

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15725

研究課題名(和文) M2マクロファージの修復象牙質形成への関与と新規歯髄再生療法の開発

研究課題名(英文) Role of M2 macrophages in reparative dentin formation and development of new endodontic regenerative treatment

研究代表者

中村 浩彰 (NAKAMURA, Hiroaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50227930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：修復象牙質形成過程におけるM2マクロファージと歯髄細胞との相互作用を明らかにするために、窩洞形成後のWnt関連タンパク質の局在を免疫組織化学的に行った。窩洞形成3日後に出現するマクロファージにWnt10aおよびGPR177陽性反応がみられ、7日後の修復象牙質細胞の核内にはβ-カテニン局在が認められた。以上のことから、修復象牙質形成過程にWnt古典経路が関与することが明らかになり、直接覆髄剤としてWntシグナルを活性化する新たな治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined immunohistochemical localization of Wnt signaling molecules in the process of reparative dentin formation after cavity preparation in order to clarify a role of M2 macrophages in the odontoblastic differentiation of pulp cells. At 3 days after cavity preparation, macrophages showed immunoreactivity for Wnt10a and GPR177. At 7 days, localization of β-catenin is seen in nucleus of odontoblasts contacting reparative dentin. These results indicate that canonical Wnt signal plays an important role in reparative dentin formation. Reagents activating canonical Wnt signal might be useful for new endodontic treatment.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：M2マクロファージ 歯髄 修復象牙質 Wntシグナル 免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えて歯をできる限り失わずに、咬合機能を終生にわたって維持することは Quality of Life (QOL)の向上に不可欠である。歯髄疾患により歯内療法を受けた失活歯は、生活歯にくらべて脆く、破折により歯を喪失することが多いことから、新たな歯髄保存療法の開発が望まれている。

我々は、歯髄組織には象牙質様硬組織と骨様硬組織を形成する能力をもつ未分化間葉細胞が存在すること、象牙芽細胞下層には間葉系幹細胞のマーカーの1つである CD90 陽性細胞が存在し、この細胞群は骨様硬組織形成能が高いことを明らかにしてきた。一方、歯髄組織には間葉系細胞に加えて樹状細胞やマクロファージなども存在するが、それらの細胞の役割については不明のままである。また、歯内療法で行われている直接覆髄法は歯髄細胞の組織修復力や再生力を利用したものであり、治癒過程において2つの現象が生じている。第一段階は、水酸化カルシウム製剤によるアルカリ環境が細胞死を引き起こし、マクロファージが死細胞の処理する過程で、第二段階は未分化間葉細胞が硬組織形成細胞に分化して Dentin Bridge を形成するという過程である。しかし、これらの2つの過程の相互関連については不明のままである。マクロファージは機能的に M1 と M2 の2種類が存在することが報告され、M1 マクロファージは感染時に働き、バクテリアやウイルスなどの病原体の排除に関わっている。一方、M2 マクロファージは組織常在型でアレルギー応答のほか、創傷治癒にも重要な役割を担っている。そこで、修復象牙質形成には歯髄の未分化間葉細胞と M2 マクロファージとの相互作用が重要なのではないかと仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

将来の歯科医療においては歯髄細胞の治癒力を促して硬組織を再生し、生活歯として維持する治療法の開発が必要である。歯髄には未分化間葉細胞が存在し、修復象牙質が形成される際には象牙芽細胞様細胞に分化することが知られている。これまで、未分化間葉細胞がどのような刺激を受けて硬組織形成細胞に分化するかについては、BMP などの内在性の成長因子が関与していると推測されてきた。近年、創傷治癒過程において組織常在型 M2 マクロファージが免疫反応を抑えて、治癒を促進することが報告されている。歯髄組織においても従来から樹状細胞が存在すること、窩洞形成時にマクロファージが侵入することが報告されているが、その機能は単に死んだ細胞や異物を処理する機能のみであると考えられてきた。我々は、過剰の刺激により象牙芽細胞や歯髄細胞が死に至ると、組織常在型 M2 マクロファージが処理すると共に、組織再生に必要な生理活性物質を産生して歯髄の未分化間葉細胞を硬組織形成細胞へと分化させ、Dentin Bridge 形成へと導くのではないかと考えた。すなわち、マクロファージが積極的に歯髄の修復、硬組織再生に関与するという仮説である。本研究は組織修復に機能する M2 マクロファージに注目し、組織傷害後に生じる修復象牙質形成に M2 マクロファージと歯髄の未分化間葉細胞との相互作用が重要であるという新しい概念に基づき、窩洞形成後の M2 マクロファージの動態と硬組織形成との関連性、マクロファージ由来生理活性物質の同定と臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 歯髄組織における M2 マクロファージ分布についての形態学的解析

