

噛みごたえを求め歯根膜幹細胞を組み込んだ次世代型人工歯の開発

大久保 直登 [北海道大学薬学部臨床病態解析学／博士研究員]

赤澤 敏之 [北海道立総合研究機構産業技術研究本部工業試験場／材料技術部研究主幹]

宮崎 聡 [井原水産株式会社札幌支社加工部コーゲン製造課／課長]

武田 宏司 [北海道大学薬学部臨床病態解析学／教授]

北川 善政 [北海道大学大学院歯学研究科口腔診断内科学教室／教授]

中川 宏治 [北海道大学薬学部臨床病態解析学／講師]

背景・目的

食欲とは3大欲求のひとつであり、食を楽しむことは人生を豊かにすることに直結する。しかし近年、高齢化が進むに伴い多数の歯を失うことで噛むことができず、同時に食感を味わうという食の楽しみを奪われる人が増加している。これに対し、現在のインプラント治療は直接チタンを歯槽骨に結合させるため歯根膜組織が介在しない噛む感覚(食感)がない人工歯となる。そこで本研究では、歯根膜組織を介在させた食感を伴う次世代型インプラントとしてチタン表面を歯根膜幹細胞でコートし歯根膜を再生させた、天然歯に近い人工歯の開発を目的とした。

内容・方法

①ヒト由来の再生能力の高い良質な歯根膜幹細胞を濃縮する技術の開発

我々の研究グループではこれまでに歯根膜由来幹細胞の多分化能力の検証を行ってきた。この基盤を活かし、拔牙が必要となった患者さんの本来廃棄すべき歯より少量の歯根膜組織を採取し、よりシンプルに再現性よく細胞を増殖させる方法の検討を行う。加えて、増殖させた細胞に対して既に選定済みの幹細胞候補マーカーなどを指標にその幹細胞性を評価し、歯根膜幹細胞分画をより効率的に増殖させる技術を確認させる。

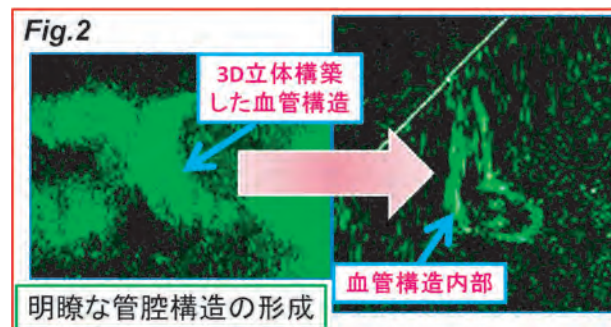
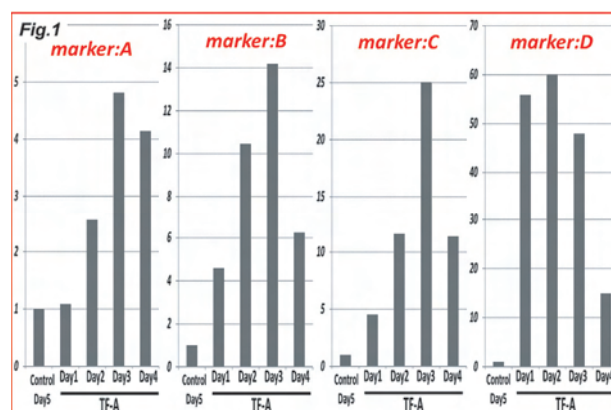
②細胞接着性に乏しい金属チタン上に細胞を定着させるコート技術の最適化

金属チタンと細胞との接着性を向上させるためチタン表面に細胞の足場となるコラーゲンをコートする革新的な技術が、共同研究者の赤澤博士により開発・報告されている。この技術を利用し、①の実験と並行して既に樹立済みの Rat 由来歯根膜幹細胞を用いてチタン金属上での培養を行い、電子顕微鏡などを用いてチタン表面へのより最適な接着条件を検討する。

結果・成果

①ヒト由来の再生能力の高い良質な歯根膜幹細胞を濃縮する技術の開発

本開発研究を成功させるための最も重要な要因が本項目であり、『如何に天然の歯根膜組織に近い生理活性を有した細胞画分を in vitro 培養系で抽出・濃縮することができるか』がポイントとなる。我々の研究グループではこれまでに歯根膜組織中に存在する幹細胞が組織再生の際に最も重要な血管組織を構築する能力を有することを見出した。この幹細胞の網羅的遺伝子発現解析により血管新生において重要な役割を果たす可能性が示唆された、ある『転写因子 A (Transcription Factor A: 以後 TF-A と略)』に着目した。この TF-A のアデノウイルスベクターを作成し、歯根膜幹細胞へ外来性に過剰発現させたところ、癌幹細胞・組織幹細胞の維持に非常に重要な表面抗原マーカーである marker: A、B、C、D の発現が継時的に優位に上昇することを m-RNA レベルで確認した(Fig.1)。また、今回の採択により購入した『キーエンス HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 追加機器リアルタイム3D モジュール(BZ-H1R)』を用いた3次元立体画像構築解析(Fig.2)により、TF-A 過剰発現群では血管形成においてコントロール群と比較し、優位に血管径の太さが向上していることが判明した。加えて新生血管の安定性(抗アポトーシス作用)の向上(time lapse; data not shown)にも寄与することが判明した。



②細胞接着性に乏しい金属チタン上に細胞を定着させるコート技術の最適化

共同研究者の宮崎聡先生の御協力のもと、耐熱性サーモンコラーゲンと通常用いる動物性コラーゲンでそれ

ぞれコートした培養ディッシュを準備し、歯根膜幹細胞の培養を行った。Fig.3に、培養10日後の細胞の形態を示す。動物性コラーゲンと比較して非常に類似した細胞形態を示しており、細胞増殖率にも大きな変化は認められなかった。さらに、通常であれば海洋性コラーゲンは37℃のインキュベーターによって24時間以内に溶解してしまうが、耐熱性処理を行うことで10日間培養してもコラーゲンは溶解せずにその形状を保持していた。総じて、生体内に適應することを考慮に入れても遜色がないものと考えられた。

チタン金属と歯根膜幹細胞との接着性を向上させるため、共同研究者の赤澤敏行先生の御協力のもとエレクトロスピニング法(ES法)を応用したチタン基材上への海洋性サーモンコラーゲン(非耐熱性)・ハイドロキシアパタイト複合体のコーティング(HA-C/Ti)を行い、Rat由来歯根膜幹細胞のチタン基材との接着性の評価実験を行った。Fig.4に、24時間培養したRat-PDL細胞のSEMによる微細構造を示す。細胞形態は、Ti単体で平面組織であるのに対し、HA-C/Tiで多量のリン酸カルシウム析出物上に三次元的な膨潤組織が観察される。TiよりHA-C/Tiの方が細胞数は多く細胞サイズが大きくなったことから、細胞活性に対するTi基材上HA-C複合化の優位性が示唆された。

今後の展望

歯根膜幹細胞の制御においてTF-A(転写因子A)が重要な役割を果たす可能性を網羅的遺伝子発現解析により明らかとした。さらに、このTF-Aを過剰発現させることで優位に発現が上昇する複数の表面抗原幹細胞マーカーが判明した。これらの成果により、複数の表面抗原幹細胞マーカーの組み合わせによるより質の高い幹細胞画分のsortingによる濃縮法を確立するための準備が整ったため、①の解析は今後加速度的に進むことが期待される。②に関しては、Fig.4に示したように非耐熱処理サーモンコラーゲンを用いた解析で良好な結果が得られた。今後はFig.3で良好な結果を伴った耐熱性コラーゲンをES法によりコートしたHA-C/Tiに対する紫根各幹細胞の接着性解析を行う等、開発研究の成功に必要な課題をスピード感を持って進行していく予定としている。

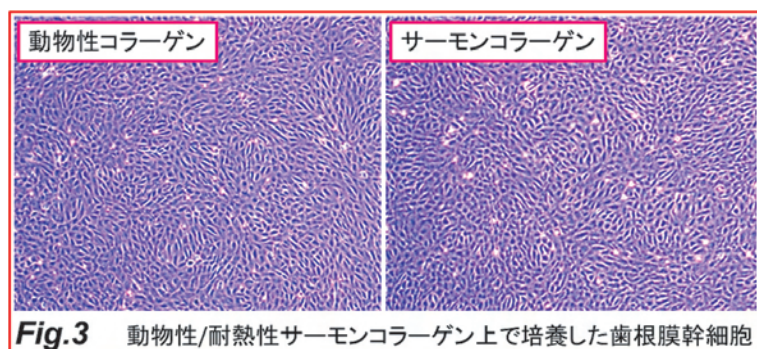
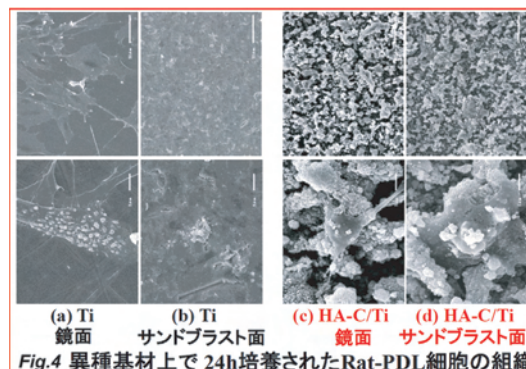


Fig.3 動物性/耐熱性サーモンコラーゲン上で培養した歯根膜幹細胞



(a) Ti 鏡面 (b) Ti サンドブラスト面 (c) HA-C/Ti 鏡面 (d) HA-C/Ti サンドブラスト面
Fig.4 異種基材上で24h培養されたRat-PDL細胞の組織