

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861598

研究課題名(和文)体性幹細胞ホーミング因子による新規歯髄再生誘導技術の開発

研究課題名(英文)A new method of dental pulp regeneration without any cell transplantation

研究代表者

松裏 貴史(MATSUURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10721037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植をすることなく、コラーゲンと薬のみで、歯の模型の根管へ細胞を呼ぶことに成功した。しかし、細胞が歯の中に入ってきたのはわずかで、根の先に限局していたため、コラーゲンおよび薬の条件を検討していく必要がある。

また、再生した歯髄組織より上部の根管には、MTAによる封鎖を考えている。根の先の3mm以上に歯髄組織が再生されれば、発見の難しい根の先に生じる垂直性の歯根破折や、根尖性歯周炎を防ぐことが出来ると考える。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to regenerate dental pulp tissue in a root canal of tooth model without any cell transplantation. But the regenerated dental pulp tissue localized at an apex of root canal, so we need to find a best condition of the method to get a better result.

研究分野：細胞生物学

キーワード：歯髄再生

1. 研究開始当初の背景

現在の歯科治療では、虫歯が深く進行すると、一度細菌感染した歯髄の保存はほぼ不可能であり、歯髄を除去しなければならない。そして、一度歯髄を取り除いた歯は、根管を根管充填材で緊密に封鎖される。しかし、一度この治療を行った歯は、歯牙破折が起きやすく、また根管充填材と根管壁との間隙から細菌が侵入することによる根尖性歯周炎が生じ易くなり、抜歯となるケースも多い (Ingle et al., 2002, Dammaschke et al., 2003)。これらのことより、深部齲蝕が生じた際でも、歯髄を除去し、消毒した後、再度新しく歯髄を再生することが出来れば、持続的な象牙質の形成、外来刺激に対する象牙細管内の防御、および免疫機能の回復につながり、そのことによって歯牙破折や根尖性歯周炎といった抜歯につながる病態を防ぐことができる。これはとても有用な歯科医療手段となることは明白であり、多くの国民を救うことができる可能性を秘めている。以下の表にて、従来の根管充填法と歯髄再生療法とを比較する。

	従来の根管充填法	歯髄再生療法
歯の破折	歯髄がないため二次象牙質が形成されず、歯の破折が生じやすい	持続的な象牙質形成により、歯の破折が生じにくい
根尖性歯周炎	根管充填材と根管壁との間隙から根尖部への再感染の可能性がある	歯髄を再生させるため、根尖部への感染の予防が可能

歯髄創傷治療に関して、血液成分を活用した脈管再生療法は Bamchs と Trope(2004)が考案して以来多くの症例報告がなされているが、象牙質形成及び歯髄の再生に関して不明な点が多い。一方、真に生物学的な歯髄再生療法として、歯髄幹細胞、足場であるコラーゲン、成長因子 (G-CSF) を用いた方法が開発され、臨床前試験まで完成している (Iohara et al., 2013)。しかしこの方法にも、いくつかの問題点を含んでいる。即ち、患者から歯髄幹細胞を採取するために、智歯や不要な歯の抜歯が必要であること、また、その細胞を培養するための血清も患者から採取しなければならず、患者への侵襲が少なく

ない。また、患者から採取・分離した歯髄幹細胞は、無菌培養室(CPC)にて培養して細胞数を増やした後に治療へ応用することとなるため、培養のための人件費や材料費がかかり、CPCを備えた大掛かりな施設が必要であり、また、培養時のコンタミネーションのリスクもある。そこでこれらの問題点を解決するため、“細胞移植を用いずに歯髄再生治療をすることはできないものか？”との疑問から着想に至った。

近年、全身に分布している幹細胞や前駆細胞を含む細胞が、ある部位の損傷を回復させるため、損傷部位に向けて遊走してくるホーミングという現象が広く知られるようになってきている。元来、生体内の細胞は成長因子に導かれて移動する走化能を持つために、ホーミングが引き起こされると考えられている (Mao et al., 2010, Laird et al., 2008)。そこで、このメカニズムを応用し、成長因子を用いて歯周組織を含めた全身の細胞を根管へ動員することで、細胞移植をせずに歯髄再生をすることが出来ないか考えた。以下の表にて、細胞移植を用いた歯髄再生療法と、細胞移植を用いない歯髄再生療法とを比較する。

	細胞移植を用いた歯髄再生療法	細胞移植を用いない歯髄再生療法
侵襲	患者の幹細胞及び血清が必要なため、抜歯及び採血が必要	抜歯及び採血は不要
安全性	幹細胞の培養が必要であるため、コンタミや遺伝子変異の可能性あり	コンタミや遺伝子変異の可能性なし
コスト	培養及び輸送において、材料費、人件費がかかり、高コスト	成長因子と足場材の費用のみであり、低コスト
普及し易さ	無菌培養室が必要なため、実用できる施設は限られる	大掛かりな施設が不要であるため、一般の診療所でも実用可能

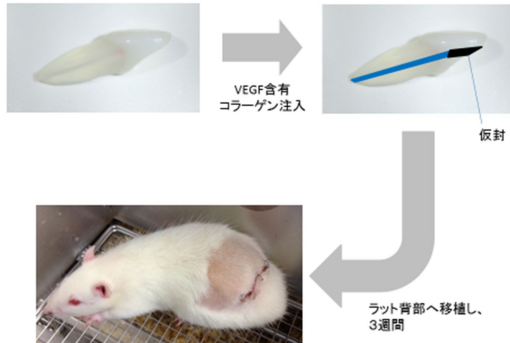
2. 研究の目的

今回我々は、幹細胞移植に付随する上記の点を回避するため、細胞移植を用いないで根管内に歯髄組織を再生させる方法の確立を目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

歯内療法実習用模型歯 (B22X-END, ニッシン) をタービンにつけたダイヤモンドラウンドバーを使って髓腔開拓し、手用ステンレスファイルにて#60 まで根管拡大し、17%EDTA 溶液に 5 分間浸漬後、3 ウェイシリンジにてよく水洗し、エアーをかけ、切削片が残っていないことを顕微鏡にて確認後、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液中に 1 日浸漬した。

その後、PBS(-)にて 2 回洗浄し、滅菌ペーパーポイントにて根管を乾燥後、気泡が入らないように Vascular endothelial growth factor (VEGF) 含有コラーゲンゲルを根管へ注入し、37℃ で 10 分間培養した。その後、歯冠部をフジフィル LC (GC) にて仮封し、ペンキュアー (モリタ) にて 10 秒間照射し、6 週齢 Wister 雄ラット背部へ移植した。3 週間飼育後、灌流固定を行った。



その後、人工歯を取り出し、凍結切片を作成して H-E 染色を行った。

また、VEGF を含有していないコラーゲンゲルをネガティブコントロールとして用いた。

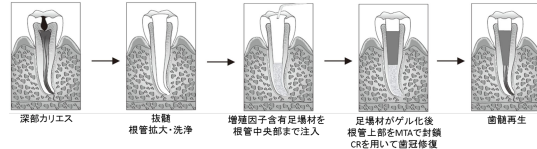
4. 研究成果

ラット背部への皮下移植後 3 週で、移植した根管模型内の根尖部 2mm の部位に、ラット組織由来の線維芽細胞様の細胞が密に観察された。また、ネガティブコントロールにおいては、根尖部に細胞の進入は見られたものの、その細胞密度は低く、VEGF 含有のもので観察された様な線維芽細胞様の細胞はみられなかった。

細胞移植をすることなく、足場と成長因子のみで、ラット背部皮下へ移植した根管模型の根管内に宿主の細胞を動員することに成

功した。しかし、動員されたのは根尖部に局限していたため、足場および成長因子の条件を検討する必要がある。このことによって、最低でも側枝のある根尖側 3mm 以上は細胞を動員すること可能となる。

また、再生歯髄組織より上部の根管には、MTA による封鎖を考えている。根尖相当部の歯髄組織が再生されれば、発見の難しい根尖相当部の垂直性歯根破折および、根尖性歯周炎を防ぐことが出来ると考える。今後とも、実験を進めていくことによって、大きな設備が不要で簡単に実施することが可能な、新規歯髄組織再生方法の確立を試みる。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

松裏貴史、細胞移植を用いない新規歯髄再生療法の開発、第 143 回日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会・60 周年記念大会、2015 年 11 月 12-13 日、文教シビックホール (東京都・文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松裏 貴史 (MATSUURA Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・

助教

研究者番号 : 10721037