

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10179

研究課題名(和文) 幼若永久歯再植後の新規治療法を探索する：NF- $\kappa$ Bデコイ核酸導入の効果研究課題名(英文) Investigation of a new therapy for auto-transplantation of developing teeth with NF- $\kappa$ B decoy ODN

研究代表者

石田 雄之 (ISHIDA, YUJI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00516297

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)：本研究は幼若永久歯の再植時に課題となる術後炎症による再植歯の脱落、歯髄壊死、歯根形成障害に対して、歯周組織の創傷治癒促進に作用することが知られているNF- $\kappa$ Bデコイを適応することで、歯髄生活反応および歯根形成能の維持を可能とする新規治療法の開発を目指し、動物実験モデルを用いて解析した。その結果、薬剤キャリアとしてPLGAを用いたNF- $\kappa$ Bデコイの投与により、再植後の歯根膜および歯髄の初期炎症を効果的に抑制し、破骨細胞集積の抑制、歯根吸収の抑制、歯根形成能の維持、また早期からの組織再生を促すことを明らかにした。一方で、アンキロシス形成に対してはNF- $\kappa$ Bデコイ投与の抑制効果は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

永久歯を喪失する主要な原因として、幼少期に限れば、外傷が歯の喪失の主な要因となる。外傷による脱臼の保存的治療としては、脱臼歯を抜歯窩に速やかに戻し、固定する再植治療が行われるが、感染、歯槽骨吸収、歯根吸収、アンキロシスなど様々な術後の問題点が報告されている。しかし、いまだそれらを防ぐ有効な治療法が確立していない。

本研究結果は、幼若永久歯の脱臼時に再植治療を適応した際に、NF- $\kappa$ Bデコイなどの抗炎症薬を応用することで、再植後の初期炎症を抑えることが、早期からの創傷治癒を促進し、歯根吸収および歯根形成能の維持に寄与することが示唆された。今後本研究を進展させ、新しい治療法を開発していきたい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel treatment method for pulp vital response and maintenance of root formation by adapting NF $\kappa$ B decoys, which are known to promote wound healing in periodontal tissue, to address the issues of tooth dropout, pulp necrosis and impaired root formation due to postoperative inflammation that are challenges when replanting young permanent teeth, and to analyse this in animal experimental model was used to analyse the results. The results showed that administration of NF $\kappa$ B decoys with PLGA as a drug carrier effectively suppressed the initial inflammation of the periodontal ligament and pulp after reimplantation, inhibited osteoclast accumulation, suppressed root resorption, maintained root formation capacity and also promoted tissue regeneration from an early stage. On the other hand, no inhibitory effect of NF $\kappa$ B decoy administration on ankylosis formation was observed.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：矯正歯科学 再植 核酸医薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯を喪失する主要な原因として、う蝕および歯周病が知られているが、幼少期に限れば、外傷が歯の喪失の主な要因となる。外傷による脱臼歯の保存的治療としては、脱臼歯を抜歯窩に速やかに戻し、固定する再植治療が行われるが、感染、歯槽骨吸収、歯根吸収、アンキロシスなど様々な術後の問題点が報告されている。しかし、いまだそれらを防ぐ有効な治療法が確立していない。また、歯根完成した永久歯の場合、脱臼した際に歯髓の血管系・神経系が断裂することにより歯髓壊死を起こすため、根管治療が必要となる一方、歯根未完成の幼若永久歯である場合、根尖が開いていることから再植後に生活反応が維持される可能性があることが報告されているが、その治癒メカニズムについて不明な点が多い。

永久歯が口腔内に萌出する際、歯根は根長の約半分が形成されているのみで、萌出後に歯根形成が継続されるため、再植後の根管処置により歯根の形成が止まるため、歯根が短縮するほか、アンキロシスした場合は周囲歯槽骨の垂直的成長を抑制するため、しばしば不正咬合を誘発する。そのため、成長期の治療を預かる小児・矯正歯科分野において、脱臼した幼若永久歯における歯根形成能の維持及びアンキロシスの抑制する再植治療法の確立は喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

上記背景のもと、過度な炎症を抑制し、歯周組織の創傷治癒促進に作用することが報告されている NF $\kappa$ B デコイ核酸に着目し、再植により断裂した歯周組織や歯髓組織の過度な炎症を抑えることで、歯髓・歯周組織の治癒プロセスを促進できるのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、再植後の過度の炎症を抑制し、歯周組織の治癒促進に効果が期待される NF $\kappa$ B デコイに、当研究グループで改良した生体吸収性を持ち、高い標的特異性と安定した薬剤徐放性を有するポリ酪酸ガラクトース共重合体 (PLGA) ナノ粒子を薬剤キャリアとして組み合わせることで、根形成中の永久歯の再植治療における歯髓生活反応及び歯根形成能の維持を可能とする新規治療法の開発につながると考えた。

本研究の具体的な目的は、

歯の再植時に適切な核酸医薬キャリアとなる PLGA ナノ粒子の性状及び修飾因子の調査  
前歯再植モデルを用いた、歯髓・歯周組織の創傷治癒における炎症と歯髓組織石灰化およびアンキロシス発生機構の解明

PLGA ナノ粒子に封入した NF $\kappa$ B デコイなどの核酸医薬による新たな再植治療法の探索とした。

### 3. 研究の方法

I. 前歯再植モデルの作製および適切な核酸医薬キャリア (PLGA ナノ粒子) の探索を行う。本研究では、歯根未完成歯を再植した際の歯髓・歯周組織の治癒メカニズムを解明するため、安定したラット前歯の完全脱臼・再植手技を確立する。再植術の成否については、マイクロ CT を撮影し検証する。本研究では、我々がこれまで研究で使用してきた PLGA ナノ粒子を用いる。PLGA ナノ粒子は対象組織・導入環境および封入する薬剤によって粒子の性状・粒子径・粘性・修飾因子を調整する必要があるため、歯髓歯周組織への導入が効率的に行われるプロトコルを開発する。

II. 歯の再植モデルにおける NF $\kappa$ B デコイ含有 PLGA ナノ粒子導入効果の調査を行う。具体的には、ラット前歯の移植モデルに対し、炎症反応、治癒プロセス、歯髓生活反応、歯髓組織の石灰化、歯根形成能、およびアンキロシス形成を評価するため、マイクロ CT、免疫組織学的観察およびリアルタイム RT-PCR を用いて検証する。その際、歯髓および歯周組織で異なる反応が予想されるため、歯髓組織および歯根膜についてそれぞれを独立して生化学的検証を行う。

III. 歯の再植後の治癒過程における、歯髓・歯周組織の遺伝子発現解析調査を行う。具体的には、再植時に NF $\kappa$ B デコイ核酸導入した群において、歯髓生活反応および歯根形成能の維持、歯髓組織石灰化の抑制されたメカニズムを探索するため、マイクロアレイ法を用いて、歯髓・歯周組織における遺伝子発現解析調査を行い、歯髓生活反応および歯根形成能維持に寄与する候補因子を同定する。また、候補因子について *in vitro* 系を用いて、マイクロアレイ法により寄与因子を特定する。具体的には、先行研究に準じ歯髓幹細胞培養を行い、炎症刺激を加えた際にどの候補因子が細胞保護に働くか、各因子の si-RNA を作製し発現を制御することで特定を試みる。

IV. 核酸医薬を用いた歯の再植術の新たな治療法の開発を目指す。具体的には、特定した因子の siRNA を PLGA ナノ粒子に封入し、ドナー歯根に塗布することで再植後の歯根膜・歯髓への siRNA の浸透が可能か検討し、PLGA の最適条件を探索する。また、条件を振ってラット幼若大臼歯再植に開発薬剤を適応し解析を行い、歯の再植後の歯髓・歯周組織治癒を促進させる最適条件を探索することで、新規治療法開発を目指す。

### 4. 研究成果

ラット前歯の再植モデルを用いて、前歯脱臼後、生理食塩水、NF- $\kappa$ B デコイ単体溶液、スクランブルデコイ溶液、PLGA-NF $\kappa$ B デコイ溶液にそれぞれ浸漬後、再植するモデルを確立し、再植後

7, 14, 28 日後に屠殺し、マイクロ CT 撮影を行った。マイクロ CT 解析から、すべての実験グループにおいて、再植後の歯根の厚みが減少したことが観察された。PLGA-NFKB デコイ投与群では、他の実験群と比較し、移植後 7, 14, 28 日後において有意に歯根の厚みが大きく、歯根膜の厚みが小さく、歯根体積が大きかった。また、その他の群では、再植後 28 日目において、歯髓腔にいくつかの石灰化物が出現したが、PLGA-NFKB デコイ投与群では認められなかった。(図 1)

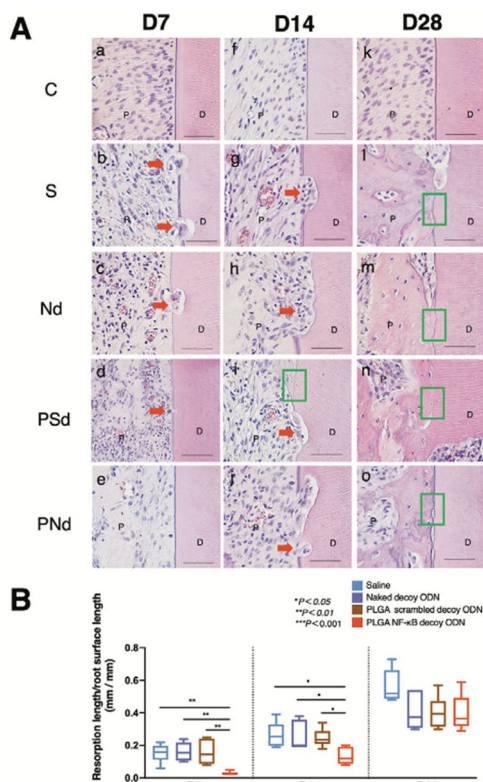


図 2 再植後の歯根膜組織像・解析結果

TRAP 染色からは、再植後 7, 14 日目において、PLGA-NFKB デコイ投与群では、その他の群と比較し、TRAP 陽性破骨細胞数が有意に減少していることが明らかとなった。(図 3) 7, 14 日目の歯槽骨表面には強い TRAP 陽性細胞が観察されたが、28 日目にはすべての実験群で染色性が弱まっており、すべての実験群で有意な差は認められなかった。

歯根膜領域の免疫組織化学分析からは、PLGA-NFKB デコイ投与群において、その他の実験群と比較し、炎症性サイトカインである IL-1 および IL-6 は、有意に減少していることが認められ、再植後の初期炎症から効果的に抑制していたことがうかがえた。一方で、PLGA-NFKB デコイ投与群では、その他の実験群と比較し、組織の再生に関連する TGF-1 および FGF-2 は再植直後より、有意に増加することが認められた。以上のことから、再植後の初期炎症を PLGA-NFKB デコイは効果的に制御し、また早期から組織の再生を促すことが示唆された。

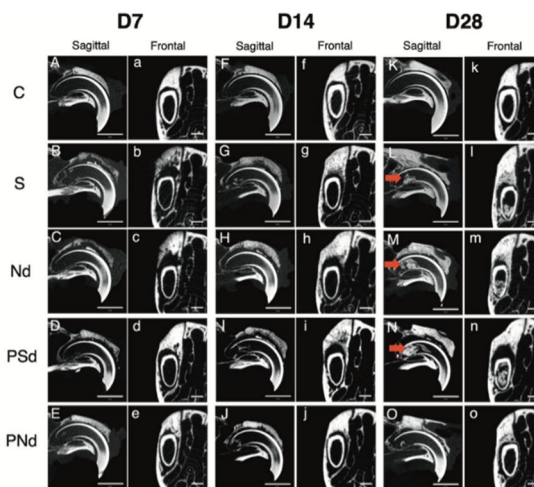


図 1 再植後のマイクロ CT 画像

歯根膜の組織学的解析から、再植後 7 日目にて、PLGA-NFKB デコイ投与群では、顕著な歯根吸収を認めなかったが、その他の群では、血管の拡大、歯根膜への炎症性細胞浸潤、破骨細胞用細胞、歯根吸収が観察された。(図 2) 再植後 14 日目では、すべての実験群で、歯根膜に申請骨用の組織が認められ、スクランブルデコイ群ではアンキロシスが認められた。再植後、7, 14 日目の歯根長当たりの歯根吸収長さの分析では、PLGA-NFKB デコイ投与群は他の実験群と比較し、有意に歯根吸収が減少していることが明らかとなった。

また、再植後 28 日目には、すべての実験群で歯根膜内に顕著に新生骨生成が認められ、広くアンキロシスしていることが観察された。

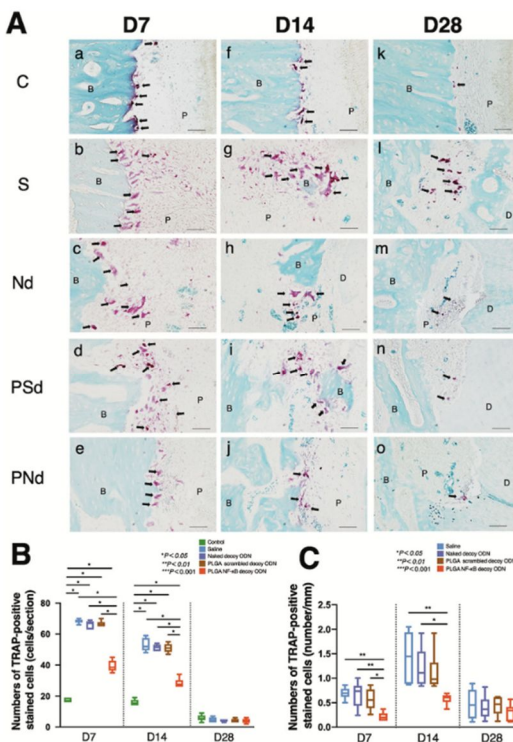


図 3 再植後の TRAP 染色像・解析結果

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Li Kai, Ishida Yuji, Hatano Sato Kasumi, Ongprakobkul Narubhorn, Hosomichi Jun, Usumi Fujita Risa, Kaneko Sawa, Yamaguchi Hiroyuki, Ono Takashi	4. 巻 93
2. 論文標題 Nuclear factor kappa B decoy oligodeoxynucleotide loaded poly lactic co glycolic acid nanospheres promote periodontal tissue healing after tooth replantation in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 458 ~ 470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0134	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 該当する

〔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
研究分担者	細道 純 (Hosomichi Jun) (00420258)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  (12602)	
研究分担者	川島 伸之 (Kawashima Nobuyuki) (60272605)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  (12602)	
研究分担者	水谷 幸嗣 (Mizutani Koji) (60451910)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師  (12602)	

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