ラット切歯および臼歯における M2 マクロファージの分布について CD163、

CD206 をマーカーとして検討した。また、樹状細胞マーカーである OX-6、マクロファージマーカーである CD68 発現についても検討し、M2 マクロファージ分布と比較した。

#### (2) ラット臼歯の窩洞形成実験によるマクロファージ由来生理活性物質の同定

修復象牙質形成における古典的 Wnt 経路の関与を明らかにするために、 $\beta$ -カテニン、Wnt10a、GPR177 (wntless)、CD68 に対する免疫組織化学的検討を行った。

#### (3) LPS 刺激によるマクロファージに発現 Wnt10a 発現についての in vitro 解析

ラット骨髄から骨髄細胞を採取し、M-CSF によりマクロファージを誘導した。得られたマクロファージに LPS 添加し、Wnt10a 発現について real-time PCR にて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 正常歯髄組織における M2 マクロファージの分布についての免疫組織化学的解析

歯髄組織における M2 マクロファージが修復象牙質形成に果たす役割について明らかにするために、M2 マクロファージのマーカーである抗 CD163、CD206 抗体を用いてラット歯髄における局在を免疫組織化学的に行った。しかし、パラフィン切片を用いた免疫染色で市販の抗 CD163 抗体、抗 CD206 抗体では歯髄組織、皮下組織、骨組織のいずれにおいても陽性細胞は検出できなかったため、組織切片で検出する免疫組織化学的検討には不適當と判断した。そこで、広範囲のマクロファージを認識する抗 CD68 抗体を用いることとした。

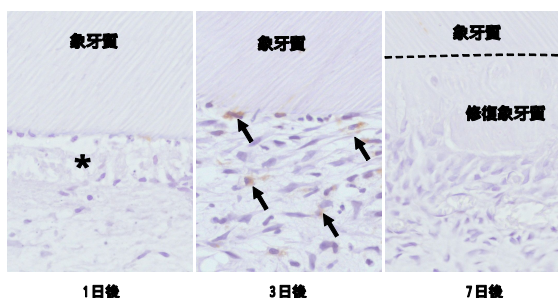
#### (2) 窩洞形成後の修復象牙質形成過程におけるマクロファージの役割についての解析

窩洞形成後の修復象牙質形成過程における M2 マクロファージの役割を明らかにするために、経時的に歯髄組織に出現する細胞および Wnt 関連タンパク質の局在を免疫組織化

学的に行った。正常な歯髄組織では CD68 陽性マクロファージは血管周囲にわずかに存在するのみであった。窩洞形成 1 日後には象牙芽細胞は壊死し、好中球が象牙質直下に認められた。3 日目には壊死領域に CD68 陽性マクロファージが出現し、7 日後には窩洞直下の象牙質下に修復象牙質形成が認められた。(図 1)

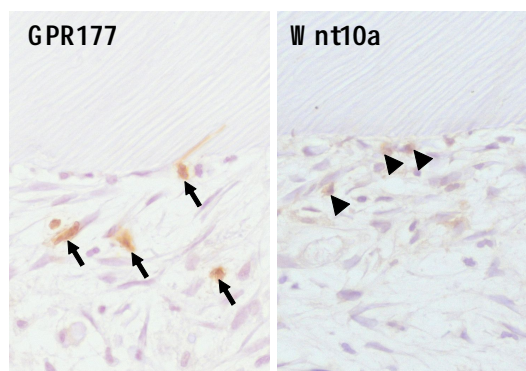
Wnt 関連タンパクの局在は 1 日後の好中球

図1 CD68陽性マクロファージの局在



が GPR177 陽性を示し、3 日後に出現するマクロファージは Wnt10a および GPR177 陽性を示した。(図 2) また、7 日後の修復象牙質直下の象牙芽細胞の核内には  $\beta$ -カテニン

図2 窩洞形成3日後のGPR177とWnt10aの局在



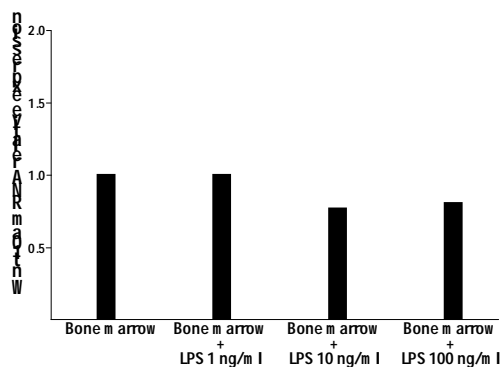
局在が認められ、象牙芽細胞周囲には好中球や CD68 陽性マクロファージはほとんどみられなかった。

窩洞形成による歯髄組織への刺激は、強度な刺激と軽度な刺激に分けて考えることができる。刺激が強い場合には象牙芽細胞の壊死を引き起こし、本研究結果のように壊死細胞を処理する炎症性細胞が出現する。細菌感染を伴わない場合の修復象牙質形成には壊死した象牙芽細胞を処理するために好中球

やマクロファージなどの自然免疫系が活性化される。修復象牙質形成過程におけるマクロファージの役割に注目したところ、マクロファージが Wnt10a、GPR177 陽性を示すことが明らかとなった。これまでも象牙芽細胞分化に Wnt シグナルが関連していることは報告されてきたが、修復象牙質形成においても Wnt10a が Wnt 古典経路を介して、歯髄細胞を象牙芽細胞に分化させ、Wnt10a 産生細胞としてマクロファージが関与していることが示唆された。修復象牙質形成過程における Wnt シグナルに関連する分子、すなわち、LRP や Frizzled などの Wnt のレセプター局在についても形態学的に解析することが必要である。

(3) 骨髄由来マクロファージを LPS で刺激して Wnt10a 発現を検討したが、非添加群と比較して発現上昇はみられなかった。(図3) LPS による刺激実験では、Wnt10a の上昇は認められなかったが、他の刺激として壊

図3 骨髄マクロファージへのLPS添加によるWnt10a発現



死細胞によって放出される ATP、貪食などが考えられ、組織修復におけるマクロファージの役割についてさらに解析を進める必要がある。

以上のように、本研究から歯の発生過程のみならず修復象牙質形成においても、Wnt シグナルの重要性が明らかとなった。今後、臨床応用を目指すためには直接覆髄剤としての Wnt シグナルを活性化することにより歯科医療における新たな治療法の開発につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Hosoya A, Takahama A and Nakamura H Localization of REKM-b/FIZZ2 is associated with cementum formation. The Anatomical Record、査読有、(in press)

Yukita A, Hara M, Hosoya A and Nakamura H (2017) Relationship between localization of proteoglycans and induction of neurotrophic factors in mouse dental pulp. J Oral Biosc、査読有、59: 31-7.

Hosoya A and Nakamura H (2015) Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue. Jpn Dent Sci Rev、査読有、51:75-83.

〔学会発表〕(計 3件)

細矢明宏、吉羽邦彦、吉羽永子、鷲尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、山本昭夫、中村浩彰、象牙芽細胞分化におけるポリコーン群タンパク質 Bmi1 の機能 (プログラム抄録集: 43, A17-1610) 日本歯科保存学会秋期学術集会 (第 145 回) 2016 年 10 月 27、28 日、キッセイ文化ホール (長野県、松本市)

堀部寛治、細矢明宏、平賀 徹、中村浩彰、抗微生物ペプチド cathelicidin の象牙質修復に対する促進的関与 (プログラム・抄録集: p477) 歯科基礎医学会学術大会 (57 回) 2015 年 9 月 11-13 日、朱鷺メッセ (新潟県、新潟市)

高濱 暁、細矢明宏、中村浩彰、歯胚発生過程における RELM-b/FIZZ2 局在 (プログラム・抄録集: p540) 歯科基礎医学会学術大会 (57 回) 2015 年 9 月 11-13 日、朱鷺メッセ (新潟県、新潟市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中村 浩彰 (NAKAMURA, Hiroaki)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：50227930

##### (2)研究分担者

細矢 明宏 (HOSOYA, Akihiro)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：70350824

堀部 寛治 (HORIBE, Kanji)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：70733509

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：00360222

雪田 聡 (YUKITA, Akira)  
静岡大学・教育学部・准教授  
研究者番号：80401214

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )