

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20453

研究課題名(和文)TIMP1とHIFを応用した象牙質-歯髄複合体創傷治癒機構解析モデルの開発

研究課題名(英文)Development of the model of wound healing mechanism using TIMP1 and HIF

研究代表者

岡本 基岐 (OKAMOTO, MOTOKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60755354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TIMP1は細胞外基質の分解に中心的な働きをするMMPの阻害作用を持つが、歯髄細胞に対して、創傷治癒に関係する細胞機能を促進することが明らかとなり、第三象牙質を誘導することが明らかとなった。TIMP1の作用メカニズムとして、HIF1により調節を受ける遺伝子群が考えられたため、疑似的なHIF促進剤であるDFOを作用させるとTIMP1と同様に第三象牙質形成を誘導した。これらの作用はラパマイシンを投与することで阻害されるため、歯髄の創傷治癒においてラパマイシンの標的であるmTORやHIFは重要な働きをしていることが示され、生物学的覆髄剤開発の標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tissue Inhibitor of metaroprotease 1(TIMP1) can be worked as inhibitor against MMP which play a central role in the degradation of extracellular matrix. Additionally, TIMP1 were found to promote the various function of pulpal cells in vitro and also induced tertiary dentin in pulp tissue in vivo. As a mechanism of wound healing with TIMP1, a group of genes regulated by HIF1 was candidate. Therefore, DFO was applied as direct pulp capping. DFO also induced tertiary dentin similar to TIMP1 and ProRoot MTA. These effects were inhibited by administration of rapamycin. Rapamycin was considered as inhibitor of mTOR and HIF. From these results, mTOR and HIF play an important role in the wound healing process in the dentin pulp complex. And, TIMP1 and DFO had possibilities for the development of true biological pulp capping materials.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 覆髄 象牙質 歯髄 再生

1. 研究開始当初の背景

現在の歯科臨床で、う蝕除去後や窩洞形成時に露髄が認められた際に、直接覆髄剤として水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate (MTA) などのケイ酸カルシウム系セメントなどが用いられている。しかし、上記の材料を使用した場合でも歯髄を保存できる可能性は決して高いものではなく、成功率は 60~70%程度とされている。MTA は覆髄剤として水酸化カルシウム製剤よりも臨床成績が優れているとの報告が多いが、その理由は生体親和性、封鎖性や機械的性質に起因しており、作用機序は水酸化カルシウムの徐放であると考えられている。しかし、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムが明らかになっていない以上、MTA といえど理想的な覆髄剤であるとは言えない。

TIMP 分子はこれまでに TIMP1~4 の 4 種が同定されており、Matrix metalloproteinase (MMP) 分子の阻害因子として知られているが、一部の MMP 分子の活性化に関わっているという報告や TIMP 分子がシグナル分子としての働きやサイトカイン様作用を持っていることが報告されている。さらに TIMP 分子は骨代謝や創傷治癒 (細胞増殖、遊走、分化など) を促進することが報告されている (Lambert E. Crit Rev Oncol Hematol, 2004)。すでに皮膚科領域においては、TIMP1 は褥瘡性潰瘍の治療薬として臨床応用を検討されており、その創傷治癒促進効果が期待されている。

一方、全身の組織における TIMP1 の創傷治癒促進効果メカニズムの 1 つとして、転写因子である低酸素誘導因子、Hypoxia inducible factor (HIF) 分子の活性化が考えられている (Cui H. Front Pharmacol, 2012)。酸素供給が滞った組織内の細胞内にて HIF 分子が活性化をされ、その結果 800 個以上の遺伝子発現が調節され、環境への適応を図ることが報告されている。HIF 分子には HIF1 と HIF2 がよく研究されており、低酸素状態から細胞を保護する作用を持ち、血管新生促進、嫌気性代謝経路を活性化、炎症や細胞内 pH の調整を行うことがわかっている。HIF1 分子は細胞内において酸素依存的に分解される HIF1 ユニットと酸素非依存的に分解される HIF1 ユニットからなるヘテロダイマーを形成することで、核内に移行し標的遺伝子の遺伝子発現を調節する。通常の酸素状態でも HIF1 ユニットは細胞内において発現が認められるが、酸素、鉄イオンやアスコルビン酸を補因子として要求する prolyl hydroxylases (PHD) によって水酸化され、速やかに分解される。低酸素状態では PHD の活性が低下し、HIF1、HIF2 が分解されず安定化することで様々な遺伝子調節をおこなう。近年、HIF 分子は低酸素適応応答に加え、幹細胞性の維持、炎症の制御、創傷治癒、恒常性の維持やに関わっていることが明らかとなっており (Suda T. Cell Stem

Cell, 2011)、HIF1 もしくは HIF1 の分解に関わる PHD を標的とした虚血障害治療薬の創薬研究などが進められている。

このように、全身の組織では TIMP1 および HIF 分子の創傷治癒促進作用が注目され、臨床応用が試みられているものの、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒過程における TIMP1 に関する報告は、申請者らのグループが以前におこなったように、その局在を報告したものしかなく、TIMP1 が象牙質-歯髄複合体の治癒過程においてどのような機能を持つかについての詳細な報告はこれまでに存在しない。また、HIF 分子に関しても歯髄細胞に対する血管新生誘導効果を検証した *in vitro* の報告あるものの (Aranha AM. J Endod, 2010)、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響に関する報告はない。

以上のことから、全身において創傷治癒促進効果をもつ TIMP1 が HIF1 を介して象牙質-歯髄複合体においても同様の作用を発現することで、創傷治癒を促進するのではないかと仮説のもと、TIMP1、HIF1 および HIF1 分子安定化につながる PHD 阻害剤、deferoxamine (DFO) が象牙質-歯髄複合体に与える影響を検証した上で、TIMP1、HIF1 の siRNA を用いた動物実験モデルを開発、その機能を検証することで第三象牙質形成メカニズムの解明ならびに生物学的な治癒機構に基づく覆髄剤開発につながるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

全身において創傷治癒促進効果をもつ TIMP1 が HIF1 を介して象牙質-歯髄複合体においても同様の作用を発現することで、創傷治癒を促進するのではないかとこの仮説のもと、TIMP1、HIF1 分子の安定化につながる PHD 阻害剤、deferoxamine (DFO) が象牙質-歯髄複合体に与える影響を検証した上で、TIMP1、HIF1 の siRNA を用いた動物実験モデルを開発、その機能を検証することで第三象牙質形成メカニズムの解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. TIMP1 がヒト歯髄幹細胞の機能に与える影響の検討 (*in vitro*)

(1) 細胞毒性評価細胞形態観察および細胞形態観察

TIMP1 の歯髄細胞に対する細胞毒性を評価するために LDH アッセイと形態観察を行った。TIMP1 (2~2000ng/ml, R&D Systems) を添加した 1% FBS 含有培地にてヒト歯髄幹細胞 (Lonza) を培養 1 日後に細部上清を回収し、LDH アッセイ (TAKARA BIO INC) により細胞毒性の評価を行った。また培養 3 日後の歯髄細胞の形態を光学顕微鏡にて評価した。非添加群をコントロールとした。試料数は各条件につき 6 とした。

(2) 細胞増殖能の評価 (WST-1 アッセイ)

TIMP1 を添加した 1% FBS 含有培地にてヒト歯髄幹細胞を培養後、培地に WST-1 試薬 (Roche) を添加し、吸光度を測定することで TIMP1 が歯髄細胞の増殖能に与える影響を評価した。試料数は各条件につき 6 とした。

(3) 硬組織形成能の評価 (Alizarin red 染色)

10% FBS 含有培地に 10 µg/ml ascorbic acid と 10 mM β -glycerophosphate を添加した分化誘導培地に TIMP1 (200ng/ml) を加えてヒト歯髄幹細胞を 3 日おきに培地交換しつつ、21 日間培養した後、Alizarin red 染色 (PG リサーチ) をおこなった。染色後、ギ酸にて石灰化物を溶出し、溶出液の吸光度を測定することにより、硬組織形成能に与える影響を評価した。試料数は各条件につき 6 とした。

2. TIMP1 が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の検討 (in vivo)

TIMP1 を覆髄剤として応用し、歯髄の創傷治癒、第三象牙質の形成に与える影響を評価した。本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認の下実施された (動歯 28-014-0)

8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを全身および局所麻酔を施し、無菌的操作を実施するために、上顎第一臼歯に対して、特注クランプ (YDM) を用いてラバーダム防湿を施したのちに (図 1)、電気エンジンに装着したラウンドバー (#1) を用いて露髄を伴う実験的窩洞を形成した。

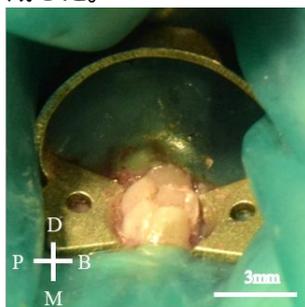


図 1 上顎右側第一臼歯に特注クランプを併用して、ラバーダム防湿を行った。

D=distal,
P=Palatal,
B=Buccal,
M=Mesial

露髄面を止血、洗浄後、TIMP1 をコラーゲンスポンジに含浸させ直接覆髄剤として貼付し、ガラスアイオノマーセメントにて充填を行った。窩洞形成後 28 日目に実験動物に麻酔薬を過剰投与すること屠殺し、還流固定を行い、披験歯である上顎第一臼歯を含む上顎骨を摘出した。その後マイクロ CT にて画像撮影を行った。マイクロ CT による画像解析では、窩洞形成量 (露髄径) の測定と形成された第三象牙質量の定量および定性評価をおこなった。さらに、窩洞形成量は歯髄の創傷治癒に影響を与えると考え、窩洞形成量を統一した試料において比較検討を行った。露髄径の測定にはマイクロ CT の水平平面、矢状平面を用いて算出した。定性評価は石灰化度の既知のファントムを用いて検量線を作成し、形成された第三象牙質の石灰化度を測定した。定量評価に関しては、マイクロ CT 画像の矢状平面から前頭平面の画像を参考にしつつ、形成された第三象牙質の領域を測

定し、病理組織切片像からも対象領域の確認を行った。

マイクロ CT 撮影後、被験歯を浸漬固定、脱灰、パラフィン包埋を行い、厚さ 7 µm の連続切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行った。病理組織学的評価は第三象牙質を対象にして行った。

なお、コントロール群は PBS をコラーゲンスポンジに含浸され直接覆髄として適用したものとした。試料数は各条件につき 6 とした。

3. DFO が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響 (in vivo)

DFO は鉄イオンをキレートすることで HIF1 を安定化することで、様々な遺伝子調整すると考えられている。すでに DFO は歯髄細胞の創傷治癒に与える影響を別のグループにより、*in vitro* の検討が実施されていた。実際に DFO により歯髄細胞の活性、細胞増殖、遊走、硬組織形成能が促進することが報告されているが、*in vivo* の報告は見られないことから実験 2 と同様の実験を実施した。具体的には、DFO をコラーゲンスポンジに含浸させ、直接覆髄剤として応用し、ガラスアイオノマーセメントにて仮封を行い、28 日経過後歯髄の創傷治癒に与える影響を評価した。試料数は各条件につき 6 とした。

4. ラット覆髄モデルにおけるラパマイシン投与による影響の検討

当初、siRNA を用いて TIMP1 や HIF1 を阻害することで、TIMP1 と HIF1 の関係を明らかにし、歯髄の創傷治癒解明に迫る予定であった。しかし、HIF1 は細胞や組織内で様々な因子により調節を受け、siRNA によるノックダウンによる実験系を確立することが困難であった。

そこで、ラパマイシンを用いた阻害剤投与の実験系の確立を目指した。ラパマイシンは mTOR 阻害薬として広く知られており、mTOR を阻害することで、その下流の存在する HIF1 ならびに HIF1 に関連する遺伝子調節を阻害すると考えられている。よって、実験 2, 3 のラット直接覆髄モデルに、ラパマイシンを腹腔内で投与することで、HIF1 ないし mTOR シグナル阻害により歯髄の創傷治癒にどのような影響を与えるか評価できると考えた。これまでの報告では、脳や肺など血流の比較的豊富な組織に対するラパマイシンの腹腔内投与による影響を検討した報告があったが、末梢組織である歯髄組織にラパマイシンが到達するか確認できないため、直接覆髄剤のゴールドスタンダードとして考えられている MTA を直接覆髄した実験動物にラパマイシンを腹腔内投与した際の影響を検討することで、ラパマイシン投与効果を確認した。

具体的には窩洞形成の 4 時間にラパマイシンを腹腔内投与し、直接覆髄剤のゴールドスタンダードとして考えられている、MTA にて直接覆髄を行い、その後は 4 日おきにラパ

マイシンの腹腔内投与を28日まで継続した。なおコントロール群はMTAを直接覆髄としてPBSを腹腔内投与した群とした。

さらにTIMP1やDFOを直接覆髄剤として応用した際、ラパマイシン投与によって歯髄の創傷治癒のどのような影響があるか検討した。試料数は各条件につき6とした。

4. 研究成果

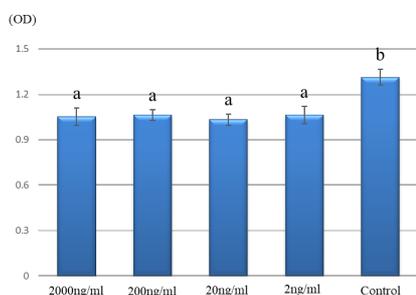
1. TIMP1がヒト歯髄幹細胞の機能に与える影響の検討 (in vitro)

(1) 細胞毒性評価および細胞形態観察

LDH assayによる評価を行った結果、Controlと比較して、TIMP1添加群は細胞毒性を示さず、組織保護的に作用していた(図1)。

光学顕微鏡による歯髄細胞の形態観察の結果、TIMP1添加群はコントロールと比較して形態学的な差異は認めなかった。

図1 細胞毒性評価 (LDH アッセイ)



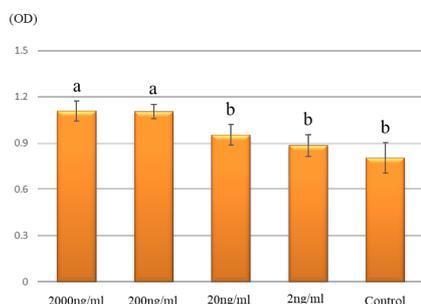
TIMP1が歯髄細胞の細胞毒性に与える影響を評価した。TIMP1(2ng/ml ~ 2000ng/ml)はコントロールと比較して細胞毒性は低かった。同一文字 (a, b) で示された群間に有意差がないことを示す (Oneway ANOVA, Tukey-Kramer Test, $p < 0.05$)。

(2) 細胞増殖能の評価 (WST-1 アッセイ)

TIMP1(2 ~ 2000ng/ml)が歯髄細胞の細胞増殖に与える影響をWST1アッセイにて評価したところ、TIMP1は濃度依存的に歯髄の細胞増殖を促進させた(図2)。

上記の実験の結果から、TIMP1(200ng/ml)を用いて以降の実験を実施した。

図2 細胞増殖評価 (WST1 アッセイ)

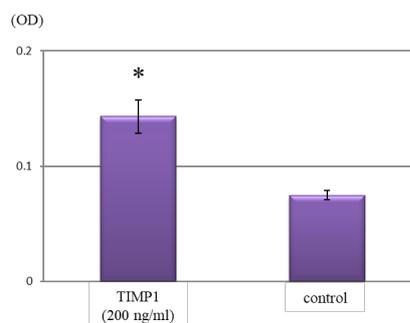


TIMP1が歯髄細胞の細胞増殖に与える影響を評価した。TIMP1は濃度依存的に歯髄の細胞増殖を促進させた。200 ng/ml と 2000 ng/ml のTIMP1はコントロールと比較して有意に細胞増殖を促進した。同一文字 (a, b) で示された群間に有意差がないことを示す (Oneway ANOVA, Tukey-Kramer Test, $p < 0.05$)

(3) 硬組織形成能の評価

Alizarin red 染色をおこない、TIMP1が歯髄細胞の硬組織形成に与える影響を評価した(図3)。

図3 硬組織形成能評価



TIMP1 (200ng/ml)が歯髄細胞の硬組織形成に与える影響を評価した。TIMP1 (200ng/ml)はコントロールと比較して有意に硬組織形成を促進した(student-t test, $* < 0.05$)。

これらの結果からTIMP1は歯髄細胞に対して、細胞保護的な作用を持ち、細胞増殖、硬組織形成能を促進することが明らかとなった。しかし、創傷治癒には複雑なプロセスを経るため *in vivo*での検討が必須と考え以下の実験を行った。

2. TIMP1が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の検討 (in vivo)

(1) 窩洞形成量(露髄径)の標準化

マイクロCTを用いた第三象牙質を行うにあたり窩洞形成量の統一は必須と考え、各飼料の露髄径を測定した結果を表1に示す。

3群間に統計学的な有意差は認められなかった。

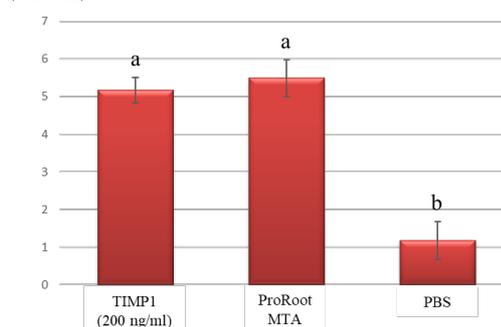
表1 露髄径 ($\times 10^{-2}$ mm²)

材料	TIMP1	PBS	ProRoot MTA
	5.20 \pm 0.83	5.15 \pm 0.80	5.38 \pm 0.73

(2) 形成された第三象牙質の定量、定性評価

石灰化度が既知のファントムを用いて測定した結果、誘導された第三象牙質の石灰化度に各群間に統計学的な有意差は認めなかった。また、マイクロCTにより計測した第三象牙質の形成量を測定した結果を図4に示す。

図5 マイクロCTによる第三象牙質形成量の ($\times 10^{-8}$ cm³)



評価

TIMP1 および MTA は PBS に比較して有意に第三象牙質形成を促進していた。が歯髄細胞の硬組織形成に与える影響を評価した。同一文字 (a, b) で示された群間に有意差がないことを示す (Oneway ANOVA, Tukey-Kramer Test, $p < 0.05$)

(3) 形成された第三象牙質の病理組織学的評価

TIMP1 および MTA により、露髄部を全体に覆い細管構造を有する第三象牙質が形成された。PBS 群では直接覆髄から 4 週経過後に認められた第三象牙質はわずかであり、露髄部を覆っていなかった。TIMP1 により形成された第三象牙質の病理組織学切片像を図 5 に示す

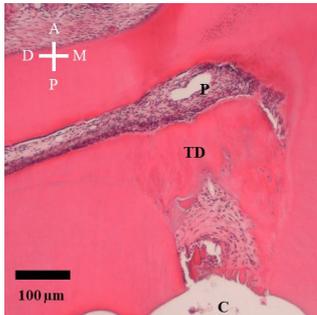


図 5 形成された

第三象牙質の病理組織学的評価

TIMP1 を用いて直接覆髄を行うと露髄部を完全に多い、かつ細管構造を有する第三象牙質が認められた。C=cavity, P=Pulp, TD=Tertiary dentin.

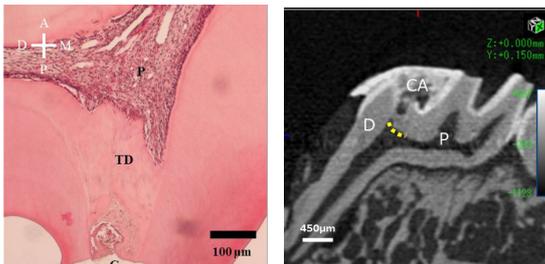
これらのことから、TIMP1 は MTA と同等の第三象牙質形成能を有していることが明らかとなった。

3 .DFO が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響 (in vivo)

TIMP1 を直接覆髄剤として応用すると第三象牙質が誘導された。しかし、古典的には MMP 分子の阻害剤である TIMP1 がどのようにして創傷治癒を促進しているかのメカニズムは不明である。近年、TIMP1 は HIF1 を安定化させることが報告されていることから、我々は TIMP1 の働きを HIF1 が担っているのではないかと考えた。そこで HIF1 を安定化させる作用の持つ DFO を直接覆髄剤として応用し、TIMP1 と同様の作用があるか検討した。

DFO を直接覆髄剤として応用し、4 週経過後のマイクロ CT 画像と病理組織学的評価を行ったところ、露髄部直下の歯髄組織に第三象牙質形成を認めた(図 6)。

図 6 形成された第三象牙質のマイクロ CT 画



像(矢状平面)と病理組織学的評価

DFO を用いて直接覆髄を行うと露髄部を完全に多い、かつ細管構造を有する第三象牙質が認められた。歯髄組織の膿瘍などの炎症所見は認めなかった。C=cavity, CA=capping agent, P=Pulp, TD=Tertiary dentin, D=Dentin.

4 .ラット覆髄モデルにおけるラパマイシン投与による影響の検討

DFO を直接覆髄剤として作用させることで第三象牙質を形成することから、歯髄の創傷治癒に HIF1 により調節を受ける遺伝子が関わっていることが示唆された。次に、この関係をより明確にするために、HIF1 の阻害剤としても作用するラパマイシンを腹腔内に投与することで、ProRoot MTA、TIMP、HIF1 がどのような影響を受けるか評価した。ProRoot MTA により直接覆髄を行った場合でもラパマイシンを投与することで第三象牙質形成が著しく阻害された。マイクロ CT 画像および定量評価した結果を示す(図 7)。

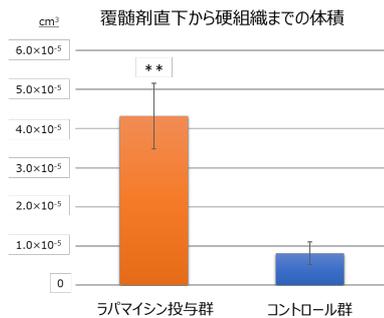
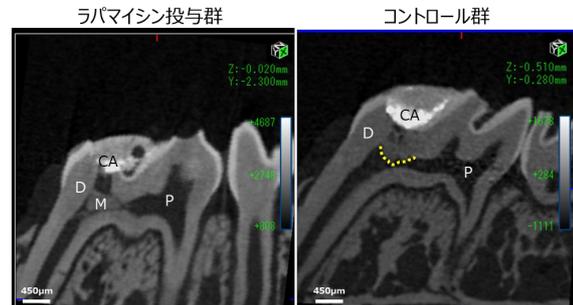


図 7 マイ

クロ CT によるラパマイシン投与による影響の評価

ラパマイシン投与群では、覆髄剤直下の第三象牙質がコントロール群に比較して阻害されていた。第三象牙質形成の阻害領域を定量評価したところラパマイシン投与群はコントロール群に比較して有意に第三象牙質形成が阻害されていた。(student-t test, $** < 0.01$) CA=capping agent, P=Pulp, M=Mineralized tissue, D=Dentin.

さらに、ラパマイシンを投与することで、TIMP1 および DFO を直接覆髄剤として用いても第三象牙質形成が阻害されることが明らかとなった。

以上の結果より、TIMP1 および DFO は直接覆髄剤としての応用の可能性を示されたとともに、mTOR および HIF1 により調節を受

ける遺伝子群は歯髄の創傷治癒において重要な働きをしていることが示された。これらの知見は生物学的覆髄剤の開発および歯髄再生の分子生物学的な標的としての可能性を示すものである。

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)

岡本 基岐、小 道 俊 吾、渡 邊 昌 克、八 木 香 子、成 瀬 陽 菜、伊 藤 勇 紀、高 橋 雄 介、林 美 加 子

Er:YAG レーザーの歯髄保存療法における有効性の検討

日本レーザー歯学会誌, 査読有
印刷中

Okamoto M., Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Yoneda N, Ishimoto T, Nakano T, Hayashi M. Novel evaluation method of dentin repair by direct pulp capping using high resolution micro-computed tomography.

Clinical Oral Investigation, 査読有
Feb 12. 2018

doi: 10.1007/s00784-018-2374-5.

岡本基岐、小 道 俊 吾、高 橋 雄 介、Manahil Saeed、米 田 直 道、石 本 卓 也、中 野 貴 由、林 美 加 子. 高 解 像 度 Micro-CT を 用 いた 覆 髄 剤 に よ り 誘 導 さ れ た 第 三 象 牙 質 の 定 量 定 性 評 価 ; 日 本 骨 形 態 測 定 学 会 雑 誌 27:1:144 2017 (査読有)

[学会発表](計 3件)

岡本基岐、小 道 俊 吾、Manahil Ali、渡 邊 昌 克、高 橋 雄 介、林 美 加 子

低酸素誘導因子 (HIF-1) による第三象牙質形成に与える影響

第 147 回 日 本 歯 科 保 存 学 会 (岩 手)

Motoki OKAMOTO, Yusuke TAKAHASHI, Shungo KOMICHI, Naomichi YONEDA, Mikako HAYASHI. Effect of tissue inhibitor metalloprotease-1 on tertiary dentinogenesis.

Pulp Biology Regeneration Group symposium 2016 Nagoya, Japan

Motoki OKAMOTO, Yusuke TAKAHASHI, Shungo KOMICHI, Manahil S ALI, Naomichi YONEDA, Takuya ISHIMOTO, Takayoshi NAKANO, Mikako HAYASHI

Novel evaluation of dentin repair using Micro-Computed Tomography.

95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research San Francisco, USA

[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]

ホームページなど

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座歯科保存学教室(ホームページ)

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~conserve/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 基岐 (OKAMOTO MOTOKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 65755354

(2)研究分担者

研究者番号:

(3)連携研究者

研究者番号:

(4)研究協力者

マナヒルアリ サイド (MANAHILALI SAEED)

渡 邊 昌 克 (WATANABE MASAKATU)