

令和元年6月5日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11817

研究課題名(和文) 象牙質・歯髄複合体の修復反応における骨髄間葉系細胞の関与

研究課題名(英文) Involvement of bone marrow mesenchymal cells in the repair of dentin-pulp complex

研究代表者

正村 正仁 (Shoumura, Masahito)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30367536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヨードホルム加水酸化カルシウム糊材を象牙質・歯髄複合体に貼付したラットの観察を病理組織学的に行う事により、糊材応用部周囲に形成された修復象牙質が第三象牙質に分類されるものであると明らかになった。
また、GFP骨髄細胞移植マウスを用いた実験より、人為的髄床底穿孔部に生じた歯根膜ポリープの構成細胞には骨髄由来のものが含まれるであろう事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

象牙質・歯髄複合体に歯科用薬剤を応用した際の組織反応の詳細や、髄床底穿孔部に生じた歯根膜ポリープの構成細胞の動態を明らかにする事により、その次のステップとして修復象牙質の形成や損傷を受けた歯周組織の修復を促す手法の確立へ向けた検討を開始する事ができる。そして、それらの手法が確立されるところとなれば、特に小児歯科治療時における臨床成績の向上に寄与する事となるであろう。

研究成果の概要(英文)：Histopathological observation of rats with a calcium hydroxide iodoform paste applied to the dentin-pulp complex revealed that the restorative dentin formed around the paste was classified as the third dentin.

In an experiment with mice transplanted with GFP bone marrow cells, bone marrow-derived cells were involved in cells constituting the periodontal polyp generated at the perforated site on the pulpal floor.

研究分野：小児歯科学

キーワード：象牙質・歯髄複合体 水酸化カルシウム糊材 デンチンブリッジ 骨髄間葉系細胞 歯根膜ポリープ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

旧来、生活歯髄切断法に水酸化カルシウム製剤を応用した際に形成されるデンチンブリッジの由来は、水酸化カルシウム製剤包摂部周囲の象牙芽細胞あるいは神経堤由来の未分化間葉細胞であると考えられてきた。しかし「骨髄幹細胞は歯および歯周組織を形成する全ての細胞への分化能を有している」との最新の知見を鑑みると、このデンチンブリッジ形成についても骨髄幹細胞が何らかの形で関与している可能性が極めて高いものとするに至った。

2. 研究の目的

そこで、デンチンブリッジの形成やその他の歯周組織修復反応に対する骨髄幹細胞の関与を明らかにし、それにより特に小児歯科治療時における臨床成績の向上（水酸化カルシウム製剤を応用した生活歯髄切断法を行った際のデンチンブリッジ形成を促す手段の開発など）に繋げる事ができるのではないかと着想した。

3. 研究の方法

マウス・ラットを用いて、生活歯髄切断法の際に形成されるデンチンブリッジの形成機序やその他の歯周組織修復反応について病理組織学的な検討を行う。また、通常のマウス・ラットに加えて、GFP 骨髄細胞移植マウス・ラットも用いる事により、水酸化カルシウム製剤を応用した生活歯髄切断法時におけるデンチンブリッジ形成やその他の歯周組織修復反応の際に、そこに増殖する細胞の起源と分化の機構についての追究を行う。

これらが明らかとなれば、次のステップとしてデンチンブリッジの形成や歯周組織の修復を促す手法の確立へ向けた検討を開始する事ができる。

4. 研究成果

(1) ヨードホルム加水酸化カルシウム糊材を象牙質・歯髄複合体に貼付したラットの観察を行った。m-CT 画像では埋入糊材に接していると考えられる部位の根管部歯髄は、術直後のものとの比較において側壁不透過像の幅の増大があった。なお、一部は根管が閉鎖してしまっているものもあった。根管部の歯髄の狭窄と考えられる不透過像のうち、一部のものでは根管の上部が強く狭窄しており、その下では根管腔が透過像として確認できるものもあった。HE 染色にて、水酸化カルシウム糊材を直接的に歯髄に應用した歯髄腔および象牙質周囲には象牙細管の極めて不規則な修復象牙質が、谷を埋めるように厚く形成されていた。歯冠部歯髄に続く根管部を閉塞させるような修復象牙質の形成が顕著であった。原生象牙質は象牙細管が規則的であったのに対して、厚く形成された象牙質は周囲のものとの染色性も異なり、象牙細管も不明瞭かつ不規則になっていた。アザン染色においては、HE 染色と同様に歯髄腔および象牙質周囲に厚い修復象牙質が増生していた。根管腔はほとんど閉塞されていた。修復象牙質の染色性は原生象牙質と異なりアニン青に濃染した。厚く形成された象牙質の内部には多数の細胞性封入体が確認された。形成された象牙質の象牙細管は原生象牙質よりも著しく不明瞭であった。Schmorl のチオニンピクリン酸染色では、HE 染色およびアザン染色と同様に、歯髄腔および象牙質周囲に厚い修復象牙質が形成されていた。形成された象牙質はピクリン酸に濃染し、周囲象牙質と染色性が異なった。また、修復象牙質内には、多くの核の染色されない細胞性封入体があった。象牙細管の走向は周囲象牙質と比較し不明瞭であり、象牙芽細胞の配列も不規則であった。埋入糊材に接している根管部歯髄は旺盛に形成された修復象牙質により狭窄していた。

(2) GFP トランスジェニックマウスから骨髄移植を受けた C57BL/6 系 GFP マウス(以下 GFP マウス) を使用し、人為的髄床底穿孔部に生じた歯根膜ポリープの構成細胞の動態を明らかにする事を試みた。

病理組織学的検討

術後 2 週間の病理組織像では、髄床底穿孔部直下には、穿孔部の象牙質壁に接する部分には僅かに好中球が認められた。増殖細胞の主体は、線維芽細胞であり、その細胞の形態は、短い紡錘形で、その核は比較的丸いものが多かった。その配列に規則性はなかった。毛細血管は、肉芽組織内に所々存在する程度であった。肉芽組織の最表層には、細胞間橋の明瞭な多角形の上皮細胞が増殖していた。吸収窩内には所々に多核巨細胞が認められた。この細胞は TRAP 染色では赤色陽性を示した。術後 1 ヶ月の病理組織像では、線維芽細胞は 2 週例と同様、核は丸みをおび、肉芽組織の主をなしていた。髄床底直下にできた肉芽組織は穿孔部より髄腔内に盛り上がり、最表層は、重層扁平上皮で覆われていた。上皮の基底層は、丁脚を作って増殖していた。毛細血管は、2 週例と比較して増殖し、特に上皮直下に多く存在していた。術後 3 ヶ月では、増殖した肉芽組織内の線維芽細胞の核は扁平に変化し、膠原線維が目立つようになってきた。重層扁平上皮は、厚みを増していた。毛細血管は、肉芽組織内に多数存在しこの時期に最も多かった。術後 6 ヶ月では、増殖した肉芽組織には、膠原線維と、核の扁平な線維芽細胞が、より、目立ち、リンパ球はその中に点在していた。毛細血管は、やや減少していた。

免疫組織化学的検討

GFP について、その 2 週例では、歯根膜ポリープ内の紡錘形の核を持った長紡錘形の細胞や、血管内皮細胞の一部にも陽性反応があった。また、歯槽骨表面の陥凹部の多核巨細胞にも陽性を示した。術後 1 ヶ月例では GFP 陽性細胞はさらに増加し、特に髄床底穿孔直下の歯根膜が

リープ部には GFP 陽性細胞が多数存在していた。術後 3 ヶ月においても、紡錘形の細胞や多角形の細胞もあった。また、上皮層内には、GFP 陽性反応を示す、不規則な形態を示す細胞が認められた。術後 6 ヶ月でも、引き続き歯根膜ポリープ部には、陽性反応が多数認められた。GFP 陽性細胞は術後 2 週間では最も少なく、術後 1 ヶ月位まで増加しその後大きく変化は無かった。CD31 による染色では、毛細血管腔は、不明瞭であった場合でも、CD31 染色を行うことで、明瞭に観察された。術後 3 ヶ月では最も多くなっていた。蛍光免疫二重染色による検討では、まず、GFP-S100A4 の組み合わせについては、2 週例、6 ヶ月例ともに、紡錘形の核を持った長紡錘形の細胞に緑色蛍光を示す GFP 陽性所見があり、これらの外形を示す細胞に赤色反応の S-100A4 陽性反応が認められた。これらを重ね合わせによって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示す場所が認められた。さらに核を青色蛍光に発色する DAB と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むように認められた。GFP-Runx2 の組み合わせについては、肉芽組織内には、紡錘状で、丸みをおびたものや、細長い細胞があり、同部位には緑色蛍光を発する GFP 陽性所見があり、これらの外形を示す細胞に、赤色蛍光の Runx2 陽性所見が認められた。これを重ね合わせによって確認すると、橙色に発色する両者の一致を示した。形態は、さらに核を青色蛍光に発色する DAB と重ね合わせると、橙色は核の周囲を取り込むようになっていた。Runx2 陽性と GFP 陽性、両者の一致を示す橙色に発色する細胞は、1 ヶ月例では、2 週例との比較では大きく増加していた。3 ヶ月例では、減少していた。6 ヶ月例の重ねあわせでは、個体によって GFP 陽性のみ反応が多く占める個体と Runx2 陽性と GFP 陽性の両者の一致を示す反応が多く占める個体が存在した。GFP-CD31 では、明瞭な血管腔がみられる部位では、血管内腔面に GFP 陽性の内皮細胞の細胞質が配置していた。この血管腔を作る血管内皮細胞に赤色蛍光の CD31 陽性反応が認められた。これらの重ね合わせによっての検討では、両者の一致を示す細胞は 2 週例では少数であった。1 ヶ月以降では、CD31 陽性と GFP 陽性の両者の一致を示す反応が多くなっていた。以上の S100A4 と Runx2 の染色結果から、歯根膜線維芽細胞様の細胞が骨髄由来であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Keita Moriyama, Saeka Matsuda, Atsuko Matsuda, Akio Kida, Hidemoto Mizushima, Erina Mitsui, Masahito Shoumura, Toshiyuki Kawakami, Naoto Osuga, Histochemical Characteristics of Tertiary Dentin Due to Calcium Hydroxide Paste in Rats, *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有、26(3)、2017

DOI: 10.2485/jhtb.26.285

Yuichiro Nishikawa, Saeka Matsuda, Yoshikazu Nakayasu, Jin Toriya, Yukiko Yokoi, Masahito Shoumura, Norimasa Okafuji, Toshiyuki Kawakami, Naoto Osuga, Reactions of the Dentin-Pulp Complex to Calcium Hydroxide Paste in Rats, *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有、26(2)、2017

DOI:10.2485/jhtb.26.169

Saeka Matsuda, Masahito Shoumura, Naoto Osuga, Hidetsugu Tsujigiwa, Keisuke Nakano, Norimasa Okafuji, Takanaga Ochiai, Hiromasa Hasegawa, Toshiyuki Kawakami, Migration and Differentiation of GFP-transplanted Bone Marrow-derived Cells into Experimentally Induced Periodontal Polyp in Mice, *International Journal of Medical Sciences*, 査読有、13(7)、2016

DOI:10.7150/ijms.15671

〔学会発表〕(計 6 件)

森山 敬太、松田 紗衣佳、正村 正仁、川上 敏行、大須賀 直人、水酸化カルシウム系糊材に対するラットの象牙質・歯髄複合体の反応、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017

松田 紗衣佳、正村 正仁、大須賀 直人、辻極 秀次、中野 敬介、川上 敏行、骨髄由来細胞の歯根膜ポリープにおける局所特有の線維芽細胞への移動と分化、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017

松田 紗衣佳、松田 厚子、紀田 晃生、水島 秀元、森山 敬太、横井 由紀子、正村正仁、大須賀 直人、川上 敏行、歯根膜の慢性増殖性炎における骨髄由来未分化間葉細胞の局所特有の線維芽細胞への分化、第 55 回日本小児歯科学会総会、2017

松田 紗衣佳、辻極 秀次、中野 敬介、岡藤 範正、正村 正仁、大須賀 直人、川上敏行、マウス臼歯の髓床底穿孔による歯根膜ポリープ形成における細胞の移動と分化、第 17 回日本外傷歯学会総会・学術大会、2017

Saeka Matsuda, Atsuko Matsuda, Akio Kida, Keita Moriyama, Yukiko Yokoi, Masahito Shoumura, Naoto Osuga, GFP Transplanted Bone Marrow-Derived Cell Migration and Differentiation into Periodontal Polyp in Mice, 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016

松田 紗衣佳、横井 由紀子、森山 敬太、正村 正仁、大須賀 直人、松田 厚子、コレステリン肉芽腫構成細胞の骨髄間葉細胞からの供給、第 35 回日本小児歯科学会中部地方会、

2016

〔図書〕(計1件)

Toshiyuki Kawakami, et al、IntechOpen、Histology、2019、93-110

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大須賀 直人

ローマ字氏名：Osuga Naoto

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80247535

研究分担者氏名：川上 敏行

ローマ字氏名：Kawakami Toshiyuki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：総合歯科医学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：80104892

研究分担者氏名：辻極 秀次

ローマ字氏名：Tsujiigiwa Hidetsugu

所属研究機関名：岡山理科大学

部局名：理学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70335628

研究分担者氏名：中野 敬介

ローマ字氏名：Nakano Keisuke

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 10325095

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松田 紗衣佳

ローマ字氏名：Matsuda Saeka

研究協力者氏名：森山 敬太

ローマ字氏名：Moriyama Keita

研究協力者氏名：西川 祐一郎

ローマ字氏名：Nishikawa Yuichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。