

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16971

研究課題名（和文）バイオ3Dプリント技術と歯根膜幹細胞株の融合による次世代型口腔インプラントの創出

研究課題名（英文）Creation of Biohybrid oral Implant by fusion of bio-3D printing technology and periodontal ligament stem cell line

研究代表者

小野 太雅（Ono, Taiga）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90884734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、歯根膜とインプラント体との複合体である「バイオハイブリッドインプラント（BioHI）」の開発に関する研究を進めている。申請者は既に、歯根膜幹細胞株を用いて、歯根膜同様のチューブ型構造体の作製に成功している。そこで本研究では、様々な材料から作製したインプラント体と歯根膜幹細胞チューブ構造体の複合体（1-17TB-IMP）を作製し、それらについて分子生物学的解析を行うことで、1-17TB-IMPのBioHIとしての機能について検証を行った。1-17TB-IMPをラット脛骨に埋入したところ、4週間後にインプラント周囲に歯根膜様の線維組織が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のインプラント治療に用いられるインプラント体は、骨への直接的な結合であるオッセオインテグレーションにて支持を得ている。しかし、歯根膜を持たないインプラント体は、歯根膜由来のバリア機構や固有感覚が存在しないため、細菌感染を生じやすく、過度な咬合圧が生じやすい。それらは、インプラント周囲炎の原因となり、インプラント周囲炎が生じると周囲の骨が炎症により吸収され、インプラント体だけでなく周囲骨の喪失につながる。歯根膜を有するインプラントであるバイオハイブリッドインプラントの開発は、これまでのインプラント治療の欠点を補うことのできる新しいインプラント治療法の開発のために必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：we are conducting research on the development of a bio-hybrid implant (BioHI), which is a composite of periodontal ligament and implant body. The applicant has already succeeded in producing a tube-shaped structure similar to the periodontal ligament using a periodontal ligament stem cell line. In this study, we prepared a complex (1-17TB-IMP) consisting of an implant body and periodontal stem cell tube structure made from various materials, and examined the function of 1-17TB-IMP as BioHI. we implanted 1-17TB-IMP into Rat tibia. 4 weeks later,

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオハイブリッドインプラント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度のう蝕、外傷、歯周炎等により、抜歯が必要となった場合、欠損部への補綴処置が必要となる。歯科用インプラントは補綴治療の中でも比較的新しい治療方法であり、咀嚼効率、審美性および機能性の高さから、患者の満足度を高めることに成功しており、近年高く評価されている。歯科用インプラントの本体であるインプラントボディは主にチタンなどの生体不活性材料で構成されており、歯槽骨と機械的に直接結合するオッセオインテグレーションによって支持を得ている。一方で、天然歯は本来歯根膜を介して歯槽骨と結合しており、恒常性維持、固有感覚、感染防御等、多くの機能を有する。従来の歯科用インプラントはオッセオインテグレーションを促進するために様々な形状や表面加工技術が開発されてきた。しかしながら、歯槽骨と直接結合する歯科用インプラントは歯根膜を持たないため、バリア機構が存在せず細菌感染が生じやすい。また、歯根膜に由来する感覚が無いため、咀嚼刺激による咬合圧の調整が困難である。そのため、機能的な歯根膜を有するバイオハイブリッドインプラント (BioHI) の開発が望まれている。これまでに、培養歯根膜細胞シートを応用し、インプラント体表面に歯根膜様組織を形成する試みなどが行われてきたが、本来多層な細胞から構成される歯根膜の組織形態を再現するには至っていない。また多くの研究が、生体不活性材料で構成されたインプラント体表面への歯根膜形成を試みているが、生体不活性材料はオッセオインテグレーションに有効である一方、それらの歯根膜細胞に対する為害性や、増殖および分化に及ぼす影響などは不明な点が多い。対して生体活性材料は優れた物理特性、骨伝導性および組織応答を示し、細胞接着、増殖および分化を誘導することが知られている。一方で、生体活性材料をインプラント体を使用した場合にどのような機能を果たすかには不明な点が多く、また生体活性材料が BioHI に適した材料であるかも明らかとなっていない。

2. 研究の目的

歯根膜幹細胞を、バイオ 3D プリンタにて三次元積層して作製したチューブ型構造体と様々な生体活性材料を用いたインプラント体との複合体をラット脛骨内に移植し、バイオハイブリッドインプラントとして機能するかについて検証する。

3. 研究の方法

(1) 1-17TB-IMP の作製 :

生体活性材料であるハイドロキシアパタイト (HAP) 焼成体、HAP 含有 4-META/MMA-TBB レジン (HAP/SB) および生体不活性材料であるチタンを、それぞれ円柱状に整形したものをインプラント体として使用した。また、歯根膜幹細胞を積層したチューブ型構造体の作成について、申請者が使用している Regenova® は、生細胞から作製した細胞塊をソフトウェア上で指定した三次元的配列に沿って配置する 3D プリンタであり、高い自由度を持って細胞を三次元積層することが可能である。そこで、インプラント体の形状に沿った複合体 (1-17TB-IMP) を作製することで、移植後の生体内における適合性について検証した。

(2) 1-17TB-IMP の機能解析および組織学的解析 :

(1) にて作製した、インプラント体の材質が異なる 3 種の 1-17TB-IMP を、Wistar ラットの脛骨内に窩洞を形成し埋入した。4 週経過後、ラットを屠殺し灌流固定を行ったのち、1-17TB-IMP 含む脛骨を摘出した。摘出した 1-17TB-IMP を含む脛骨を 3D マイクロ CT にて撮影し、移植した 1-17TB-IMP 周囲の硬組織形態を確認した。その後これらを脱灰および包埋し、切片を作製したのち、以下の組織学的解析を行った。

移植後の生着状態 : Hematoxylin Eosin 染色を行い、1-17TB-IMP と脛骨との適合性および細胞分布について評価する。

1-17 細胞株の存在 : ヒト細胞核に特異的に存在する NUMA に対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、ラット組織内の 1-17 細胞株の存在を確認する。

4. 研究成果

(1) 1-17TB-IMP の作製

生体活性材料を使用したインプラント体の作製には、生体活性材料である HAP、HAP/SB と生体不活性材料であるチタンを使用した。HAP 焼成体は直径 1.5 mm、高さ 3 mm で作製した。また HAP/SB のサンプルとして、直径 1.5 mm、高さ 3 mm のチタンを HAP/SB に浸漬し、チタン表面を HAP/SB にてコーティングしたサンプルを作製した。コントロールとして直径 1.5 mm、高さ 3 mm のチタンを作製し使用した。それぞれの材料のサンプルに合わせた 1-17TB を作製し、それぞれのサンプルと 10 日間培養することで、材料に応じた形態の 1-17TB-IMP の作製に成功した。

(2) 1-17TB-IMP の機能解析および組織学的解析

(1) で作製した 1-17TB-IMP を含む脛骨を 3D マイクロ CT 撮影を行った結果、全ての材料におい

てインプラント体と骨の間に一層の低吸収領域を認めた。

1-17TB-IMP と脛骨との移植後の生着状態について評価のため、Hematoxylin Eosin 染色を行った。その結果、全ての材料におけるインプラント体周囲に一層の線維組織の形成を認めた。

さらに、インプラント体周囲の線維組織ラット組織内の 1-17 細胞株の存在を確認するため、NUMA に対する抗体を用いて免疫組織科学染色を行った。その結果、チタンのインプラント体周囲に NUMA 陽性細胞は認められなかったのに対して、HAP 焼成体を使用したインプラント体周囲では、線維組織の一部に NUMA 陽性細胞が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ono Taiga, Tomokiyo Atsushi, Ipposhi Keita, Yamashita Kozue, Alhasan M Anas, Miyazaki Yudai, Kunitomi Yoshihiro, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio, Maeda Hidefumi	4. 巻 236
2. 論文標題 Generation of biohybrid implants using a multipotent human periodontal ligament cell line and bioactive core materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 6742-6753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30336	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 -
1. 著者名 Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Ono Taiga, Nagano Ryoko, Ipposhi Keita, Yamashita Kozue, Alhasan M. Anas, Maeda Hidefumi	4. 巻 110
2. 論文標題 Characterization of a clonal human periodontal ligament stem cell line exposed to methacrylate resin-, bioactive glass-, or silicon-based root canal sealers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-021-00648-7	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 -
1. 著者名 Ipposhi Keita, Tomokiyo Atsushi, Ono Taiga, Yamashita Kozue, Alhasan Muhammad Anas, Hasegawa Daigaku, Hamano Sayuri, Yoshida Shinichiro, Sugii Hideki, Itoyama Tomohiro, Ogawa Marina, Maeda Hidefumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Secreted Frizzled-Related Protein 1 Promotes Odontoblastic Differentiation and Reparative Dentin Formation in Dental Pulp Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2491 ~ 2491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10092491	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 -
1. 著者名 Yamashita Kozue, Tomokiyo Atsushi, Ono Taiga, Ipposhi Keita, Alhasan M. Anas, Tsuchiya Akira, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Itoyama Tomohiro, Maeda Hidefumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Mineral trioxide aggregate immersed in sodium hypochlorite reduce the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22091
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01545-3	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 友清淳、山下梢、小野太雅、一法師啓太、濱野さゆり、長谷川大学、杉井英樹、吉田晋一郎、前田英史
2. 発表標題 WMTA の組成成分に及ぼすフェノール系貼薬剤の影響について.
3. 学会等名 第 24 回日本歯科医学 会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kozue Yamashita, Atsushi Tomokiyo, Taiga Ono, Keita Ipposhi, M. Anas Alhasan, Akira Tsuchiya, Sayuri Hamano, Hideki Sugii, Shinichiro Yoshida, Tomohiro Itoyama, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 The effects of MTA exposed to NaOC l on osteoblastic differentiation of a human periodontal ligament stem cell line
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Anas Alhasan, Atsushi Tomokiyo, Sayuri Hamano, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Tomohiro Itoyama, Taiga Ono, Keita Ipposhi, Kozue Yamashita, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Hyaluronic Acid Could Enhance the Differentiation of Neural Crest like Cells to Periodontal Ligament Stem Cells.
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2件

1. 著者名 友清淳、山下梢、小野太雅、一法師啓太、濱野さゆり、長谷川大学、杉井英樹、吉田晋一郎、前田英史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 クインテッセンス出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 フェノール系貼薬剤は硬化後の White Mineral Trioxide Aggregate の崩壊および色調 変化を誘導する	

1. 著者名 一法師啓太、友清淳、小野太雅、山下梢、長谷川大学、濱野さゆり、杉井英樹、吉田晋一郎、糸山知宏、前田英史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 クインテッセンス出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 sFRP1 は歯髄細胞の象牙芽細胞様分化を誘導し、デンティンブリッジ形成を促進する	

〔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
---------	---------