

再生歯髄および再生歯根膜を伴うインプラント体の開発に関する研究（21-7）

主任研究者 庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（室長）

研究要旨

歯科治療において歯が欠損した場合、入れ歯、ブリッジの治療を行うことが一般的であるが、インプラントは保険治療する場合は様々な条件があるものの、入れ歯よりも咀嚼能力に優れており、健康な歯を削る必要がない、骨が痩せるのを防げるなど様々な利点があるため、一般に治療するようになってきた。インプラント治療は咀嚼を向上させることで低栄養になる事を防ぎ、オーラルフレイルの予防に有効である。一方、歯根膜なしで骨と直接癒着するため、天然歯と違いクッション性がないため対合歯へ負担がかかること、歯根膜の免疫防御機構が働かないため感染に弱いなどの欠点がある。特にインプラント周囲炎が生じた場合、インプラントの脱落だけでなく、骨の吸収がおきることによって入れ歯を入れることが出来なくなる可能性もあり、社会問題となりつつある。

これまで私共は、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療法の開発を行ってきた。この開発を行う中で、抜去歯に歯髄幹細胞を移植した後、顎骨に再植すると、歯髄と共に歯根膜が再生できることを明らかにした。これより今回、この知見を応用して歯根膜を伴うインプラント体を開発し、最終的に臨床応用できるように前臨床研究にて検討する。これにより、通常のインプラント治療で得られる咀嚼能力の向上の効果が長期間維持できると考えられ、最終的に口腔機能崩壊の引き金となるオーラル・フレイルの予防につながることを期待できる。動物実験においては使用動物および使用法に関して動物実験施設のガイドラインに則り、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護精神をふまえ、その定める規則に基づき実験を行う。

主任研究者

庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（室長）

分担研究者

Ziauddin SM 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（研究員）

A. 研究目的

一般歯科治療において、歯周病、う蝕および破折等により、歯が欠損した場合、治療選択肢として、入れ歯、ブリッジが挙げられる。インプラントは保険で治療する場合は病院で施術する必要があるなどの様々な条件があるものの、入れ歯よりも咀嚼能力に優れており、健康な歯を削る必要がない、骨が痩せるのを防げるなど様々な利点があるため、一般的に治療するようになってきた。現在国内では2,500万人以上が入れ歯を使用し、年間47万件的インプラント治療が施されている。インプラント治療は咀嚼を向上させることで低栄養になる事を防ぎ、オーラルフレイルの予防に有効である一面がある。一方、歯根膜なしで骨と直接癒着するため、天然歯と違いクッション性がなく、対合歯へ負担がかかること、天然歯と違い歯根膜の免疫防御機構が働かないため感染に弱いなどの欠点もある。特にインプラント周囲炎が生じた場合インプラントの脱落だけでなく、骨の吸収がおきることにより入れ歯を入れることが出来なくなる可能性もあり、社会問題となりつつある。

これまで私共は、深いう蝕や歯髄炎で歯髄を完全に除去した抜髄歯あるいは感染根管歯において、根管内の無菌化技術を併用しつつ、歯髄幹細胞と遊走因子を歯（根管）内に移植することにより、血管新生や神経伸長を促進させ、歯髄・象牙質を再生させ、最終的に歯の機能を蘇らせるという歯髄再生治療法の開発を行ってきた。この中で、イヌ抜去歯をオートクレーブにて不活化し、この歯の内部に歯髄幹細胞を移植した後、イヌの顎骨に再植すると、歯髄が再生されるとともに歯根膜も再生できることを明らかにした（特許番号6338214号）。この知見を基に今回、歯根膜を伴うインプラント体の開発を目的として、まずインプラント体に歯根膜細胞および歯髄幹細胞が定着できる最適条件を検討後、インプラント内部に歯髄幹細胞を注入し、これを顎骨に移植することで歯根膜が再生できる

「細胞と金属のハイブリッド型インプラント」を開発し、最終的に臨床応用できるかを前臨床研究にて検討する。これまでに、歯根膜が付着したインプラント体は開発されておらず、独創的である。

## B. 研究方法

まず、歯根膜細胞および歯髄細胞が定着できるインプラント体の条件を *in vitro* において検討する。次にマウスの皮下に歯髄幹細胞を注入した最適なインプラント体を移植し歯根膜が再生できるかを形態学的、および分子生物学的に検討する。最終的にイヌの顎骨へ歯髄幹細胞を注入したインプラント体を移植し、歯根膜再生の有無とヒトへの応用の可能性を検討する。

## 2022年度

1. イヌを全身麻酔後、抜歯し、歯を割って歯髄を採取した。採取した歯髄を酵素処理して歯髄幹細胞を分離・培養した。4代目まで培養後、凍結保存した。また抜歯した歯より歯根膜を採取し、歯髄と同様に酵素処理をして歯根膜幹細胞を分離・培養後凍結保存した（庵原）(Ziauddin)。

2. *In vitro* におけるインプラントへの細胞接着最適条件の検討のため溶液をインプラントに付着させた。48 ウェルプレートに処理したインプラントを静置し、歯根膜幹細胞および歯髄幹細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well を 10%FBS 含有 DMEM 300ul で播種した。7 日後に細胞数を計測した。
3. *In vivo* におけるインプラントへの細胞接着最適条件の検討のため、マウス皮下への異所性移植をおこなった。インプラントに溶液を付着させた。このインプラント内部にヒト歯髄幹細胞を注入し、SCID mice の皮下に異所性移植した。28 日後、移植物を取り出し、インプラント周囲及び内部に付着した組織を採取した。この組織より total RNA を抽出し、Real-time PCR にて周囲組織から歯根膜マーカー (Periostin および PLAP-1)、内部組織から歯髄マーカー (Syndecan 3, Tenascin C, TRHDE)、血管新生成長因子 (VEGFA, FGF2)、神経新生成長因子 (BDNF, NGF, GDNF) の mRNA 発現を検討した。また採取した total RNA がヒトまたはマウス由来なのか RT-PCR を用いて動物種を同定した。(庵原、Ziauddin)
4. インプラント体に溶液をコーティングした。ヒト歯髄幹細胞を注入し、SCID mice の皮下に異所性移植した。28 日後、移植物を取り出し、インプラント周囲及び内部に付着した組織を採取した。採取した組織を固定し、パラフィン切片とした。インプラント周囲組織について、切片を HE 染色と Periostin にて免疫組織染色し、光学顕微鏡にて観察した。また歯髄内部組織について、切片を HE 染色、Vimentin にて免疫組織染色し、光学顕微鏡にて観察した。さらに、血管新生、神経侵入を確認するために、切片を BS-1 Lectin および PGP9.5 にて免疫組織染色し、光学顕微鏡にて観察した。(庵原、Ziauddin)。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物実験においては使用動物および使用法に関して動物実験施設のガイドラインに則り、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護精神をふまえ、その定める規則に基づき実験を行う。

## C. 研究結果

2022 年度

1. *In vitro* の歯根膜細胞のインプラントへの最適コーティング材の検討した。
2. マウス異所性移植において、Real-Time PCR による歯根膜バイオマーカーの mRNA 発現は歯根膜様インプラント周囲組織における歯根膜バイオマーカーである periostin や PLAP-1 の発現がみられた。一方で、コントロールとの有意差はみられなかった。

3. 歯髄様インプラント内部組織において歯髄マーカーであるヒト Syndecan 3 や Tenacin-C の発現がみられた。マウス Syndecan 3 や Tenacin-C の発現は全体的に発現にあまり差がみられなかった。一方マウス TRHDE3 の高い発現がみられた。歯髄様インプラント内部組織内での血管新生成長因子 (VEGFA, FGF2) の発現が高い傾向がみられた。
4. マウス異所性移植モデルの形態学的解析において、インプラント周囲に形成された組織の表面に線維性の膜状組織が形成されており、Periostin に好染した。

#### D. 考察と結論

##### 2022 年度

今回の *in vitro* の結果から、最適濃度を変更した。また、*In vivo* のマウスの分子生物学的解析において、歯根膜様インプラント周囲組織における歯根膜バイオマーカーである periostin や PLAP-1 の発現がみられた。これらのコーティングは再生歯髄を誘導するのにも良いと考えられた。

マウス異所性移植モデルにおけるインプラント周囲の歯根膜再生および内部の歯髄再生の形態学的解析を行うと、インプラント周囲付着している組織が歯根膜マーカーである Periostin を好染したことから、インプラント内部に歯髄細胞を移植することでインプラント周囲に歯根膜様の組織を誘導できることが明らかになった。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Zayed M, Iohara K. Age Related Senescence, Apoptosis, and Inflammation Profiles in Periodontal Ligament Cells from Canine Teeth. *Curr Mol Med*. 2022 May 20. doi: 10.2174/1566524022666220520124630.
- 2) Nakashima M, Fukuyama F, Iohara K. Pulp Regenerative Cell Therapy for Mature Molars: A Report of 2 Cases. *J Endod*. 2022 Aug 5 ; S0099-2399(22)00510-6. doi: 10.1016/j.joen.2022.07.010. Online ahead of print.
- 3) Ziauddin SM, Nakashima M, Watanabe H, Tominaga M, Iohara K. Biological characteristics and pulp regeneration potential of stem cells from canine deciduous teeth compared with those of permanent teeth. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022 Sep 2;13(1):439. doi: 10.1186/s13287-022-03124-3.

##### 2. 学会発表

## 1. 国内講演

- 1) 庵原耕一郎 「歯髄再生治療へのナノバブルの応用」第5回日本オゾン医療・審美学会総会・学術大会 日本を代表するオゾン研究者の集い ～オーラルオゾンシンポジウム～ 教育講演 2022年10月30日 WEB開催

## 2. 国内シンポジウム

- 1) 中島美砂子、庵原耕一郎 「歯髄幹細胞を用いた根管治療後の歯髄再生治療の実用化のための共同研究」第22回日本再生医療学会総会 シンポジウム. 2023年3月23日. 京都

## 3. 国内学会

- 1) 庵原耕一郎、大平猛、富永三千代、中島美砂子 「感染根管治療において除菌が困難な副根管へのプラス帯電性ナノバブルの効果 —プラス帯電性ナノバブルの難治性感染根管治療への応用—」日本マイクロ・ナノバブル学会第10回学術総会 . 2022年12月11日. 仙台
- 2) 庵原耕一郎、中島美砂子、富永三千代 「乳歯歯髄幹細胞を用いた同種移植による歯髄再生」 第22回日本再生医療学会総会 ポスター発表 2023年3月23日. 京都

## 4. 国際学会

- 1) Iohara K, Ziauddin SM, Tominaga M, Nakashima M. 「Periradicular disinfection is essential for pulp regeneration in the apical periodontitis.」 2022 IADR GENERAL SESSION and Exhibition Virtual Experience. June 24 2022. WEB開催
- 2) Ziauddin SM, Iohara K, Tominaga M, Nakashima M. 「Regenerative Potential of Stem Cells from Deciduous and Permanent Teeth.」 2022 IADR GENERAL SESSION and Exhibition Virtual Experience. June 24 2022. WEB開催

## 5. その他

- 1) 中島美砂子、庵原耕一郎、田中宏幸  
歯髄再生治療スペシャルインタビュー 「歯髄再生治療を導入する歯科医院が増加中。歯科医療を劇的に変えられるのか!？」  
Dentalism No. 56. p16-19. MARCH 2023.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎  
発明の名称：非細胞性根管充填材及び非細胞性歯組織再生促進キット

出願番号：特願2021-509662

出願日：2020年3月27日

登録番号：7212144

登録日：2023年1月16日

出願人：興和株式会社