

歯髄組織再生を促進するケイ素化合物構造の探索

九州工業大学 大学院工学研究院 城崎由紀

Investigation of Silicon Compound Structures to Promote Pulp Regeneration

Yuki Shirosaki

Faculty of Engineering, Kyushu Institute of Technology

本研究は、歯髄再生用足場材料として、キトサン-シロキサン-グリセリン酸複合体ヒドロゲルの有効性を検討したものである。特に、将来的な応用可能性が高いトリメトキシシランアルデヒド (TMSA) 添加系に着目し、ゲル特性と骨芽細胞様細胞 MG63 への応答を評価した。TMSA 添加量の増加に伴い、ゲル化時間は短縮され、モル比 1.0 では約 15 分でゲル化した。また、破断強度の向上や XPS 分析から、シッフ塩基形成およびシロキサン結合増加による緻密なゲル骨格形成が示唆された。また、TMSA 添加量が多いほど Si(IV) の溶出量は増加した。細胞培養試験では、TMSA 高添加ヒドロゲル表面で MG63 細胞の接着・増殖が顕著に促進され、正常な細胞形態も維持された。一方、溶出物存在下では全体として増殖抑制がみられたが、TMSA 由来成分はその抑制を緩和した。以上より、TMSA 添加キトサンヒドロゲルは、迅速なゲル化、構造安定性、ならびに細胞増殖促進能を兼ね備え、歯髄再生足場材料として有望であることが示された。

This study investigates the potential of a chitosan-siloxane-glycerophosphate composite hydrogel as a scaffold material for dental pulp regeneration. In particular, systems incorporating trimethoxysilane aldehyde (TMSA), which showed promising applicability, were examined in terms of gel properties and responses of osteoblast-like MG63 cells. As the TMSA content increased, the gelation time decreased, reaching approximately 15 minutes at a molar ratio of 1.0. Mechanical testing and XPS analysis suggested that the formation of Schiff bases and increased siloxane bonding led to a denser gel network and enhanced fracture strength. Additionally, higher TMSA content resulted in increased release of Si(IV) ions. Cell culture experiments revealed that hydrogels with high TMSA content significantly promoted the adhesion and proliferation of MG63 cells, while maintaining normal cell morphology. Although overall cell proliferation was suppressed in the presence of hydrogel extracts compared to standard culture conditions, TMSA-derived components mitigated this inhibitory effect. These findings suggest that chitosan hydrogels containing TMSA exhibit rapid gelation, structural stability, and the ability to enhance cell proliferation, indicating their potential as scaffold materials for dental pulp regeneration.

1. はじめに

歯髄とは歯の内部にある象牙質に囲まれた神経組織のことで、神経と無数の毛細血管から成る。虫歯が歯髄まで達すると、歯が顎骨に膿みを形成する。このように歯根深部まで歯に浸食されると、歯髄を取り除き（抜髄）、薬剤で封鎖する根幹治療が行われる。しかし、歯髄中の毛細血管は歯に栄養と酸素を供給するため、歯髄を取り除くとそれらの供給源が絶たれ、歯は変色し、歯自身が脆くなる。歯科分野において歯髄再生は高い期待の下、活発に研究されている。歯髄幹細胞を用いる研究が中心であるが、細胞の単離や管理など臨床応用にはまだ多くの検討が必要である。

ケイ素 (Si) は、Carlisle らによって¹⁾、我々の体内に可溶性のケイ酸の形で通常約 0.5 mg/L 含まれていることが報告されている。特に骨や腱といった結合性組織に多く存在していることもわかっている。そのため、骨置換を目的とした生体活性シリケートガラ

ス (バイオガラス) やケイ素含有ヒドロキシアパタイトを用いた研究によって, その骨組織再生に係る作用が明らかにされてきた²⁾。一連の研究成果より, オルトケイ酸イオンによる次のような骨形成機構が提唱されている。(1) オルトケイ酸 (イオン) は, ナトリウム重炭酸共輸送体 (NBC-1) を経由して骨芽細胞に取り込まれる。(2) 取り込まれたオルトケイ酸が遺伝子に直接作用し, ラント関連転写因子 2 (RUNX2) の発現を抑制して骨芽細胞の増殖は抑制し, 骨細胞への分化を促進する。一方, 同様にケイ素を含む直径 50~20 nm 程度のシリカナノ粒子は, エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考えられている³⁾。この場合は, シリカが細胞内で各種障害を引き起こし, 細胞死を誘導する。

申請者らのグループは, ケイ素周囲の構造に着目し, ケイ素周囲に炭素を 1 つ, 酸素を 3 つ有する 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS), ケイ素周囲に炭素を 2 つ, 酸素を 2 つ有する 3-グリシドキシプロピルジメトメトキシシラン (GPDMS) とケイ素周囲すべてが酸素のテトラエトキシシラン (TEOS) を含むキトサン複合体の構造が, 骨芽細胞の働きや各組織の応答性に, 異なる影響を与えることを明らかにしてきた⁴⁾。さらに, 飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) を用いて, 複合体による培地中の分解物の構造を決定した (科研費 19H04471)。GPTMS および GPDMS 由来の分解物の主な分子量は 200 で, TEOS 由来の分解物では 100 以下であった。特に TEOS 由来の分解物は 50 μ M 以上で, 骨芽細胞の増殖を抑制すること分かった。以上のことから, TEOS 由来の分解物はケイ酸イオンの構造に近く, イオンチャンネルから取り込まれる機構と同じ経路を辿ると考えられ, キトサン-GPTMS-TEOS 複合体からの溶出物が骨芽細胞の活性を促進した結果の説明となり得る。しかし, イオンチャンネルから取り込まれない分子量の GPTMS および GPDMS 由来のケイ素を含む分解物が, どのように細胞を刺激し増殖を促進させるのかははっきりしていない。

本申請課題では, 異なるケイ素種を用いてキトサン-シロキサン-グリセロリン酸複合体ヒドロゲルを作製し, ゲル特性と骨芽細胞への応答性を調べ, 歯髄組織再生足場材料としての可能性を検討した。本成果報告では, 事前調査によりゲル化時間が最も短縮されたことから, 将来的に歯髄足場材料として応用の可能性が高いと考えられる, トリメトキシシランアルデヒド (TMSA) の系に関する結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 ヒドロゲルの作製

β -グリセロリン酸 (GP) を量り取り, 超純水に溶解させ, 1.0 M の GP 水溶液を得た。キトサン塩酸塩 ($\text{CS} \cdot \text{HCl}$) を量り取り, 超純水に溶解させ 4 (w/v) % の $\text{CS} \cdot \text{HCl}$ 水溶液を得た。トリメトキシシランアルデヒド (TMSA) を 1 分子の $\text{CS} \cdot \text{HCl}$ に対してモル比が $\text{CS} \cdot \text{HCl} : \text{TMSA} = 1:0.1, 1:0.075, 1:0.05, 1:0.025, 1:0$ となるように $\text{CS} \cdot \text{HCl}$ 水溶液に添加して室温で 1 時間攪拌し, $\text{CS} \cdot \text{HCl}/\text{TMSA}$ 溶液を作製した。得られた溶液は全てシリンジフィルター (孔径 0.22 μm) を用いて濾過滅菌した。滅菌した溶液は 4°C に設定した冷蔵庫に 2 時間静置した。 $\text{CS} \cdot \text{HCl}/\text{TMSA}$ 溶液に GP 水溶液を体積比 1:1 となるよう加えた。ペンシルミキサーを用いてこの溶液を 30 秒間攪拌し, 最終溶液を得た。最終溶液をモールド内に所定量分注した。分注した最終溶液を 37°C に設定した送風定温恒温器内に 1 日静置し, ゲル化させた。

2.2 ヒドロゲルの特性評価

2.1 で作製した最終溶液 1 mL をマイクロチューブ内に入れ, 37°C に設定した送風定温恒温器に静置し, 目視観察によりゲル化時間を決定した。ゲル化時間はチューブを 45°傾けて液面が動かなくなる時間と定義した。作製したヒドロゲルの圧縮強度はクリープメータ (侵入速度は 0.5 mm/sec, 格納ピッチ 0.01 sec) を用いて測定した。凍結乾燥したヒド

ロゲルをメノウ乳鉢で粉碎し、XPS 測定用粉末試料を得た。光電子分光分析装置 (XPS, 光源 AlK α 線, Pass Energy 20 eV, 出力 150 W, 帯電中和銃有) を用いて表面分析した。得られたスペクトルは C_{1s} の結合エネルギーが 284.6 eV 付近のピークを C-C/C-H とし、そのピークが 284.6 eV となるように補正した。ピーク分離はガウス関数 (70%), ローレンツ関数 (30%) の混合関数を用いた。ヒドロゲルに超純水を 0.5 mL 加え、37°C に設定した恒温槽中で 3 日間静置した。上澄み溶液を回収し、ICP 発光分光分析装置で Si (IV) および P (V) 濃度を測定した。

2.3 ヒドロゲル表面およびヒドロゲル存在下での骨芽細胞様細胞の培養

2.1 で作製した最終溶液を 24 ウェルプレート内に 200 μ L ずつ分注して作製したヒドロゲルに D-MEM (+) を 0.5 mL を加え、CO₂ インキュベータ (37°C, CO₂ 濃度 5%) 内で 1 日静置させた。1.0 $\times$ 10⁴ cells/cm² となるように骨芽細胞様細胞 MG63 の細胞懸濁液を作製した。この細胞懸濁液を 24 ウェルプレートに 0.5 mL ずつ播種した。その後、CO₂ インキュベータ内で所定期間培養した。また、最終溶液を 24 ウェル細胞培養用インサートに 300 μ L ずつ分注し、CO₂ インキュベータ内に 1 日間静置し、ゲル化させた。作製したヒドロゲルに D-MEM(+) を 0.5 mL を加え、CO₂ インキュベータ内で 1 日静置させた。骨芽細胞様細胞 MG63 の細胞懸濁液を 24 ウェル細胞培養用インサートウェルプレートに 0.5 mL ずつ播種した。その後、CO₂ インキュベータ内で所定期間培養した。

2.4 細胞評価

所定期間培養後、PBS (pH 7.4) で細胞表面を洗浄し、Calcein/EthD-1 溶液 (PBS 1 mL あたり Calcein :0.5 μ L, EthD-1 : 2 μ L) を各ウェルに 100 μ L ずつ添加した。CO₂ インキュベータ内に 30 分間静置した後、PBS (pH 7.4) で洗浄した。染色した細胞を倒立型リサーチ顕微鏡 (生細胞 : U-FBNA GFP, 死細胞 : U-FGW RFP) で観察した。画像内の Calcein によって緑色に染色された細胞 (生細胞) および EthD-1 によって赤色に染色された細胞 (死細胞) 数を計測し、細胞の形態を観察した。インサートを用いた培養では、所定期間培養後、3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド溶液 (MTT, 5 mg/mL) を 50 μ L ずつ加えた。37°C, 5% CO₂ で 4 時間静置した後、上清を取り除いた。ジメチルスルホキシドを 200 μ L ずつ加え、試料溶液を得た。多機能型マイクロプレートリーダーを用いて 560 nm の吸光度を測定し、生存細胞を評価した。

3. 結果と考察

37°C におけるヒドロゲルのゲル化時間は TMSA の添加量が多くなるほど短縮され、TMSA のモル比が 1.0 の時に約 15 分であった。これは、CS $\cdot$ HCl のアミノ基と TMSA のアルデヒド基の間で形成されるシッフ塩基と加水分解されて形成した TMSA のシラノール基の縮合反応で形成するシロキサン結合によってゲル骨格の形成が促進されていると考えられる。TMSA を添加したヒドロゲルの応力-歪み曲線における弾性領域ほぼ直線状を示した。これより、得られたヒドロゲルは粘性の低い弾性体であると考えられる。また、TMSA を添加したヒドロゲルの破断強度は添加していないヒドロゲルよりも高い値を示した。これは、TMSA によって形成されたより緻密なゲル骨格構造によるものと考えられる。

XPS 測定の結果より、TMSA 添加量の増加に伴い、シラノール基由来のピーク面積比が減少し、シロキサン結合のピーク面積比が増大したことが分かった。これより、TMSA 添加量の増加に伴い、より多くのシロキサン結合を形成していると考えられる。また、ゲル内に形成されるシロキサン結合の増加によって、緻密なヒドロゲルを形成していると考えられる。さらに、TMSA の添加に伴い、C=O に帰属されるピーク面積比が増大した。このピークは CS $\cdot$ HCl 中に含まれる脱アセチル化されていないキチンの-NCO 基もしくは

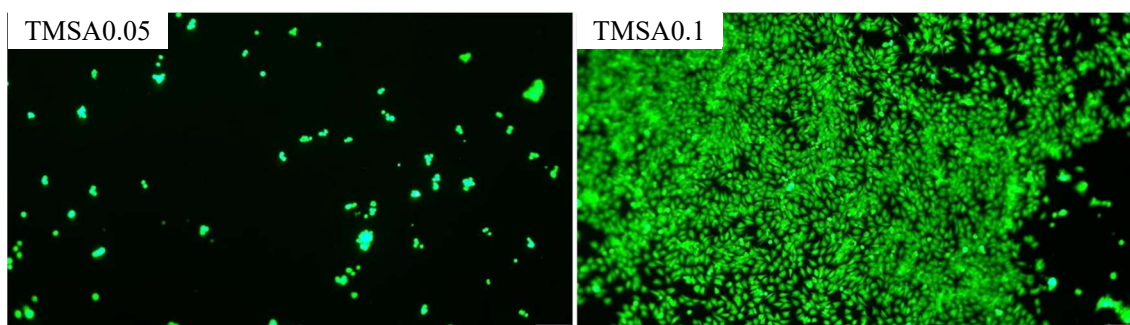


図1 ハイドロゲル表面で培養した MG63 細胞（生細胞）の蛍光顕微鏡像

は TMSA のアルデヒド基由来であると考えられ、ゲル内部での TMSA の存在を示している。TMSA 添加量が増加すると、C=O に帰属されるピークが約 1 eV 高エネルギー側にシフトしている。この高エネルギー側へのシフトは炭素の正の帯電量の増加によって起こるため、TMSA 由来の C=O 結合を持つ炭素が増えたと考えられる。TMSA 添加量を増加させると、上澄み中の Si (IV) 濃度は増加したが、P(V)は変化しなかった。

ヒドロゲル表面で培養した MG63 細胞は、TMSA のモル比が 1.0 のとき、顕著に生細胞数を増加させた（図 1）。TMSA を添加していないヒドロゲル表面では、生細胞数は培養 1 日目で 2109 ± 275 個、TMSA 添加量が少ないヒドロゲル表面でもほぼ同等の値を示した。一方で、TMSA のモル比が 1.0 のヒドロゲル表面では、培養 1 日目で 4460 ± 2118 個、培養 3 日目で 19110 ± 2804 個であった。TMSA の添加が、ヒドロゲル表面への初期接着だけでなく、増殖も促しているといえる。また増殖した細胞は、仮足を有した正常な形態でヒドロゲル表面全面に増殖していた。

ヒドロゲル溶出物存在下で MG63 細胞を培養した結果では（図 2）、溶出物が存在する条件下では通常培地よりも MG63 細胞の増殖が抑制された。しかし、TMSA の添加量が多いほど、つまり培地中への Si(IV)濃度が高いほど、その増殖抑制作用は緩和された。これより、キトサン由来の溶出物は MG63 細胞の接着や増殖を抑制するが、TMSA 由来の溶出成分は MG63 細胞の増殖を促進する作用があることが示唆された。培養 3 日目において、Si (IV) の溶出量は他の組成よりも高く、 $6.9 \mu\text{M}$ 溶出しており、この溶出した成分が MG63 細胞の増殖を促進したと予想できる。

TMSA 添加量の多いヒドロゲル表面は緻密であり、培養期間中も培地中でその表面構造が安定している。また、増殖抑制を緩和する TMSA 由来の溶出成分も多いため、他の組成と比較して MG63 細胞の接着・増殖に対して良好な環境を維持していると予想できる。以上のことから、キトサンヒドロゲルのゲル化時間を短縮し、その構造を生体内環境下で維持したまま、TMSA 由来の溶出物によって骨芽細胞の増殖を促進することが分かった。

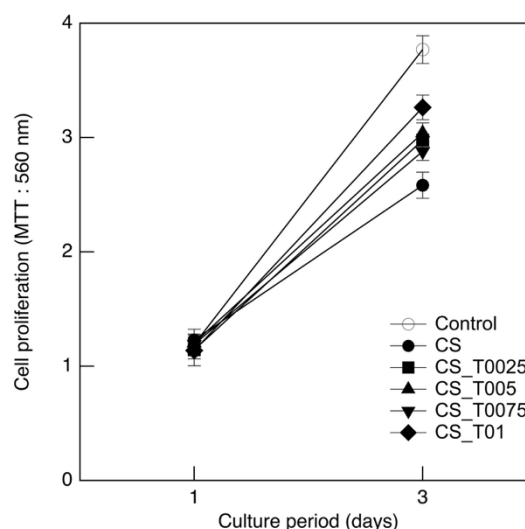


図2 ハイドロゲル溶出物存在下で培養した MG63 細胞の細胞増殖挙動

4. 結論

TMSA を添加したキトサンヒドロゲルは、ゲル化時間の短縮と機械的強度の向上を示した。また、シロキサン結合の増加により、緻密で安定なゲル構造が形成された。TMSA 由来の Si 成分の溶出は、骨芽細胞様細胞の増殖促進に寄与し、ヒドロゲル表面では細胞

の接着および増殖が顕著に向上した。以上より、本ヒドロゲルは歯髄再生用足場材料として有望であると考えられ、今後は歯髄由来細胞等を用いた検討を進めていく。

5. 謝辞

本研究は、公益財団法人日本板硝子材料工学助成会の令和5年度（第45回）研究助成を受けておこなったものである。同助成会に心より感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) E.M. Carlisle, Science of the Total Environment, 73, 95-106 (1988).
- 2) L.L. Hench, Journal of the European Ceramic Society, 29[7], 1257-1265 (2009).
- 3) Zhou, *et al.*, Acta Biomaterialia, 39, 192-202 (2016).
- 4) Hattori *et al.*, J. Sol-Gel Sci. Technol., 4[3], 606-616 (2022).