

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792029

研究課題名(和文) 歯髄再生療法を目指した多血小板血漿による象牙芽細胞分化・象牙質形成誘導の検討

研究課題名(英文) Examinations of Odontoblast Differentiation and Dentin formation by Platelet Rich Plasma aimed for the Regeneration of Dental Pulp.

研究代表者

鷲尾 絢子 (WASHIO, AYAKO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10582786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標は歯髄創傷治癒メカニズムの解明と象牙質・歯髄複合体再生療法の確立にある。最終目標の達成に向け、多血小板血漿(PRP)の抗炎症作用、および象牙芽細胞分化に与える影響、さらに新規開発セメントの各種細胞へ及ぼす影響を検討した。PRPが抗炎症作用を発現する物質の亢進とともに象牙芽細胞への分化誘導能を持つこと、新規開発セメントが生体親和性の高いセメントであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To establish wound healing and local regeneration of dentin-pulp complex, we examined effect of Platelet Rich Plasma (PRP) on anti-inflammatory action and odontoblast differentiation, and effect of newly developed cement on various cells. We found that PRP up-regulates the anti-inflammatory related molecules and induce odontoblast differentiated related molecules, and newly developed cement has the biocompatibility.

研究分野：歯内療法学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：再生医学 象牙質歯髄複合体 PRP バイオガラス ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

国民生活の質の向上に健全な歯の維持が重要であること、健全な歯の維持には歯髄が重要な役割を果たしていることは周知の事実であり、現時点においても多くの歯科医師は小規模な露髄に対する歯髄保存療法を実践している。しかし、広範囲にわたる感染により重篤な傷害を受けた歯髄の保護は困難で、現状では抜髄を行わざるを得ない。また、近年では専用機器と技術を駆使することで高精度な歯内治療が可能となっているが、複雑な歯・根尖歯周組織の解剖学的形態の前では高精度歯内治療にも限界があり、根尖病変の再発や抜歯に至る症例も少なくない。歯髄喪失による歯の機能低下・喪失を阻止し、本来の感覚・機能を有する歯を保存・維持するため、残存歯髄を利用した象牙質・歯髄複合体の創傷治療・再生療法を確立することは、現代歯科医療の限界を克服する上で必須課題であるといえる。

これまでに私は、歯髄に豊富に存在する細胞外基質、特にヒアルロン酸に着目し、神経細胞分化機構の研究に広く利用されているPC12細胞を用い、歯髄再生において必要不可欠な神経組織へのヒアルロン酸の影響を検討した。その結果、ヒアルロン酸が神経細胞分化を抑制することを明らかにした(Exp Cell Res, 2009)。次に私は、歯髄再生において重要な役割を果たす骨形成促進因子(Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2)および線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2)の象牙芽細胞分化への影響について検討した。ラット歯髄由来象牙芽細胞様歯髄細胞株(KN-3細胞)(J Endod, 2007)を用いて分析した結果、BMP-2はKN-3細胞の分化に影響を与えること(論文投稿中)、FGF-2はKN-3細胞の形態変化(細胞突起伸長)に影響を与えることを明らかにした(論文投稿準備中)。

しかし、実際の臨床応用を考えると、これらの成長因子は高価であることから広く使用していくことは難しい。そこで、*in vitro*において再生医学で応用され、入手の容易なPlatelet Rich Plasma (PRP)を応用することにした。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は歯髄創傷治療メカニズムの解明と象牙質・歯髄複合体再生療法の確立にある。最終目標の達成に向け、本研究では、(1)我々が樹立したKN-3細胞を用い、多くの成長因子を含むPRPの抗炎症作用、および象牙芽細胞分化に与える影響を検討し、象牙質形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、追加実験として(2)実践的治療技術を確立することを具体的目的として、PRPを使用する際に必要となる良好な封鎖性や生体親和性などの性質を有する歯科用セメントの評価をおこなった。今回、バイオガラスを配合したセメント NSY-222 とバ

イオガラスではなくフッ素非含有アルミノシリケートガラスが配合されたセメント NSK-12 とを比較し、NSY-222 の物理化学的特性や細胞に及ぼす影響とバイオガラスとの関連性を検討した。

3. 研究の方法

(1) KN-3 細胞における PRP の抗炎症作用への栄養、および象牙芽細胞分化に与える影響

PRP は 3.8%クエン酸ナトリウムを入れたシリンジで肘静脈から 30 ml 採血し、4℃、2000 rpm で 5 分間遠心分離後、血漿のみ新しいチューブに分注し、4℃、2000 rpm で 20 分間再度遠心分離を行い、最下層の分画を PRP として回収し、実験に用いた。

KN-3 細胞に PRP を作用させた時の、細胞形態変化、および細胞増殖能を検討するため、位相差顕微鏡観察、および WST-8 を測定した。

PRP の抗炎症、および炎症作用を調べるため、 5×10^5 /well で播種した KN-3 細胞に 5%PRP で 0、1、3、6、12、24 時間刺激、あるいは 0、0.1、1、2、5、10%の PRP を 6 時間刺激し、抗炎症性サイトカイン IL-1ra、Lactoferrin と炎症性サイトカイン IL-1beta の発現を Real-time PCR を用いて調べた。

KN-3 細胞の象牙芽細胞への分化の影響を調べるため、 5×10^5 /Well で播種した KN-3 細胞を 0、0.1、1、2、5、10% PRP で 1 時間刺激し、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP (Dentin Sialophosphoprotein) および DMP-1 (Dentin Matrix Protein-1) の発現を Real time PCR を用いて調べた。

石灰化能への影響を検討するため、5% PRP を含有した培地で 0、3、7、10、14 日培養後、alkaline phosphatase(ALP)染色を行った。アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。

(2) 良好な封鎖性や生体親和性などの性質を有する歯科用セメントの評価

試験片の作製

NSY-222 および NSK-12 は 2 つのペーストを練和することにより作製した。練和後に定型の鋳型内(内径 3.5 mm、高さ 6 mm)に埋入し、擬似体液(SBF)内に 4 日間および 7 日間浸漬して硬化させ、PBS で洗浄後に試験片として用いた。

NSY-222 の物理学的特性

電界放出型電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いて試験片の表面性状を観察し、粉末エックス線回折装置 (XRD) を用いて結晶構造の解析・同定を行った。また、試験片を精製水中に静置し経時的な pH の変化を測定した。

NSY-222 の細胞に及ぼす影響

培養用ディッシュ中央に試験片を静置後、象牙芽細胞様細胞である KN-3 細胞、歯根膜細胞である HPDL 細胞、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞、あるいは NGF 誘導性神経細胞分化を示す PC12 細胞を播種し、試験片が浸漬されるまで培養液を追加した。播種後 3 日間、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察するとともにトリパンブルー染色による細胞生存率を測定した。また、PC12 細胞の神経細胞への分化は細胞突起伸長の測定により検討した。

4. 研究成果

(1) KN-3 細胞における PRP の抗炎症作用への影響、および象牙芽細胞分化に与える影響

位相差顕微鏡観察による細胞形態変化

PRP の存在下・非存在下で KN-3 細胞を培養したところ、細胞形態に大きな変化はみとめられなかった。

細胞増殖能に及ぼす PRP の影響

細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (WST-8) のホルマザン色素への変換を測定することによる細胞増殖能への影響を検討した。72 時間まではコントロール群と PRP 刺激群であまり差は見られないが、培養 96 時間以上の PRP 刺激群において、細胞増殖能が亢進した。

KN-3 細胞の抗炎症・炎症能に及ぼす PRP の影響

③-1 ; KN-3 細胞に 5%PRP を 0、1、3、6、12、24 時間刺激したところ、抗炎症性サイトカイン IL-1ra、Lactoferrin の遺伝子発現は 12 時間まで時間依存的に増加したが、IL-1beta の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。

-2 ; KN-3 細胞に 0、0.1、1、2、5、10% PRP を 6 時間刺激したところ、IL-1ra の遺伝子発現は濃度依存的に増加した。また、Lactoferrin の遺伝子発現は 5%PRP でピークを示した。しかし、IL-1beta の遺伝子発現に有意な差は認められなかった。

KN-3 細胞の象牙芽細胞分化に及ぼす PRP の影響

-1 ; KN-3 細胞に 5%PRP を 0、1、3、6、12、24 時間刺激したところ、DMP-1、および DSPP の遺伝子発現は刺激 1 時間で増加した。

-2 ; KN-3 細胞に 0、0.1、1、2、5、10% PRP を 1 時間刺激したところ、DMP-1、および DSPP の遺伝子発現は濃度依存的に増加した。

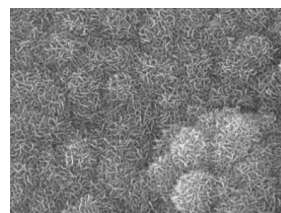
KN-3 細胞の石灰化能に及ぼす PRP の影響

KN-3 細胞に 5%PRP を 0、3、7、10 日培養後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定したところ、10 日培養群において ALP 活性が増加した。また、ALP 染色においても同様の結果が得られた。

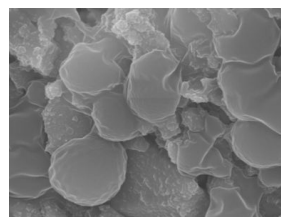
(2) 良好な封鎖性や生体親和性などの性質を有する歯科用セメントの評価

NSY-222 の物理学的特性

-1 ; FE-SEM および XRD の解析結果から、NSY-222 は SBF への浸漬によって、針状の HAP 様結晶の析出が認められた (図 3)。一方の NSK-12 では、同じような針状結晶の析出は認められなかった (図 3)。NSY-222 試験片表面に認められた網状の結晶構造はハイドロキシアパタイト (HAP) と同等のものであることが明らかとなった。



NSY-222



NSK-12

(図 3) セメントの表面構造

-2 ; pH については、NSY-222、NSK-12 とともに、練和直後のペーストを精製水に浸漬すると pH10.1 と高アルカリ性を示すものの、経時的に低下し、pH9.0 で安定した。

NSY-222 の細胞に及ぼす影響

-1 ; 各種細胞におけるセメントの影響を位相差顕微鏡で観察したところ、NSK-12 では多くの細胞死が観察されたが、NSY-222 においては試験片に直接接触する位置まで細胞が増殖しているのが観察され、トリパンブルー染色により高い細胞生存率を示していた。

②-2; NSY-222 は、NGF 非存在下にも関わらず PC12 細胞の神経細胞への分化を誘導した。

以上より、PRP が抗炎症作用を発現する物質の亢進とともに象牙芽細胞への分化誘導能を持つことが示された。また、新しく開発されたバイオガラス配合セメントは、封鎖性が良好で、生体親和性の高いセメントであることが示され、実践的治療技術を確立する上で有効であると示唆される。今後、in vivo モデル（断髄モデル）において、PRP およびバイオガラス配合セメントを用いて、再生誘導能を検討する予定である。

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) 北村知昭、鷺尾絢子 (他 9 名) 教科書にみる歯内治療の科学的根拠と経験、九州歯科学会雑誌、査読有、67(1)、2013、1-4
- (2) 市丸-末松美希、鷺尾絢子、北村知昭 (他 4 名) 生活歯に生じた亀裂・破折に関する調査、日本歯内療法学会雑誌、査読有、34(1)、2013、11-15
- (3) 鷺尾絢子、北村知昭 (他 9 名) 九州歯科大学附属病院保存治療科を受診した初診患者の調査-2003 年度~2010 年度-、九州歯科学会雑誌、査読有、65(5・6)、2012、198-204
- (4) Washio A, Kitamura C (他 3 名) Possible involvement of Smad signaling pathways in induction of odontoblastic properties in KN-3 cells by bone morphogenetic protein-2, a growth factor to induce dentin regeneration. International Journal of Dentistry, 査読有、volume2012、Article ID 258469、2012、6 pages.
- (5) Kitamura C, Washio A (他 3 名) Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. Special issue "Tissue Engineering in Dentistry", International Journal of Dentistry, 査読有、volume 2012, Article ID 190561、2012、8 pages
- (6) 鷺尾絢子、北村知昭 (他 9 名) 歯科用マイクロスコープおよび超音波装置を使用した根管破折器具の除去に関する臨床研究、日本歯科保存学会雑誌 55 (6)、2012、365-372.
- (7) 西野宇信、矢野淳也、永吉雅人、鷺尾絢子、北村知昭 (他 8 名) 実習方法の違いが術式修得に及ぼす影響

の検討 (第 2 報) 窩洞形成時のミラー・スキル修得、日本歯科保存学会雑誌 55(6)、2012、389-397

〔学会発表〕(計 32 件)

- (1) Nakagawa A, Washio A, Hirata-Tsuchiya S, Terashita M, Nishihara T, Kitamura C: Effects of newly developed bioglass cement on cell morphology and viability. The 9th World Endodontic Congress (International Federation of Endodontic Association; IFEA), Tokyo, Japan (May 23-26), 2013
- (2) Saito N, Washio A, Kitamura C, Nishihara T: Inhibitory effect of ameloblastin on epithelial cells. The 9th World Endodontic Congress (International Federation of Endodontic Association; IFEA), Tokyo, Japan (May 23-26), 2013
- (3) Ichimaru-Suematsu M, Nagayoshi M, Washio A, Hirata-Tsuchiya S, Nishino T, Terashita M, Kitamura C: A clinical survey concerning cracks and fractures of vital teeth. The 9th World Endodontic Congress (International Federation of Endodontic Association; IFEA), Tokyo, Japan (May 23-26), 2013
- (4) Washio A, Terashita M, Kitamura C: Mechanism of the differentiation of odontoblast-like cells by FGF-2. The 9th World Endodontic Congress (International Federation of Endodontic Association; IFEA), Tokyo, Japan (May 23-26), 2013
- (5) 鷺尾絢子、松井 誠、北村知昭、田畑泰彦: 歯髄・根尖歯周組織の再生誘導における無機生体材料およびゼラチンハイドロゲルの有効性。第 13 回日本再生医療学会、京都 (3 月 4、5、6 日)、2014
- (6) 廉 晃勲、鷺尾絢子、有吉 涉、北村知昭、西原達次: 象牙芽様細胞の抗炎症能と分化能に与える多血小板血漿の影響。第 73 回九州歯科学会総会、北九州 (5 月 18、19 日)、2013.
- (7) 市丸-末松美希、鷺尾絢子、平田-土屋志津、廉 晃勲、寺下正道、西原達次、北村知昭: ヒト歯根膜幹細胞の分化・増殖における多血小板血漿の影響。第 73 回九州歯科学会総会、北九州 (5 月 18、19 日)、2013.
- (8) 鷺尾絢子、中川愛加、廉 晃勲、西藤法子、吉居慎二、中山皓平、平田-土屋志津、市丸-末丸美希、永吉雅人、西野宇信、寺下正道、椎葉俊司、柿木保明、北村知昭: 日常臨床で遭遇する難治性歯痛における歯原性疼痛と非

- 歯原性疼痛の鑑別法の確立．第73回九州歯科学会総会，北九州（5月18，19日），2013．
- (9) 中川愛加，沖永敏則，鷺尾絢子，北村知昭，寺下正道，西原達次：PC12細胞の神経細胞分化に対する各種セメントの影響．第73回九州歯科学会総会，北九州（5月18，19日），2013．
- (10) 廉 昶勲，鷺尾絢子，北村知昭：多血小板血漿が象牙芽細胞様細胞の抗炎症能と分化能に与える影響．第138回日本歯科保存学会2013年春季学術大会，福岡（6月27，28日），2013．
- (11) 鷺尾絢子，正木千尋，兒玉正明，栗野秀慈，中本哲自，平田-土屋志津，西野宇信，北村知昭，細川隆司，富永和宏，西原達次，岩城重次，谷岡正行：実習用統合模型 iDSim を用いた「シナリオベース実習」の展開．第32回日本歯科医学教育学会総会および学術大会，北海道（7月12-13日），2013．
- (12) 中原孝洋，北村知昭，西野宇信，鷺尾絢子，平田-土屋志津，中本哲自，正木千尋，細川隆司，西原達次，小林建太郎，谷岡正行：臨床推論演習におけるクラウド型クリッカ「Clica（クリカ）」の使用経験．第32回日本歯科医学教育学会総会および学術大会，北海道（7月12-13日），2013．
- (13) 西藤法子，有吉 涉，沖永敏則，鷺尾絢子，北村知昭，西原達次：アメリロプラスチンは口腔上皮細胞の細胞増殖を抑制する．第55回歯科基礎医学会総会，岡山（9月20，21，22日），2013．
- (14) 廉 昶勲，鷺尾絢子，有吉 涉，北村知昭，西原達次：象牙芽細胞様細胞の抗炎症能と分化能に与える多血小板血漿の影響．第55回歯科基礎医学会総会，岡山（9月20，21，22日），2013．
- (15) 西藤法子，鷺尾絢子，寺下正道，北村知昭：上皮細胞の細胞増殖におけるアメリロプラスチンの影響．第139回日本歯科保存学会2013年秋季学術大会，秋田（10月17，18日），2013．
- (16) 日本再生歯科医学会シンポジウム「よみがえる歯髄・歯根膜・根尖歯周組織」シンポジスト2013年2月16日．
- (17) 日本歯科保存学会2013年度春季学術大会（第138回）シンポジウムI「若手研究者が描くPulp Wound Healing & Regeneration」シンポジスト、2013年6月27日，28日．
- (18) Washio A, Nakagawa A, Nishihara T, Kitamura C: Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effects on various cell responses. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, Japan (October 26), 2012.
- (19) 市丸美希，平田志津，鷺尾絢子，永吉雅人，西野宇信，鬼塚千絵，永松浩，寺下正道，北村知昭：生活歯に生じた亀裂・破折に関する調査．第72回九州歯科学会総会，北九州（5月19，20日），2012．
- (20) 182) 永吉雅人，西野宇信，鷺尾絢子，平田志津，市丸美希，吉居慎二，西藤法子，廉 昶勲，中川愛加，北村知昭：歯内治療における術後疼痛の分析（1）根管治療中の術後疼痛の発生頻度と根尖孔穿通が術後疼痛出現に与える影響の解析．第72回九州歯科学会総会，北九州（5月19，20日），2012．
- (21) 西野宇信，永吉雅人，鷺尾絢子，市丸美希，平田志津，吉居慎二，西藤法子，廉 昶勲，中川愛加，北村知昭：ファイバーポスト支台築造システムの光伝達性についての評価．第72回九州歯科学会総会，北九州（5月19，20日），2012．
- (22) 鷺尾絢子，北村知昭，寺下正道，西原達次，廉 昶勲，中川愛加：歯髄・根尖歯周組織欠損部のPRPおよび無機生体材料を用いた次世代再生療法の開発を目指したトランスレーショナルリサーチ．第72回九州歯科学会総会，北九州（5月19，20日），2012．
- (23) 松尾 拓，鷺尾絢子，北村知昭，自見英治郎，西原達次：Beta-thymosinsの歯科臨床応用を目指す基礎的研究．第72回九州歯科学会総会，北九州（5月19，20日），2012．
- (24) 永吉雅人，西野宇信，鷺尾絢子，平田志津，市丸美希，吉居慎二，西藤法子，廉 昶勲，中川愛加，北村知昭：歯内治療における術後疼痛の分析 感染根管治療における術後疼痛の発生頻度に影響を与える因子の解析．第33回日本歯内療法学会学術大会，東京（6月16，17日），2012．
- (25) 鷺尾絢子，寺下正道，北村知昭：新規バイオガラス配合セメントの象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響．第33回日本歯内療法学会学術大会，東京（6月16，17日），2012．
- (26) 鷺尾絢子，寺下正道，北村知昭：FGF-2によるKN-3細胞の象牙芽細胞分化メカニズムの解析．第136回日本歯科保存学会2012年春季学術大会，沖縄（6月28，29日），2012．
- (27) 西藤法子，鷺尾絢子，寺下正道，北村知昭：アメリロプラスチンの上皮細胞増殖に対する影響．第136回日本歯科保存学会2012年春季学術大会，沖縄（6月28，29日），2012．
- (28) 北村知昭，西原達次，細川隆司，中島啓介，富永和宏，永松 浩，中原孝洋，兒玉正明，正木千尋，鷺尾絢子，

