

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（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

歯科治療で歯が欠損した場合、入れ歯やブリッジが一般的であるが、インプラント治療には咀嚼能力が向上し、健康な歯を削る必要がなく、歯槽骨の減少を防ぐなどの多くの利点がある。これにより、インプラント治療は低栄養やオーラルフレイルの予防に効果的であると考えられている。一方インプラント治療には歯根膜がないためクッション性がなく、対合歯に負担がかかりやすく、免疫防御機構が働かないため感染に弱い欠点もある。特にインプラント周囲炎が発生すると、インプラント脱落や骨の吸収が起こり、入れ歯の装着が難しくなる可能性があり、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犬を用いた前臨床研究を行った。この結果、イヌを用いた研究により、歯根膜様組織の形成にはインプラント内部に歯髄細胞を注入する必要があることが明らかとなった。免疫染色と Real-Time PCR で Periostin の発現が確認され、少なくとも歯根膜に近い組織が形成されたと考えられた。一方、歯髄細胞を注入しない場合、膜の形成は見られず、通常のインプラント治療と同様の骨癒着が観察された。さらに、歯髄幹細胞を内部に移植したインプラント内部では、歯髄に近い組織が形成された。今後、適切な移植細胞数と薄切方法の検討が必要である。今後よりこの研究を続けて製品化することで、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方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った。

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）

(2021年4月～2022年12月)

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

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47万件の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で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

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 1×10^5 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、移植体を取り出し、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、移植体を取り出し、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)。
5. インプラント体をコーティングした。イヌ歯髄幹細胞を注入し、イヌ抜歯窩治癒モデルに移植した。28 日後、移植体を取り出し、インプラント周囲及び内部に付着した組織およびインプラント内部の軟組織を採取した。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 染色し、光学顕微鏡にて観察した (庵原)。
6. インプラント体をコーティングした。イヌ歯髄幹細胞を注入し、イヌ抜歯窩治癒モデルに移植した。28 日後、移植体を取り出し、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, TRHDE) の mRNA 発現を検討した (庵原)。

(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方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

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を明らかにした。
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 Tenascin-C の発現がみられた。マウス Syndecan 3 や Tenascin-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。
5. イヌ抜歯窩治癒に歯根膜誘導インプラントを移植したモデルの形態学的解析において、細胞をインプラント内部に注入したものは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。一方、細胞を使用しなかった場合は基質の形成はみられたが膜状の組織は形成されなかった。
6. イヌ抜歯窩治癒に歯根膜誘導インプラントを移植したモデル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は歯根膜マーカーである periostin や PLAP-1 の発現が高くみられ、歯髄マーカーである Syndecan 3 や TRHDE はあまり発現していなかった。一方で、歯髄様インプラント内部組織は歯髄マーカーである Syndecan 3 や TRHDE の発現が高くみられ、歯根膜マーカーである periostin や PLAP-1 はあまり発現していなかった。

D. 考察と結論

in vitro の結果から、最適濃度が明らかになった。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。一方、イヌを用いてヒトに

近い形でインプラントを移植したところ、歯根膜に似た膜状組織が、コーティングしていないインプラントでも、内部に歯髄細胞を注入することで形成された。この組織を免疫染色すると、歯根膜のマーカである **Periostin** がインプラントと接する面で発現しており、**Real-Time PCR** においても同様に発現がみられたことから、少なくとも歯根膜に近い組織が形成されていると考えられる。一方、コーティングなしで歯髄幹細胞も移植していないインプラントでは、基質の形成は見られるものの、膜の形成はなく、この状態は通常のインプラント治療での骨癒着（オステオインテグレーション）と同様と考えられた。これにより、歯根膜様組織を形成するには、インプラント内部に歯髄細胞を移植する必要があることが明らかとなった。さらに、インプラント内部に軟組織が形成される現象は、歯髄幹細胞を注入したインプラントで観察された。この組織はインプラント周囲の軟組織とは異なり、正常な歯髄に近い様態を示した。これが歯髄であるかを **Real-Time PCR** にて確認すると、歯髄マーカ発現がみられたことから歯髄に近い組織が形成されたと考えられた。一方、コーティングや歯髄幹細胞を移植していないインプラント内部では、血餅が核となり骨様組織が形成されることが確認された。

今後、歯根膜様組織を形成させる適切な移植細胞数が検討する必要があることや、歯根膜様組織形成量の差を評価するために薄切方法を検討していく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021 年度

- 1) Zayed M, Iohara K, Watanabe, Ishikawa M, Tominaga M, Nakashima M.
Characterization of stable hypoxia-preconditioned dental pulp stem cells compared with mobilized dental pulp stem cells for application for pulp regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):302. doi: 10.1186/s13287-021-02240-w
- 2) Mae M, Alam MI, Yamashita Y, Ozaki Y, Higuchi K, Ziauddin SM, Montenegro Raudales JL, Sakai E, Tsukuba T, Yoshimura A. The Role of Cytokines Produced via the NLRP3 Inflammasome in Mouse Macrophages Stimulated with Dental Calculus in Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021. 18;22:12434.
- 3) Ziauddin SM, Alam MI, Mae M, Oohira M, Higuchi K, Yamashita Y, Ozaki Y, Yoshimura A. Cytotoxic effects of dental calculus particles and freeze-dried *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* on HSC-2 oral epithelial cells and THP-1 macrophages. *J Periodontol.* 2022 Jun;93:e92-e103

2022 年度

- 1) Zayed M, Iohara K. Age Related Senescence, Apoptosis, and Inflammation Profiles in Periodontal Ligament Cells from Canine Teeth. *Curr Mol Med* 2023;23(8):808-814.
- 2) Nakashima M, Fukuyama F, Iohara K. Pulp Regenerative Cell Therapy for Mature Molars: A Report of 2 Cases. *J Endod.* 2022;48(10):1334-1340.
- 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.

2023 年度

- 1) Iohara K, Tominaga M, Watanabe H, Nakashima M. Periapical bacterial disinfection is critical for dental pulp regenerative cell therapy in apical periodontitis in dogs. *Stem Cell Res Ther*, 2024; 15(1):17. doi: 10.1186/s13287-023-03628-6
- 2) Sakatoku S, Hayashi Y, Futenma T, Sugita Y, Ishizaka R, Nawa H, Iohara K. Periostin Is a Candidate Regulator of the Host Microenvironment in Regeneration of Pulp and Dentin Complex and Periodontal Ligament in Transplantation with Stem Cell-Conditioned Medium. *Stem Cells Int*, 2024 Feb 23;2024:7685280. doi: 10.1155/2024/7685280.

2. 学会発表

2021 年度

1. 国内講演

- 1) 庵原耕一郎 「歯髄再生治療の最近の進歩」 I T D Nインプラントフォーラム コロナ禍の骨免疫と歯髄幹細胞 2021年12月26日 ハイブリッド開催（東京&WEB）

2. 国内シンポジウム

- 1) Koichiro Iohara 「Recent Progress of Pulp Regenerative Therapy with Dental Pulp Stem Cells for the Application to the Periapical Disease in the Aged.」 第69回国際歯科研究学会(JADR)日本部会総会・学術大会 シンポジウム 2021年10月25日 ハイブリッド開催（福岡&WEB）
- 2) 庵原耕一郎、大平猛、Ziauddin SM、富永三千代、中島美砂子「高齢者および根尖性歯周炎への歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療の最近の進歩 —プラス帯電性ナノバブルの治療への応用—」 日本マイクロ・ナノバブル学会 第9回学会総会 シンポジウム 2021年12月12日 WEB開催
- 3) 庵原 耕一郎「虫歯から歯を蘇らせる歯髄細胞 Padによる新規象牙質再生」 第21回日本再生医療学会総会 共催学術セミナー WEB開催 2022年3月18日

3. 国際シンポジウム

- 1) Koichiro Iohara 「Recent Progress of Pulp Regenerative Therapy with Dental Pulp Stem Cells for the Application to the Periapical Disease in the Aged.」 NCGG—I TRI Joint Symposium 2022 WEB開催 2022年2月14日

4. 国内学会発表

- 1) 庵原耕一郎、Ziauddin SM、富永三千代、中島美砂子「感染根管歯の歯髄再生における根尖孔外除菌の重要性」日本歯科保存学会 2021年度秋季学術大会（第155回）ポスター発表 2021年10月28日 WEB開催
- 2) Ziauddin SM、中島美砂子、富永三千代、庵原耕一郎「イヌ同一個体における乳歯および永久歯歯髄幹細胞自家移植による歯髄再生能の比較」日本歯科保存学会 2021年度秋季学術大会（第155回）ポスター発表 2021年10月28日 WEB開催

2022年度

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. p 16-19. MARCH 2023.

2023 年度

1. 国内講演

- 1) 庵原耕一郎. 根尖性歯周炎における歯の延命のための歯髄再生治療. 第8回 NCGG サマーリサーチセミナー. 2023年8月24日. 国立長寿医療研究センター

2. 国内学会

- 1) 庵原耕一郎, 富永三千代, 中島美砂子. 根尖性歯周炎における歯髄再生治療を成功へ導く細菌検出法および移植時基準の検討. 第159回日本歯科保存学会. 2023年11月12日. 浜松.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明者：庵原耕一郎、中島美砂子
発明の名称：歯科用前処理材及び歯組織再生キット
出願番号：PCT/JP2017/13572
登録日：2020/6/2
登録国：米国
登録番号：10668134
- 2) 発明者：庵原耕一郎、中島美砂子、渡辺秀人
発明の名称：歯科用前処理材及び歯組織再生キット
出願番号：201780021649.3
国際出願番号：PCT/JP2017/013572
登録日：2021/10/15
登録国：中国
登録番号：ZL201780021649.3
- 3) 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

2021年度

日本歯科保存学会 優秀論文賞 受賞

歯内療法学分野（松風優秀論文賞）

庵原耕一郎、中島美砂子

「難治性根尖性歯周炎における抗菌ナノパーティクル含有ナノバブル水による根管除菌効果の検討」

日本歯科保存学雑誌 2020年 第63巻 第1号 p. 73-82