

再生組織の複合立体形成による 歯の再生治療技術の開発



代表研究者

大島 正充

国立大学法人 徳島大学大学院医歯薬学研究部 顎機能咬合再建学分野 准教授

1. 研究目的

高齢化社会を迎えた我が国において、歯の喪失や疾患・機能障害は増加の一途をたどっており、その本質的解決は国民の健康長寿を支えるための重要な課題であるとされている。これまでに、健康な高齢者を増やすために推進されてきた「8020運動」により、高齢者の残存歯数は飛躍的に上昇しているものの、歯や歯周組織における「疾患や機能的障害を有する残存歯の増加」という側面が指摘されている。特に、高齢化に関連したう蝕や歯周炎の進行による歯・歯周組織の崩壊は、歯の喪失に大きく関わる不可逆的な障害であり、生理的かつ機能的な歯の再生治療技術の開発が期待されている。

再生医学は幹細胞と組織工学技術を融合させ、生物学的な発生・再生の原理に基づく次世代の医療技術へと発展することが望まれている。実質的な組織損傷を伴う疾患や外傷に対する治療技術として、吸収性／非吸収性の人工担体と幹細胞との複合体形成技術や、細胞シート工学技術を利用した組織再生に向けた技術開発と臨床応用化が推進されている。歯科領域においても、歯周組織治療用細胞シートの臨床応用が進められているものの、単一細胞により構築された歯根膜細胞シートでは、複数種の細胞から構成される歯周組織の広範性損傷に対する再生が困難であるとされている。そこで本研究では、歯周組織を構成する歯槽骨・歯根膜線維の構造を再現する複合細胞シートを構築し、三次元的な歯周組織再生が可能であるかを検証することにより、新た

な歯周組織再生技術の開発を目的とした。

2. 研究内容

2.1 骨細胞－歯根膜細胞の積層構造を有する複合細胞シートの作製

天然歯の歯周組織構造を再現するために、骨芽細胞と歯根膜細胞の積層化による複合細胞シートの作製を検討した。歯根膜細胞 (PDL細胞) は5週齢SD系雄性ラットの白歯から採取・培養し、骨芽細胞はマウス由来MC3T3-E1細胞を用いた。これらの細胞を温度感受性培養皿 (UpCell®, CellSeed, Tokyo, Japan) に段階的に播種し、積層培養により歯根膜細胞と骨芽細胞による複合細胞シートを作製した (図1a)。複合細胞シートの組織学的解析により、骨芽細胞と歯根膜細胞の境界は分離することなく、複数の細胞が層状に立体構築されていることが示された (図1b)。次に、複合細胞シートの積層構造を詳細に解析するために、骨芽細胞および歯根膜細胞の特異的マーカーによる免疫組織化学染色、および動物種 (ラット) 特異的Fluorescent in situ hybridization (FISH) プローブ染色にて解析した。マウス特異的Osteocalcin (OCN) の免疫染色では、複合細胞シートにおける骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) 領域のみが陽性として検出された。その一方で、ラット特異的FISHプローブ染色においては、複合細胞シートにおける歯根膜 (PDL) 細胞領域のみが陽性として検出されており、歯根膜細胞領域と骨芽細胞領域が明確に区画化された骨・歯根膜構造の

立体形成なされていることが示された (図1c)。

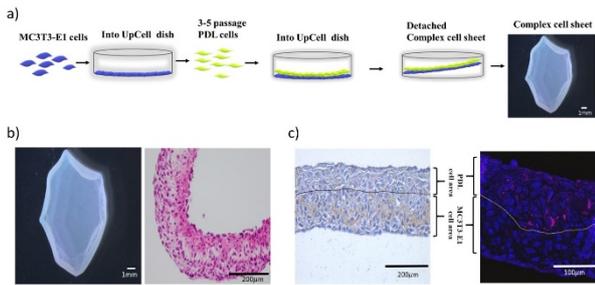


図 1 複合細胞シートの作製と組織学的解析

- 骨 - 歯根膜構造を有する複合細胞シートの作製手順の模式図。
- 複合細胞シートの実態像と HE 染色像。MC3T3E-1 細胞と PDL 細胞の立体構築により作製した。(Scale bar : 左図 1mm, 右図 200 μ m)
- 複合細胞シートにおける Osteocalcin 免疫染色像 (左図) とラット特異的 FISH プローブ染色像 (右図)。複合細胞シート内の骨細胞 - 歯根膜細胞の領域が明瞭に区別されている。(Scale bar : 左図 200 μ m, 右図 100 μ m)

2.2 複合細胞シートの異所性移植による歯周組織形成の評価

次に、立体構築された複合細胞シートが、適切に骨 - 歯根膜の組織構造を形成するかを検証するために、生体内への異所性移植を行った。4週齢の C57BL/6Njcl (CLEA Japan, Osaka, Japan) マウスから下顎第一臼歯を抜歯し、歯根膜組織をすべて除去した後に、オートクレーブ処理にて無細胞化した。その無細胞化したマウス臼歯を担体として用い、骨芽細胞シート、歯根膜細胞シート、ならびに複合細胞シートをそれぞれ歯根周囲に付与した状態でコラーゲンゲル (Cellmatrix® Type I-A, Nitta Gelatin Inc. Osaka, Japan) に封入し、CB17/Icr-scld/scld 免疫不全マウス (CLEA Japan, Osaka, Japan) の腎臓被膜下に移植した (図2a)。異所性移植4週後に組織学的解析を行ったところ、骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) シートを移植した群では、歯根周囲に直接的な骨組織の形成が認められ、歯根膜細胞 (PDL細胞) シートを移植した群では、歯根周囲に線維性組織が取り囲んでいたものの、歯根膜組織としての線維走行や、骨組織の形成は認められなかった。一方で、複合細胞シートを移植した群では、歯根周囲に

天然歯と類似した歯周組織の形成がなされており、複合細胞シートの骨 - 歯根膜構造の配置を維持した状態で、適切な組織分化がなされていることが示された (図2b)。

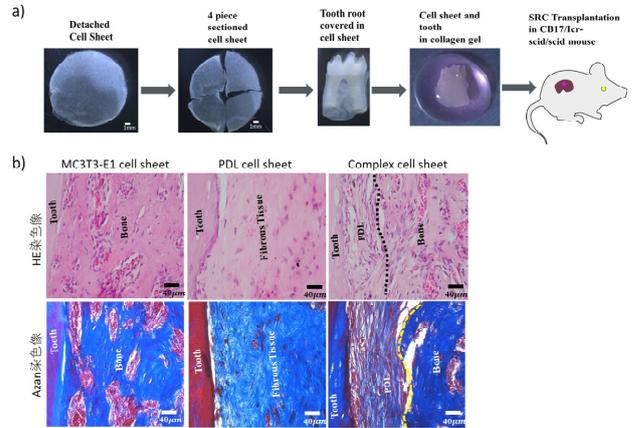


図 2 複合細胞シートの異所性移植による歯周組織形成の評価

- 細胞シートの異所性移植の手順の模式図。(Scale bar : 1mm)
- 異所性移植 4 週後の HE 染色像および Azan 染色像。(Scale bar : 40 μ m)

2.3 複合細胞シートの同所性移植による歯周組織再生効果

最後に、骨 - 歯根膜構造を有する複合細胞シートが、広範囲に至る歯周組織の損傷を再生可能であるかを検証するために、マウス上顎第一臼歯の口蓋側に近遠心幅2mm, 頬舌幅0.5mm, 深さ1.5mmの歯周組織損傷モデルを作製した (図3a)。同損傷モデルに対して、移植なし (Control)、PDL細胞シート、ならびに複合細胞シートの同所性移植を行ったところ、移植8週後において、Control群およびPDL細胞シート群では歯周組織の治癒が不完全な部位が認められた (図3b)。一方で、複合細胞シート群では、Control群およびPDL細胞シート群と比較して有意な歯槽骨再生が認められ、組織学的解析では天然歯と同等の歯周組織構造を有していることが示された (図3b)。

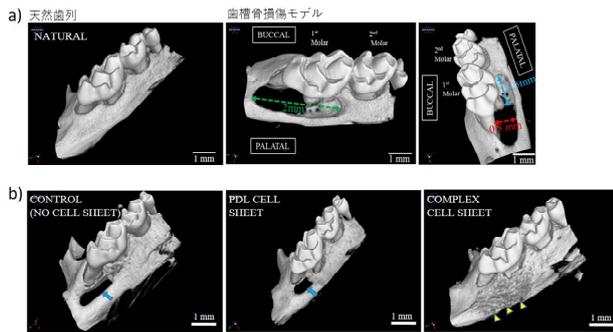


図 3 複合細胞シートの同所性移植による歯周組織再生効果

- a) 天然歯列と歯周組織損傷モデルのマイクロ CT 像。マウス上顎第一臼歯の口蓋側に近遠心幅 2mm, 頬舌幅 0.5mm, 深さ 1.5mm の歯周組織損傷モデルを作製した。(Scale bar : 1mm)
- b) 歯周組織損傷モデルに移植後 8 週間のマイクロ CT 像。矢印 : 歯周組織の治癒が不完全な部位、矢頭 : 歯周組織の治癒部位。(Scale bar : 1mm)

2.4 結論と展望

本研究成果から、骨 - 歯根膜線維の構造を再現する複合細胞シートによる歯周組織再生技術が開発されたとともに、複合組織の立体形成による組織工学技術の有用性が示された。本研究では、再生治療技術の概念実証モデルとして骨芽細胞に細胞株を用いているため、臨床応用に向けた取り組みとして、患者由来の骨髄間葉系細胞の利用や、歯根膜細胞の骨芽細胞分化誘導などを検討する必要がある。

3. 発表 (研究成果の発表)

Raju R, Oshima M, Inoue M, Morita T, Huijiao Y, Waskitho A, Baba O, Inoue M, Matsuka Y, Three-dimensional periodontal tissue regeneration using a bone-ligament complex cell sheet. *Scientific Reports*, 3;10 (1) :1656, 2020. doi : 10.1038/s41598-020-58222-0.