

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670839

研究課題名(和文)チタンをニッチとしたヒト歯肉由来間葉系幹細胞によるインプラント周囲組織の再生治療

研究課題名(英文)Regeneration of peri-implant soft-tissue with Mesenchymal stem cells cultured on titanium

研究代表者

熱田 生(Atsuta, Ikiru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30423487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は歯科インプラントの口腔内での長期維持のため、インプラント周囲における上皮封鎖性の効率的な獲得と向上を目指す。そのため通常は異物として認識されるチタン製インプラントを「微小環境」として初期培養環境におくことで、幹細胞にインプラント自体を生体の一部と認識させようとするものであった。このような「微小環境」を幹とした概念は間葉系幹細胞(MSC)を用いてのみ応用可能である。さらに本研究は発想としての独創性だけで手技的には簡易であり、歯科だけでなく人工物を使用するすべての医療、さらには幹細胞を用いた細胞治療全般にも応用可能な技術と考えられるため、将来的には幅広い分野への貢献を期待できる

研究成果の概要(英文)：Implant designs that can stimulate and integrate with an epithelial wound healing process may significantly enhance the efficacy of dental implants. Here, we investigated the effect of systemic Mesenchymal Stem Cells (MSC) transplantation on peri-implant epithelial sealing. Systemic MSC transplantation may be effective for enhancing epithelial sealing around titanium implants. In addition, the peri-implant epithelium condition on the implant body was investigated in vitro study. Rat oral epithelial cells (OECs) were co-cultured with MSC. We also identified an increase in the number of attached OECs upon direct or indirect co-culture with MSCs, and OEC apoptosis increased in co-culture with MSCs.

Collectively, our data suggest that systemic MSCs accumulate around the implant in the early stage and promote PIE formation and soft tissue attachment to the implant surface.

研究分野：インプラント周囲上皮

キーワード：上皮細胞 細胞接着 チタンインプラント

## 1. 研究開始当初の背景

現在インプラント治療は歯科の欠損補綴において必要不可欠な治療法となっている。ところが近年では、インプラント治療は機能の回復だけでなく、審美性の回復が望まれるようになってきている。1998年インプラント治療の先駆的会議であるITI Consensus Conference トロント大会以来、成功基準として「審美的な上部構造の機能的支持」と明記されるようになった。またOsseointegration study club of Japan等でも2006年の議題に上がっており、日本においても審美面を重要視したインプラント治療がなされている。加えて、この審美面と機能性を兼ね備えた治療は、出来るだけ長い期間維持されることが患者と術者の双方から強く望まれるようになってきている。そのため、本研究と同様にインプラント周囲の骨結合および上皮封鎖の獲得、維持、安定を目指した研究が数多くなされるようになった。

## 2. 研究の目的

上記の通り、治療後のインプラントの安定は近年インプラント研究の中心となっている。歯科インプラント治療は基礎的データが欠落したまま、臨床現場で進歩を遂げた特殊な医療技術である。その有効性は患者需要の著しい伸びからも容易にうかがえる(後述図参照)。そのため、永久歯を失った際の歯科医療の選択肢としては必要不可欠なものである。研究は日々続けられその成功率も上昇、術後1年でも95%の症例で人工物であるインプラントが口腔内で歯と同様の働きをしているとされる。しかし、残りの5%や5~10年と長期経過症例ではインプラントの生存率は著しく減少し、脱落の理由に関しては解明されぬまま経験的に様々な憶測がされるのみである。そこで我々は総合大学としての利点を生かし、インプラント専門の臨床チームの強力により原因

を追及。それにより、独自の原因に行き当たった。これは独創的な発想であるが、基礎研究に十分裏打ちされた限りなく事実に近い概念と思われる。そこで我々はその歯科インプラント治療の失敗原因として浮上した新たな要因を解決させる治療薬として、近年臨床現場の表舞台に現れてきた間葉系幹細胞(MSC)に着目した。

この幹細胞もインプラント同様、臨床応用が基礎研究による裏打ちを飛び越えて始まっている医療であるが、その有効性は画期的であり多方面から研究されている。しかし基礎研究と臨床研究では間葉系幹細胞の主たる働きに関して視点が異なる。これは実に興味深い減少であるが、我々はそれを橋渡しするとともに知識の共有をはかり、また別の角度から臨床応用につなぐことを考えている。

現在すでにいくつかの研究施設がMSCを用いた再生研究を行っている。事実臨床的にその成果を上げているが、今後国としてその技術を世界に発信するには、分業的に知識や技術の多施設への分散が必要と思われる。

そのため今回のような機会において、我々の研究を進め、さらに臨床応用することで、今後の国の医療技術の進歩に貢献していきたい。

## 3. 研究の方法

チタン製の歯科インプラント周囲において間葉系幹細胞の存在がどれほど有効であるかを明らかにするため、動物および培養実験を各1年ずつに分けておこなった。

### 【動物実験】

全身投与されるMSCは4週齢の雄性Wistarラット骨髄から採取された。また6週齢実験モデルは、上顎右側第一臼歯を抜歯後、即時に純チタン製インプラント(図1)を埋入され、その24時間後にMSCが尾静脈より全身投与された。そして埋入4週後に軟組織の免疫組織化学的に観察した。さらにその封鎖性は西洋わさびペルオキシ

ダーゼ (HRP; 分子量約 41,000) をインプラント周囲溝に 30 分間持続投与し、その浸透深さを組織上で観察することで評価した。また図 4 で示す実験では GFP 遺伝子導入ラットを用いた。

#### 【培養実験】

出生 4 日齢の Wistar ラット口腔粘膜より採取した上皮組織から上皮細胞 (OECs) を単離した。その後 3 日間だけ単独で培養し、同数の MSC など各種指定条件で共培養した。そして OECs が MSC から受ける影響についてアポトーシス (Apoptosis marker/ FACs)、細胞増殖能 (Brd-U assay)、接着能 (Adhesion assay) などで評価した。

なお、この際使用した MSC も正しく単離できたか分化能や増殖能などの STEMNESS を十分に評価した上で実験群に投与した。

#### 4. 研究成果

##### 【動物実験】

埋入 4 週後のモデルで、インプラント-周囲上皮界面における接着の指標としてラミニン-332 の局在を観察した。背景でも記した通りインプラント周囲上皮の接着構造は根尖側 2/3 に限局していたが、MSC 投与によりインプラント体界面全体に観察された。また上皮封鎖性を直接評価する HRP の浸漬実験でも、MSC 投与群における HRP の侵入阻害能が上昇していた。

MSC 全身投与によるインプラント周囲上皮の封鎖性改善は、投与された GFP 陽性 MSC がインプラント周囲上皮と結合組織界面付近に集積することで説明出来る。ただしこの集積も 1 週間を過ぎると観察されない。

インプラントと周囲上皮界面におけるラミニン-332 の発現量増加や HRP の侵入抑制を示した実験結果は、MSC の全身投与がインプラント周囲での封鎖性を局所的に上昇

させたことを示す。この機序として MSC の集積がある。実際、腫瘍や創傷部位への MSC 集積に加えサイトカインなどの分泌による治癒促進効果が報告されている。本研究でもインプラント埋入という行為が炎症を惹起させ、MSC の集積を促したのかもしれない。ただしその集積が 1 週間と比較的短期間であるにも関わらず、埋入 4 週間後でも上皮封鎖性を高く維持していた。MSC が消失しても尚なぜ効果は持続したのだろうか。その疑問に答えるべく培養実験を以下の様に行った。

#### 【培養実験】

OECs の単独培養 (Cont), MSC との共培養 (Co-cul)、さらに共培養時に Trans-well® を使用し、MSC との細胞接触を遮断して共培養 (Trans-well) の 3 群を作製した。Cont 群と比較して Trans-well 群では OECs の生存性が上昇した。また増殖性および接着性でも有意な増加が認められた。

投与 MSC が宿主側の MSC の性質を変えた事である。病的な状況下にある MSC は病態を悪化させる病的性質を有する事も知られており、本研究のように全身的な MSC 投与はインプラント体周囲の病的な MSC に対し炎症抑制や治癒促進を促す一方、上皮細胞には MSC が発現するサイトカインの効果で接着性向上などの直接的影響を及ぼしているのかもしれない。

全身投与された MSC はインプラント周囲の上皮細胞に対して直接作用し、封鎖性を向上することが示唆された。このような MSC による細胞治療はインプラント周囲組織における外部刺激への抵抗性を保ち、インプラント体の口腔内での長期安定化に貢献するかもしれない。

## 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)

Oshiro W, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Yamazoe J, Kondo R, Sakaguchi M, Matsuura Y, Tsukiyama Y, Koyano K. Effects of CaCl<sub>2</sub> hydrothermal treatment of titanium implant surfaces on early epithelial sealing. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015 1;131:141-7

Kondo R, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Matsuura Y, Furuhashi A, Koyano K. Therapeutic interaction of systemically-administered mesenchymal stem cells with peri-implant mucosa. (査読有り) PLOS ONE, 20;9(3):e90681.doi:10.1371/journal.pone.0090681. 2014

〔学会発表〕(計 3件)

熱田 生 2014 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会(シンポジウム)

Kyudai Oral Bioscience 2014 -8th International Symposium-  
「Effect of systemically transplanted mesenchymal stem cells on epithelial sealing around dental implants」を発表(Oral presentation)

The 91st IADR General Session & Exhibition において「Effect of mesenchymal stem cells on dental implant epithelial sealing」

〔図書〕(計 1件)

熱田 生 2014 間葉系幹細胞を用いてインプラント周囲における上皮封鎖性は改善出来るか? 日本補綴歯科学会誌第6巻1号

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熱田 生(ATSUTA, Ikiru)

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴科

研究者番号: 30423487

### (2) 研究分担者

古谷野 潔(KOYANO, Kiyoshi)

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴科

研究者番号: 50195872

鮎川 保則(AYUKAWA, Yasunori)

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴科

研究者番号: 50304697

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: