

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861901

研究課題名(和文) 歯根膜細胞を利用した歯周組織再生型インプラント開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for periodontal tissue regeneration type implant using periodontal ligament cells

研究代表者

山本 竜司 (Yamamoto, Ryuji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20410053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では歯根膜再生型インプラントの開発への可能性を検証することを目的として研究を進めてきた。

本研究課題では以下のことを明らかにした。(1)セリア系ジルコニアがチタンと同等の石灰化誘導の適合性を有することを明らかにした。(2)糖尿病モデルラットへのチタンインプラントの移植実験では神経成長因子(NGF)がインプラント周囲への骨誘導に有効であることを明らかにした。(3)ブタ歯髄細胞と象牙芽細胞で象牙質シアロリタンパク質(DSPP)遺伝子の2つのスプライスバリエーションの発現に違いがあることを明らかにした。このことにより、DSPP遺伝子が象牙芽細胞への分化マーカーとして有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was verifying the possibility of the periodontal ligament regeneration around the tooth implant.

In this study I revealed the following. (1) The ceria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals/aluminum oxide nanocomposite (Ce-TZP) has a same ability for bone induction compared to titanium. (2) In transplantation experiments of titanium implants to type 2 diabetes model rat. Nerve growth factor (NGF) was effective for bone induction to surrounding the implant. (3) The different of the two splice variants of porcine dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene were revealed between dental pulp cells and odontoblasts. From this result, it showed that DSPP gene is useful as a differentiation marker of odontoblasts.

研究分野：分子生化学

キーワード：歯周組織再生 歯根膜 象牙質 歯槽骨 セメント質 インプラント 象牙芽細胞 歯髄

1. 研究開始当初の背景

日本が高齢化社会を迎えている現在、高齢者でも丈夫な歯を確保するためにインプラントを用いた治療法が行われている。現在のインプラントの主流はオッセオインテグレーション型、すなわち結合組織を介することなくチタンと骨が直接接合する方式であり、この分野における研究ではインプラント表面と歯槽骨の結合性に着目した課題が重要視されている。研究代表者は、骨とインプラント体の間に歯根膜細胞を共存させることにより、歯根膜組織を構築再生出来るかどうか取り組んできた。オッセオインテグレーション型インプラントは表面をハイドロキシアパタイトコーティングすると骨誘導の効率が上がり、歯槽骨との結合までにかかる期間が短縮でき、さらに生理活性物質と併用することでさらに時間短縮効率を上げられることが判明している。また、ラットの抜去歯を異所移植した場合、移植した歯の根分岐部付近から歯槽骨が形成され、そして新しく形成された歯槽骨と移植歯は骨性癒着せず、両者間に歯根膜様の軟組織が存在する知見も得られている。また、多孔性のハイドロキシアパタイトのディスク上でヒト歯根膜細胞を培養し、それを免疫不全のマウスに移植した研究も行われており、この実験結果でもヒト歯根膜細胞由来の硬組織と硬組織の間にヒト歯根膜細胞由来の軟組織が認められている。さらに、歯胚から分取した細胞の配列を再構築し、歯周組織を含む歯牙組織の再生も成功している。これらの結果より、歯根膜細胞が存在している状態で、なんらかの条件を満たせば歯根膜組織中の幹細胞より石灰化細胞へ分化誘導することは可能であり、さらに石灰化組織の間に軟組織を残せる可能性も示されている。

2. 研究の目的

本研究課題ではチタンインプラント表面上での歯根膜細胞の培養実験や生体への移植実験を通して、歯根膜細胞の性質や分化能を解明し、歯根膜再生型インプラント体開発の可能性の検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)セリア系ジルコニアディスク上での石灰化誘導実験

現在のインプラント素材の主流であるチタン (Ti) と次世代の主流と期待されるセリア系ジルコニア (Ce-TZP) の比較を行った。対照として poly-L-lysine (PLL) コートの培養用ガラスを用いた。各素材にマウス筋芽細胞 (C2C12) 細胞を播種し石灰化誘導実験を行った。石灰化誘導培地で培養後、骨芽細胞の

分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの酵素活性の比較、石灰化物のアリザリンレッド染色など石灰化誘導の強度を評価した。

(2)2 型糖尿病モデルラット脛骨へのチタンインプラント埋入実験

2 型糖尿病モデルラット脛骨に人工的にインプラントのソケット型の骨欠損を作成し、そこにチタンインプラントを埋入した。移植後、実験群では移植部位周囲に神経成長因子 (NGF) を、対照群には生理食塩水を筋肉注射した。サンプリング 1 週前にカルセイン、2 週前にアリザリンレッドを投与し、新生骨をラベリングした。インプラント埋入 4 週後と 8 週後にラット脛骨をサンプリングし、非脱灰切片を作成後、共焦点顕微鏡でカルセイン、アリザリンレッドの蛍光観察、顕微鏡でメチレンブルー/塩基性フクシンの 2 重染色の観察を行った。

(3)象牙質シアロリントタンパク質 (DSPP) のスプライスバリエーションの発現解析

ブタ DSPP は、象牙質シアロタンパク質(DSP)、象牙質糖タンパク質(DGP)、象牙質リントタンパク質(DPP)の 3 つのタンパク質から構成される。DSPP 遺伝子は 5 つのエクソンから構成されるが、ブタおよびヒトにおいては少なくとも 2 つの mRNA バリエーションが存在する。一つは DSPP 全長体をコードし(DSPP mRNA)、もう一つはイントロン 4 に含まれるポリ A シグナルの利用により DSP のみのバリエーションをコードする(DSP-only mRNA) (DGP、DPP はエクソン 5 からコードされる)。ブタ切歯歯胚より歯髓先端部、本体部、象牙芽細胞の total RNA を調製し cDNA を作成した。DSPP 遺伝子の各バリエーションを特異的に増幅するプライマーを設計し、リアルタイム PCR でそれら 2 つの mRNA の発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) セリア系ジルコニアディスク上での石灰化誘導実験

PLL ガラス、Ti、Ce-TZP 各素材とも石灰化誘導前と比較しアルカリフォスファターゼ活性は上昇していた。しかし、石灰化誘導後の各素材間の活性に有意差はみられなかった。しかし、石灰化誘導後の各素材上のカルシウム量を比較したところ、PLL ガラスと比較し Ti、Ce-TZP のカルシウム量が有意に多かった。また、Ti と Ce-TZP 間には有意な差はみられなかった (図 1)。

これらの結果から Ce-TZP は石灰化誘導に関しては Ti と同程度の素材といえる。また、審美的観点を見ると、白色の Ce-TZP は優れたインプラント素材と成り得ることが示唆

された。

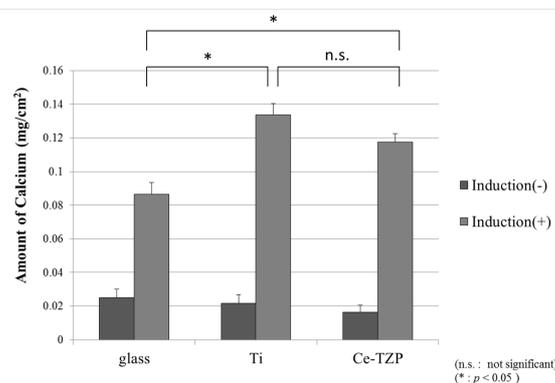


図 1

(2) 2 型糖尿病モデルラット脛骨へのチタンインプラント埋入実験

2 型糖尿病モデルラットへのインプラント埋入は健常ラットと比較し、術後の骨形成が遅く、Bone-to-implant contact (BIC) 値も低い傾向を示した。この 2 型糖尿病モデルラットにインプラント埋入後 FGF を投与したところ、健常ラットと比較して遜色のないレベルまで骨形成が回復した。BIC 値も健常ラットと有意差がないレベルまで回復した。このことから FGF が 2 型糖尿病モデルラットの骨形成能を回復させる効果があることが示された。

(3) 象牙質シアロリンタンパク質 (DSPP) のスプライスバリエーションの発現解析

DSPP mRNA の遺伝子発現量は歯髄先端部 (PT)、歯髄本体部 (PB) では非常に低く、象牙芽細胞 (OB) で急激に上昇した (図 2)。

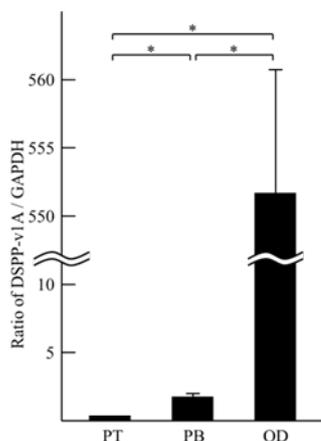


図 2

DSP-only mRNA の遺伝子発現量は歯髄本体部 (PB)、象牙芽細胞 (OB) でほぼ同じであったが、歯髄先端部 (PT) では発現が非常に低かった (図 3)。

また、象牙芽細胞における 2 つの mRNA の発現量は DSPP mRNA が DSP-only mRNA よりも有意に高かった。さらに歯髄からタンパク

質を抽出・分離し、DSPP 由来タンパク質について調べた結果、DSP は認められたが DPP は検出されなかった。これらの結果は近年明らかになりつつある DSPP 由来タンパク質と歯の石灰化の関係を裏付ける結果となった。また、DSPP 遺伝子が象牙芽細胞への分化マーカーとして有用であることも示した。

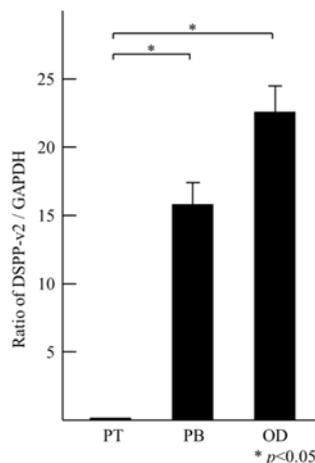


図 3

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 2 件)

Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y: Dentin Sialophosphoprotein-derived Proteins in the Dental Pulp. J Dent Res.印刷中, 査読有 DOI: 10.1177/0022034515585715

Saito M, Karakida T, Yamamoto R, Nagano T, Yamakoshi Y, Hayakawa T, Oida S, Gomi K.: Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk. Dent Mater J. 2014;33(2):275-83. 査読有 DOI: 10.4012/dmj.2013-321

〔学会発表〕(計 3 件)

Ryuji Yamamoto, Saeko Kinoshita, Yasuo Yamakoshi: DSPP-derived Protein are Necessary for Maintaining TGF-β1. 93RD GENERAL SESSION & EXHIBITION OF THE IADR. Boston (USA). 2015. 3. 11-15

山本竜司、唐木田丈夫、大井田新一郎、山越康雄: プタ象牙質シアロリンタンパク質 (DSPP) 遺伝子のスプライスバリエーションについて. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場, (福岡県・福岡市), 2014. 9. 25-27

唐木田丈夫、山本竜司、大井田新一郎、山越康雄: プタ歯髄から分離した細胞の不死化とクローニング. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場, (福岡県・

福岡市), 2014. 9. 25-27

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 竜司 (Yamamoto Ryuji)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号 : 2 0 4 1 0 0 5 3