岩城重次, 谷岡正行: 次世代型実習用統合模型「iDSim」の開発. 第31回日本歯科医学教育学会総会および学術大会, 岡山 (7月20, 21日), 2012.

- (29) 鷺尾絢子, 寺下正道, 田畑泰彦, 北村知昭: FGF-2による象牙芽細胞分化メカニズムの解析. 第10回日本再生歯科医学会学術大会, 神戸 (9月1, 2日), 2012.
- (30) 市丸美希, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, 西野宇信, 寺下正道, 北村知昭: 生活歯に生じた亀裂・破折に関する調査. 第137回日本歯科保存学会2012年秋季学術大会, 広島 (11月22, 23日), 2012.
- (31) 大塚真衣, 鷺尾絢子, 永吉雅人, 平田-土屋志津, 市丸美希, 西野宇信, 中川愛加, 廉 晃勲, 西藤法子, 吉居慎二, 中山皓平, 寺下正道, 北村知昭: 歯科用マイクロスコープおよび超音波器具を用いた根管内破折器具の除去成功率. 第137回日本歯科保存学会2012年秋季学術大会, 広島 (11月22, 23日), 2012.
- (32) 中川愛加, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, 寺下正道, 北村知昭: 新規バイオガラス配合セメントが骨芽細胞様細胞に及ぼす影響. 第137回日本歯科保存学会2012年秋季学術大会, 広島 (11月22, 23日), 2012.

〔図書〕(計4件)

- (1) 北村知昭, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 歯内治療学専門用語集 (日本歯科保存学会・日本歯内療法学会編). 医歯薬出版株式会社, 2013, 全99ページ
- (2) 北村知昭, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, マイクロエンドをはじめよう 超! 入門テキスト (北村知昭 編著) 医歯薬出版株式会社, 2013 全65ページ
- (3) 鷺尾絢子, 北村知昭 (他3名) 歯に生じた硬組織疾患を見つけ出す - ソプロライフ®とダイアグノデントペン®-. 歯界展望 119(1), 2012, 124-131
- (4) 北村知昭, 矢野淳也, 西野宇信, 永吉雅人, 鷺尾絢子, 必修臨床研修歯科医ハンドブック第3版 (竹原直道, 廣藤卓雄 監修). 医歯薬出版株式会社, 2012, 全362ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kyu-dent.ac.jp>
<http://www2.kyu-dent.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鷺尾 絢子 (WASHIO AYAKO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 10582786

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: