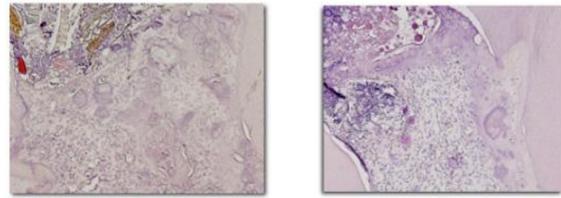
KN-3 細胞を通常の培養条件に加え浸潤麻酔時の虚血状態を想定した低栄養条件下で培養し、その後 43°C の熱刺激を加えた。その後の細胞増殖能を MTS Assay で、炎症マーカーおよび分泌タンパクの遺伝子発現を RT-PCR 法で、さらに石灰化能についてはアルカリフォスファターゼ活性の変化と von Kossa 染色により確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 象牙質-歯髄複合体再生療法に適した FGF-2 濃度の検討

我々は以前、FGF-2 を徐放するゼラチンハイドロゲルとコラーゲンスポンジを応用することで、断髄部に象牙質-歯髄複合体を再生させる可能性について報告した (Kikuchi et al., J Endod, 2007)。しかしながら、このとき再生された象牙質の形状は粒状であり、断髄部の至る所に存在した。そのため、歯髄再生後に咬合面側のみに象牙質が形成される、本来の構造と同様な象牙質-歯髄複合体の再生を誘導する FGF-2 濃度について検討した。その結果、0.5 µg/ml の濃度において、適正な象牙質-歯髄複合体の再生が誘導され

ることが示唆された (図 1)。



【図 1】各 FGF-2 濃度における象牙質-歯髄複合体の再生 左 : 5 µg/ml 右 : 0.5 µg/ml

#### (2) 象牙質-歯髄複合体再生療法のスキャホールドとしてのヒアルロン酸スポンジの可能性について

これまでの研究ではスキャホールドとしてコラーゲンスポンジを用いていたが、さらに有用なスキャホールド用材料としてのヒアルロン酸スポンジの可能性について確認した。in vitro の研究より、ヒアルロン酸スポンジには十分な細胞保持能力を有する上、細胞分化を抑制し、細胞増殖を促すことが示唆された。さらに in vivo の研究においては炎症細胞の出現が有意に低下しており、コラーゲンスポンジと比較しさらなる有用性が示唆された。

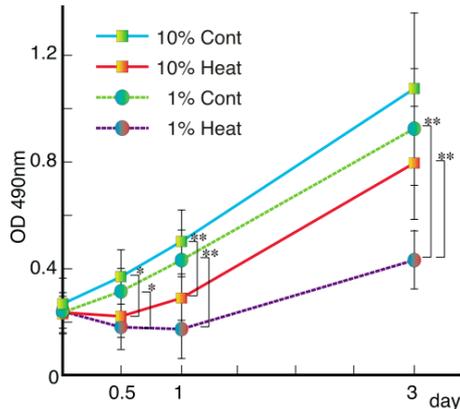
#### (3) BMP-2 の象牙質-歯髄複合体再生療法への応用について

BMPs は硬組織形成細胞の分化に必要とされる成長因子であるが、BMP-2 は既に臨床応用されている。そのため BMP-2 の象牙質-歯髄複合体再生療法への応用を目指し、in vitro における研究を行った。その結果、KN-3 細胞を BMP-2 添加培地で培養すると、象牙芽細胞分化マーカーである DSP や DMP-1 の発現量が増加することが確認された。よって、BMP-2 による象牙質-歯髄複合体再生療法への適用の有用性が示唆された。

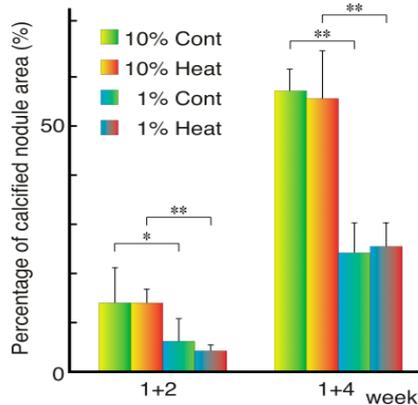
#### (4) 断髄時の発熱及び虚血状態の影響について

我々が確立を目指す象牙質-歯髄複合体再生療法においては、冠部の感染歯髄組織を断髄後、根部の健全歯髄組織より歯髄細胞や脈管系を誘導する。そのため、断髄時の発熱により根部歯髄が壊死すると、本術式は成功しない。断髄処置には浸潤麻酔が不可欠であるが、この際には歯髄は虚血状態となる。そこで、この虚血状態を想定した低栄養条件下における熱刺激の歯髄細胞への影響について確認した。その結果、熱刺激により一部の歯髄細胞には apoptosis が誘導され、低栄養条件下では熱刺激の影響が増強された。しかしながら、熱刺激後にも生存した細胞は増殖能 (図 2) や象牙質基質産生能、石灰化能 (図 3) といった象牙芽細胞様の特徴を有し続けて

いた。



【図2】熱刺激後の細胞数の変化



【図3】石灰化結節産生量の変化

以上の結果により、断髄後の象牙質-歯髄複合体再生療法確立のための多くの知見を得ることができた。

#### 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7件)

- 1) 吉田真理, 北村知昭, 藤本陽子, 諸富孝彦, 永吉雅人, 波多野圭紀, 柿木保明, 寺下正道: 歯科治療へのアロマセラピー応用が患者不安の改善に与える効果. アロマセラピー学雑誌. 9: 47-54, 2009.
- 2) Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen K-K, Terashita M: Formation of Dentinal Bridge on Surface of Regenerated Dental Pulp in Dentin Defects by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2 from Gelatin Hydrogels. J Endod, 35: 858-865, 2009.
- 3) Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, Matsuo K, Chen KK, Terashita M: Effects of

hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 92: 120-128, 2010.

4) 阿南 壽, 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 榮田太郎, 茂山千英子, 國本俊雄, 福田泰子, 西村彰弘, 久原裕子: 歯髄創傷治療に及ぼすエムドゲイン®ゲルの影響. 福岡歯大誌. 36: 119-127, 2010.

5) 阿南 壽, 松本典祥, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 榮田太郎, 茂山千英子, 國本俊雄, 福田泰子, 西村彰弘, 久原裕子: ラット根尖病巣に及ぼすオフロキサシン眼軟膏の影響. 日歯内療誌. 32: 28-37, 2011.

6) 中村真理, 柿木保明, 北村知昭, 吉岡 泉, 椎葉俊司, 土生 学, 富永和宏, 寺下正道, 榊原葉子, 上森尚子, 唐木淳一, 松崎友祐, 諸富孝彦, 永吉雅人, 木尾哲朗, 尾崎由衛, 福田仁一: 口腔周囲筋の緊張緩和とリラクゼーションにおけるアロマセラピートリートメントの有効性について. アロマセラピー学雑誌. 11: 17-24, 2011.

7) Morotomi T, Kitamura C, Toyono T, Okinaga T, Washio A, Saito N, Nishihara T, Terashita M, and Anan H: Effects of Heat Stress and Starvation on Clonal Odontoblast-like Cells. J Endod. In press, Accepted in 2011.

[学会発表] (計17件)

- 1) Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T, Terashita M: Effect of Heat Stress on Rat Clonal Odontoblast-like Cells. 87th General Session and exhibition of International Association for Dental Research, Miami, Florida, USA (April 1-4), 2009.
- 2) 諸富孝彦, 北村知昭, 豊野 孝, 豊島邦昭, 西原達次, 寺下正道: 熱刺激に対する象牙芽細胞様細胞の耐性と炎症応答. 第69回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 九州歯科学会抄録集: 27, 2009.
- 3) 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道: 熱刺激後の象牙芽細胞様細胞における炎症反応と石灰化能の維持. 第130回日本歯科保存学会2009年度春季学術大会, 札幌(6月), 2009.
- 4) 鷲尾絢子, 北村知昭, 諸富孝彦, 寺下正道, 西原達次: 象牙芽細胞様細胞におよぼす

各種サイトカインの影響. 第 51 回歯科基礎医学学会学術大会, 新潟(9月), 2009.

5) 平田志津, 福島秀文, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎, 寺下正道: 転写因子 NF- $\kappa$ B は BMP による骨芽細胞分化を抑制する. 第 7 回日本再生歯科医学学会学術大会, 北九州(9月), 2009.

6) 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道: 象牙芽細胞様細胞株の有する熱耐性および熱馴化能. 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会, 仙台(10月), 2009.

7) 鷺尾絢子, 北村知昭, 諸富孝彦, 寺下正道: 各種サイトカインが象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響. 第 131 回日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会, 仙台(10月), 2009.

8) Washio A, Kitamura C, Morotomi T, Terashita M, Nishihara T.: Effect of BMP-2 on Odontoblast-like cells. The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, Japan (November 13), 2009.

9) 平田志津, 福島秀文, 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道, 自見英治郎: NF- $\kappa$ B シグナルと BMP シグナルのクロストークの検討. 第 70 回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 2010.

10) 矢野淳也, 西野宇信, 諸富孝彦, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉居慎二, 西藤法子, 北村知昭, 寺下正道: 実習法の違いによる治療術式修得効果への影響 (1) 回転式ニッケルチタン製ファイルによる根管形成. 第 70 回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 2010.

11) 西野宇信, 矢野淳也, 諸富孝彦, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉居慎二, 西藤法子, 北村知昭, 寺下正道: 実習法の違いによる治療術式修得効果への影響 (2) ミラー使用時の窩洞形成. 第 70 回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 2010.

12) 諸富孝彦, 鷺尾絢子, 北村知昭, 寺下正道, 阿南壽: 軽度の熱刺激は象牙芽細胞様細胞の熱耐性を向上させる. 第 132 回日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会, 熊本(6月), 2010.

13) 矢野淳也, 西野宇信, 諸富孝彦, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田志津, 吉井慎二, 西藤法子, 北村知昭, 寺下正道: 実習法の違いが治療術式習得へ及ぼす影響—(1)ニッケルチタンファイルによる根管形成—. 第 132 回日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会, 熊本

(6月), 2010.

14) Hirata S, Fukushima H, Morotomi T, Aoki K, Nagano K, Ohya K, Kitamura C, Terashita M, and Jimi E: Inhibition of NF- $\kappa$ B enhances BMP-induced bone formation. 88th General Session and exhibition of International Association for Dental Research, Barcelona, Spain (June 14-17), 2010.

15) 平田志津, 福島秀文, 片桐岳信, 諸富孝彦, 青木和広, 永野健一, 大谷啓一, 北村知昭, 寺下正道, 自見英治郎: NF- $\kappa$ B シグナルの抑制は BMP による骨形成を促進する. 第 52 回歯科基礎医学学会学術大会, 東京(9月), 2010.

16) 諸富孝彦, 北村知昭, 西藤法子, 鷺尾絢子, 寺下正道, 阿南壽: 低栄養条件下における熱刺激の象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響. 第 133 回日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会, 岐阜(10月), 2010.

17) 諸富孝彦, 泉利雄, 松浦洋志, 柴田太郎, 茂山千英子, 松本典祥, 國本俊雄, 福田泰子, 西村彰弘, 久原裕子, 阿南壽: 歯髓由来細胞株の熱耐性向上を誘導する機構の解析. 第 37 回福岡歯科大学学会総会, 福岡(12月), 2010.

[図書] (計 1 件)

1) 必修 臨床研修歯科医ハンドブック 89-93, 111-113. 平成 22 年 7 月 1 日 第 2 版 第 1 刷発行 (共著)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諸富 孝彦 (MOROTOMI TAKAHIKO)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10347677

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし