

新規生体材料ハニカムTCPを用いた細胞外微小環境再現による象牙質再生

稲田靖則¹⁾、高島清文¹⁾、辻極秀次^{1,2)}、河合穂高¹⁾、中野敬介¹⁾、長塚 仁¹⁾
¹⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病理学分野
²⁾岡山理科大学 理学部臨床生命科学科 組織病態学分野



Introduction

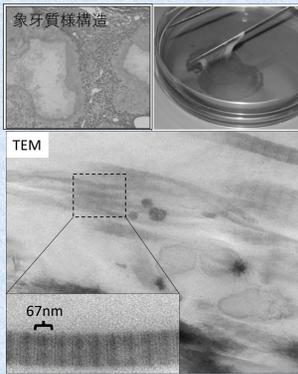
歯の再生研究は細胞供給源などの制約が多く、依然として実用化は困難であり、**全く新しい視点からのアプローチする新規再生法の確立が望まれている。**

現在までに我々は、**①歯髄から採取した生体内外で象牙芽細胞への分化傾向を示す象牙芽細胞株樹立に成功している。**

さらに、**②直線的貫通孔をハニカム状に配列したハニカムTCPを開発し、その孔径を変化させることで骨・軟骨組織を特異的に誘導することに成功している。**

そこで、本研究では**ハニカムTCPの形状を変化させることで、象牙芽細胞株分化に最適な細胞外微小環境を再現し、生体内に類似した構造を有する象牙質の再生**を検討した。

①樹立した象牙芽細胞株



GFPラット下顎第一大臼歯から樹立

- 石灰化誘導するとシャーレ上でシート状の形態を示す
- 多量のコラーゲン基質産生
- カルシウム沈着やDSPP遺伝子を発現
- 電子顕微鏡(TEM)で基質小胞を核としたカルシウム結晶の沈着する像を認める

*In vivo, In vitro*の双方の条件下で象牙芽細胞の形質を示す細胞である。

現在の問題点

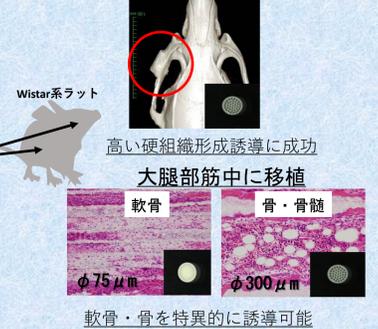
しかし、**生体内で生理的に機能する極性を有した象牙質の構造を付与するまでには至っていない。**

②ハニカムTCPと硬組織形成誘導

各種ハニカムTCP



頬骨欠損に移植



硬組織細胞分化誘導時における細胞外微小環境の重要性に着目し、**直線的貫通孔をハニカム状に配列した新規生体材料ハニカムTCPを開発。**このハニカムTCPの貫通孔を変化させることで硬組織形成微小環境を再現し、**軟骨・骨組織を特異的に誘導することに成功している。**

Materials and Methods

①樹立した象牙芽細胞株 ②ハニカムTCP

研究概要と目的

樹立した象牙芽細胞株に象牙細管構造を模したハニカムTCPで細胞外微小環境を付与することで、**高度な極性と象牙芽細胞突起を有する象牙質を誘導することを目的とする。**

生体内に類似した高度な極性を有した象牙質構造を誘導する**最適なハニカムTCPの幾何学構造(孔径)**を検討する。

実験方法

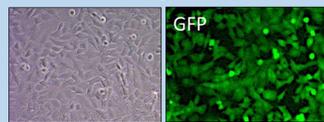
- 樹立した象牙芽細胞株の象牙質への分化を確認 →(RESULT①)
- 石灰化培地で培養した象牙芽細胞株を、様々な孔径を有するハニカムTCPと共に、マウス背部皮下に異所性移植 →(RESULT②)
- 異所性において最も象牙質形成を認めた孔径のハニカムTCPをマウス大腿部骨欠損に同所性移植 →(RESULT③)

象牙芽細胞株の樹立

6週齢 GFP トランスジェニック ラットの臼歯から歯髄を採取

1 mg/ml collagenase + 1 mg/ml Dispase 溶液で37℃ 2時間処理。

細胞懸濁液をシャーレで培養



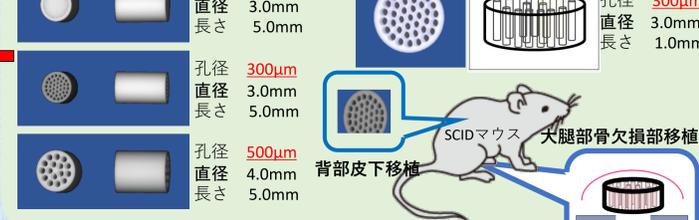
評価項目

- 象牙芽細胞株を石灰化培地で培養し、アリザリンレッド染色
 - 象牙芽細胞株を石灰化培地、TGF-βで培養し、ALP assay
 - 象牙芽細胞株を石灰化培地で培養し、RT-PCR (DSPP, DMP-1)
 - In vivo実験: 石灰化培地およびTGF-βで24時間培養し、SCIDマウスに移植
- Result① (ALP assay, RT-PCR)
 Result②and③ (Histology, GFP immunostaining, DSP immunostaining)

ハニカムTCP

異所性実験(背部皮下)に使用: 孔径 75µm, 300µm, 500µm; 直径 3.0mm, 長さ 5.0mm

同所性実験(大腿部骨欠損)に使用: 孔径 300µm; 直径 3.0mm, 長さ 1.0mm

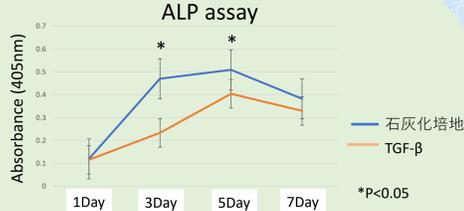
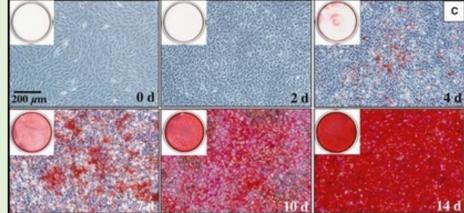


石灰化培地: アスコルビン酸 50µg/ml, β-GP 5mM
 or TGF-β
 D-MEM, supplemented with 10% FBS

Results

Result① 象牙芽細胞株の分化

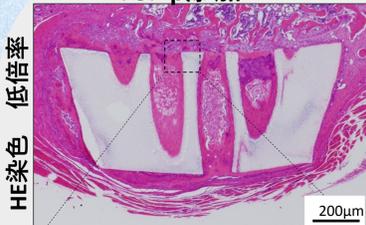
アリザリンレッド染色



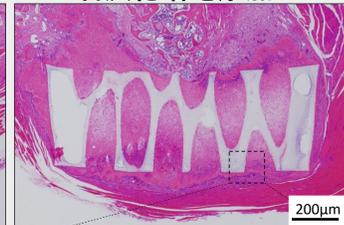
- 象牙芽細胞株は石灰化培地培養により、経時的にアリザリンレッド染色に強く染色された。
- 象牙芽細胞株を石灰化培地、TGF-β添加培地で培養時のALP活性は、石灰化培地の方がTGF-β添加培地と比較して有意に高かった。
- 石灰化培地での培養において、RT-PCRでDSPPの検出されなかった。DMP-1は石灰化培地による培養では検出された。In vivoではTCPを添加するとDSPPが検出された。

Result③ 同所性移植実験

TGF-β添加



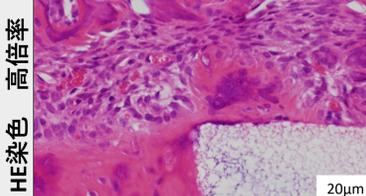
石灰化培地添加



Result②より、**孔径300µmのTCPを用いた場合に、極性を有する象牙質様構造を認めた。**

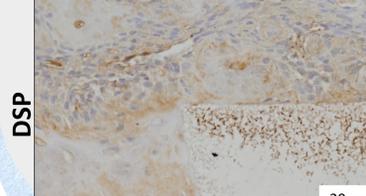
同所性移植実験では**孔径300µmのTCPを用いた。**

低倍率



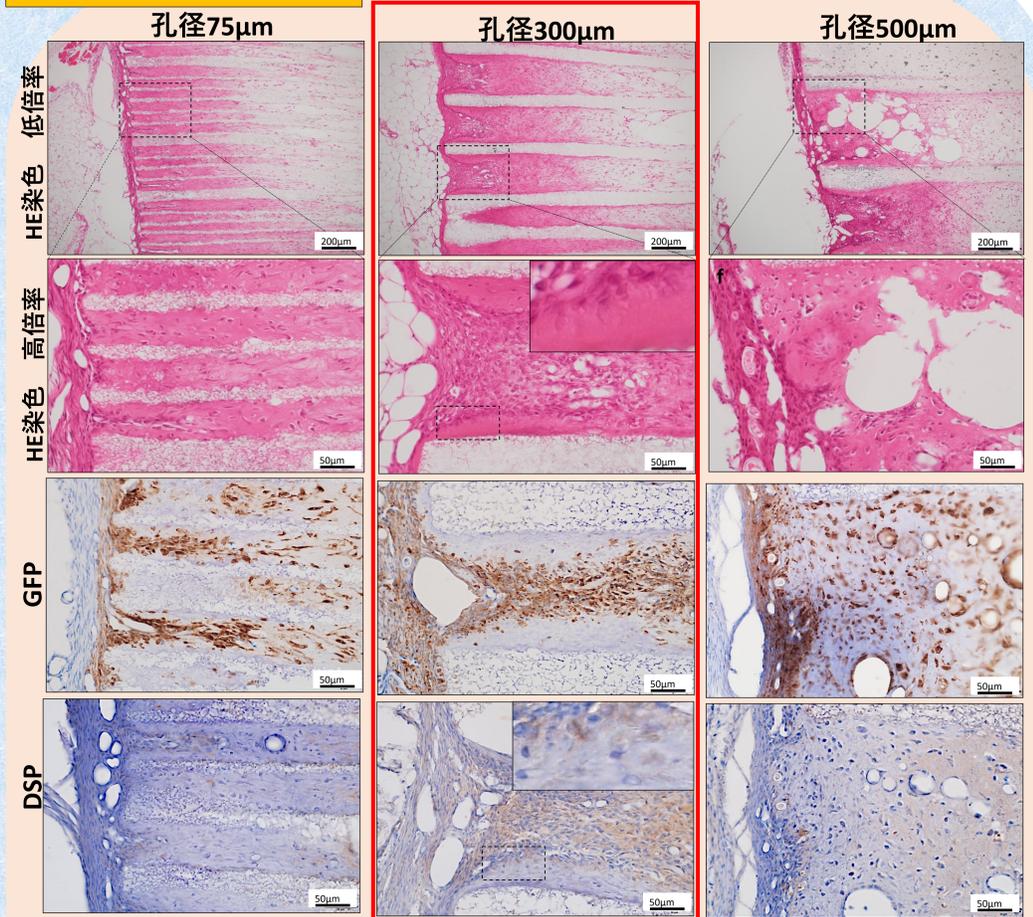
象牙芽細胞株はTGF-β培地で培養した場合、TCP内に硬組織形成を認めるが、極性を有した象牙質様構造は認めなかった。
 象牙芽細胞株は石灰化培地に添加すると、**生体内に類似した極性を有する象牙質様構造を認める硬組織形成を認めた。**

高倍率



石灰化培地で培養した象牙芽細胞株では、生体内に類似した極性を有する象牙質様構造において**DSP免疫染色が陽性を示した。**

Result② 異所性移植実験



- 孔径75, 500µmのTCPで、DSP陽性を示す硬組織がTCPの壁に添加する様に形成されているのが観察された。しかし、これらの硬組織は生体内に存在する象牙質の様な極性は有していなかった。
- 孔径300µmのTCPでは、TCPの壁に添加する様に極性を有する象牙質様硬組織形成を認めた。**象牙質様硬組織はDSP陽性を示した。
- 象牙質様構造ではGFP陽性であるため、移植した象牙芽細胞株由来と考えられた。

Conclusion

正常ラット象牙質 vs ハニカムTCPによる誘導

ハニカムTCPの形状を変化させることにより、象牙芽細胞株を生体内に類似した高度な極性を有する象牙質へ分化誘導が可能であることが示唆された。