

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592085
 研究課題名（和文） 象牙質・歯髄複合体の修復再生機構
 -歯髄組織幹細胞の同定と細胞動態の解析-
 研究課題名（英文） A study on mechanisms of tissue repair and regeneration of the
 dentin-pulp complex
 研究代表者
 吉羽 邦彦（YOSHIBA KUNIHICO）
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号：30220718

研究成果の概要：

象牙質・歯髄複合体の修復・再生過程における歯髄組織幹細胞／前駆細胞の動態と象牙芽細胞への分化機構を解明する目的で、直接覆髄処置、レーザー照射、あるいは歯の再植、歯髄組織の移植を行い、その後の硬組織形成過程について免疫組織化学的に観察した。その結果、歯髄組織中に存在する歯髄固有細胞から分化した象牙芽細胞様細胞あるいは骨芽細胞様細胞によって硬組織形成が行われることが明らかにされた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質・歯髄複合体、修復・再生、歯髄組織幹細胞、象牙芽細胞、直接覆髄、レーザー、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

歯髄組織はう蝕や修復処置などの物理的・化学的刺激により象牙質を修復・再生する能力を有している。しかしながらその修復・再生機構、特に歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導に関しては不明の点が多い。また一方

では、歯髄組織は本来石灰化組織形成能を有しており、歯の再植あるいは移植後に歯髄組織が石灰化することが知られているが、そのメカニズムは詳細に検討されていない。最近、歯髄組織幹細胞／前駆細胞の存在が報告され、これらの細胞が様々な刺激に反応して増

殖し、硬組織形成細胞へと分化すると考えられている。しかしながらこのような幹細胞／前駆細胞が歯髄のどこに存在するのか、またどのようなメカニズムで創傷部に移動して硬組織形成細胞へと分化するのか、未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯の発生過程、ならびに象牙質・歯髄複合体の修復・再生過程における歯髄組織幹細胞／前駆細胞の動態と象牙芽細胞への分化機構を解明することである。これらの結果を総合的に分析し、歯髄組織の有する自己修復・再生能力を賦活化する組織再生療法の開発をめざそうとするものである。

3. 研究の方法

歯の発生過程ならびに歯髄の修復・再生過程における歯髄組織幹細胞／前駆細胞の動態と細胞分化の観察のため、以下の事項について免疫組織化学的検索を行った。

(1) マウスおよびラット歯の発生過程における細胞分化関連因子の発現

(2) ラットおよびヒト臼歯直接覆髄後の被蓋硬組織形成過程における細胞動態と硬組織形成

(3) ラット移植歯髄・再植歯における硬組織形成と形成細胞の同定

(4) 半導体およびEr:YAGレーザー照射後のラット臼歯歯髄反応

4. 研究成果

(1) 歯の発生過程における細胞分化関連因子の発現

①マウス歯の発生過程におけるTIMP-2とperiostinの発現

基質リモデリングへの関与が示唆されているperiostinとTIMP-2の関連性を解明する目的で、歯の発生過程におけるこれらの発現を

観察した。その結果、TIMP-2は歯肉、歯周靭帯などメカニカルストレスのかかる組織の細胞外基質に関連して局在し、periostinの分布と一致していることが明らかとなった。

②ラット臼歯発生過程における α -SMAの局在
幹細胞／前駆細胞で発現が認められる細胞骨格タンパク α -smooth muscle actin (SMA)の、歯の発生過程における局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、 α -SMAは歯槽骨の形成とともに歯小囊で認められ、その後歯槽骨寄りの歯小囊細胞に持続的に観察されることから、歯小囊細胞の骨芽細胞への分化に関連していることが示唆された。

(2) 直接覆髄後の被蓋硬組織形成過程における細胞動態

①ラット臼歯直接覆髄後の歯髄反応

ラット臼歯にMineral Trioxide Aggregate (MTA)による直接覆髄処置を施し、その後の歯髄修復過程における細胞動態について5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)抗体法を用いて検索した。その結果、硬組織形成はMTAと歯髄組織との界面部に形成される歯髄(石灰化)変性層に、露髄部周辺で増殖した細胞が遊走し、その後象牙芽細胞へと分化することで開始されることが示唆された。

②Mineral Trioxide Aggregate (MTA) 直接覆髄後のヒト歯髄の反応

2週後、MTA-歯髄境界部に一層の骨シアロタンパク(BSP)陽性層が認められ、これに沿って中間径フィラメントnestin陽性細胞が観察された。4週後、BSP陽性層の下にオステオポンチン(OPN)陽性の線維性基質が形成され、歯髄側にnestin陽性細胞の配列が観察された。また細胞増殖・分化マーカー(Ki-67, Osterix)の局在性の変化から、露髄部直下で増殖・遊走した細胞が象牙芽細胞様細胞に分化することにより被蓋硬組織形成が開始され

ること、さらにこれらの過程に非コラーゲン性タンパクが関連すること示唆された。

(3) ラット移植歯髄・再植歯における硬組織形成

①歯牙再植後の歯髄腔内硬組織形成

5日後、象牙芽細胞は変性し、14日後になると歯髄腔に象牙質様、骨様組織の形成が観察された。Green fluorescent protein (GFP) 発現ラット臼歯を野生型ラットの抜歯窩に移植すると、GFP陽性細胞が骨様組織表層と象牙質様組織全体に観察されることから、歯髄細胞がこれらの硬組織の形成に関与することが示された。

②歯髄皮下移植後の硬組織形成

7日後、歯髄組織周辺部に硬組織形成が開始され、14日後になると内部に拡大して観察された。硬組織はオステオカルシン、OPN、BSP 陽性を示したが、象牙質シアロタンパク陰性であり、骨様組織であることが示唆された。GFP発現ラット歯髄の野生型ラットへの移植実験では、硬組織形成細胞が移植体由来であることを示していた。

(4) レーザー照射後のラット歯髄反応

①半導体レーザー照射後の歯髄反応

出力1.5W、60秒×3回照射直後、象牙芽細胞を含む歯髄細胞の壊死が照射部を中心に観察され、象牙芽細胞におけるheat-shock protein 25 (Hsp-25)およびnestin陽性反応の消失が認められた。1日後から壊死層周囲にHsp-25強陽性反応が認められ、2~3日後になると細胞増殖を示すBrdU陽性細胞が多数観察され、修復機転の開始が示唆された。

②Er:YAGレーザー照射後の歯髄反応

窩洞形成直後および6時間後、窩洞直下での象牙芽細胞の配列の乱れが、また12-24時間後にはHsp-25およびnestin陽性反応の消

失がみられた。その後、2日目以降でHsp-25およびnestin陽性反応が同部の象牙芽細胞様細胞に観察されるようになった。BrdU陽性細胞は、2日および3日後に歯髄中に多数検出された。Er:YAGレーザーによる窩洞形成後の歯髄損傷は軽度であるものの、前駆細胞の増殖分化過程を経て、象牙芽細胞様細胞の配列が生じることが示唆された。

以上の結果から、歯髄組織中に存在する歯髄幹細胞/前駆細胞が、覆髄処置、レーザー照射等、様々な外部刺激により増殖・分化し、硬組織を形成することが明らかにされた。また刺激の条件により、あるいは再植歯や歯髄組織の皮下移植では、歯髄組織由来細胞から骨様硬組織が形成されることが示された。今後、歯髄細胞から象牙芽細胞様細胞あるいは骨芽細胞様細胞への分化機構とこれに関連する因子を明らかにすることが、歯髄組織の有する自己修復・再生能力を賦活化する新たな歯髄保存療法の開発へと繋がるものと思われる。

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 8件)

- ①. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. Journal of Endodontics. 34:970-974, 2008 (査読有)
- ②. Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Zhao C, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Wakitani S, Yamada H,

- Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H. Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. Bone. 42:350-357, 2008 (査読有)
- ③. Yoshihisa N, Yoshihisa K, Hosoya A, Saito M, Yokoi T, Okiji T, Amizuka N, Ozawa H. Association of TIMP-2 with extracellular matrix exposed to mechanical stress and its co-distribution with periostin during mouse mandible development. Cell and Tissue Research. 330:133-145, 2007
- ④. Zhao C, Hosoya A, Kurita H, Hu T, Hiraga T, Ninomiya T, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Takahashi M, Kurashina K, Ozawa H, Nakamura H. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. Archives of Oral Biology. 52:945-953, 2007 (査読有)
- ⑤. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Hoshi K, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Takahashi M, Okabe T, Sahara N, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H. Hard tissue formation in subcutaneously transplanted rat dental pulp. Journal of Dental Research. 86:469-474, 2007 (査読有)
- ⑥. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Nakaya H, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H. Immunohistochemical localization of alpha-Smooth muscle actin during rat molar tooth development. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 54:1371-1378, 2006 (査読有)
- ⑦. Hosoya A, Nakamura H, Akahane S, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Ninomiya T, Hoshi K, Sahara N, Kasahara E, Ozawa H. Immunohistochemical study of osteodentin in the unerupted rat incisor. Journal of Oral Biosciences 48:132-137, 2006 (査読有)
- ⑧. Yoshihisa N, Yoshihisa K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F, Cam Y, Ruch JV, Hosoya A, Ozawa H, Lesot H. Differential regulation of TIMP-1, -2, and -3 mRNA and protein expressions during mouse incisor development. Cell and Tissue Research. 324:97-104, 2006 (査読有)
- [学会発表] (計 19 件)
- ①. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 鞍立桃子, 重谷佳見, 興地隆史: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) を応用した象牙質再生療法-直接覆髄後の歯髄反応について-。第 21 回日本歯科医学会総会, 2008 年 11 月 14-15 日, 横浜
- ②. 笹なつき, 重谷佳見, 鈴木啓展, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 興地隆史: 半導体レーザー照射後のラット臼歯歯髄初期反応に関する免疫組織学的検討. 日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会 (第 129 回), 2008 年 11 月 7 日, 富山
- ③. 重谷佳見, 鈴木啓展, 笹なつき, 吉羽邦彦, 山中裕介, 吉羽永子, 興地隆史: Er:YAG レーザーによる窩洞形成後のラット臼歯歯髄反応に関する免疫組織学的検討. 日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会 (第 129 回), 2008 年 11 月 7 日, 富山
- ④. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 重谷佳見, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) に対するヒト

- 歯髄反応に関する免疫組織化学的研究.
第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 2008
年 9 月 25 日, 東京
- ⑤. Yoshiba K, Yoshiba N, Shigetani Y,
Hosoya A, Okiji T. Tissue Responses of
Human Dental Pulps to Mineral
Trioxide Aggregate. IADR 86th General
Session & Exhibition, 2008 年 7 月 4
日, トロント (カナダ)
- ⑥. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y,
Yoshiba N, Ohshima H, Okiji K.
Reparative Dentinogenesis of Rat
Molars Pulp-capped with Mineral
Trioxide Aggregate. IADR 86th General
Session & Exhibition, 2008 年 7 月 4
日, トロント (カナダ)
- ⑦. 細矢明宏, Zhao Chen, 吉羽邦彦, 吉羽
永子, 山田博仁, 笠原悦男, 小澤英浩,
中村浩彰:再植歯の歯髄腔内における骨
様組織形成. 日本歯科保存学会 2008 年
度春季学術大会 (第 128 回), 2008 年 6
月 5 日, 新潟
- ⑧. 吉羽永子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 細矢明
宏, 興地隆史:MTA に対するヒト歯髄反
応に関する免疫組織化学的研究-直接覆
髄後の細胞外基質の変化と細胞分化-.
日本歯科保存学会2007年度秋季学術大
会 (第127回), 2007年11月8日, 岡山
- ⑨. Yoshiba N, Yoshiba K, Hosoya A, Saito
M, Yokoi T, Okiji T, Amizuka N, Ozawa
H. Association of TIMP-2 with
extracellular matrix exposed to
mechanical stress and its
co-distribution with periostin during
mouse tooth development. 9th
International Conference on Tooth
Morphogenesis and Differentiation,
2007年9月6日, チューリッヒ (スイス)
- ⑩. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 吉羽永
子, 大島勇人, 興地隆史:MTA によるラ
ット臼歯覆髄モデルにおける歯髄反応.
第49回歯科基礎医学会学術大会, 2007年
8月30日, 札幌
- ⑪. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 重谷佳見, 細矢明
宏, 興地隆史:Mineral Trioxide
Aggregate (MTA) に対するヒト歯髄の反
応-直接覆髄後の硬組織形成過程の免疫
組織化学的研究-. 日本歯科保存学会
2007年春季学術大会 (第126回), 2007
年6月8日, 大宮
- ⑫. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 吉羽永
子, 興地隆史:Mineral Trioxide
Aggregate (MTA) に対するラット臼歯歯
髄の反応に関する免疫組織化学的研究.
第28回日本歯内療法学会学術大会, 2007
年5月26日, 広島
- ⑬. Okiji T, Kuratate M, Shigetani Y,
Yoshiba N, Ohshima H, Yoshiba K.
Reparative dentinogenesis of exposed
dental pulp capped with mineral
trioxide aggregate: An
immunohistochemical study.
International symposium on molecular
destruction and reconstruction of the
dentin/pulp complex and its
surrounding tissues. 2007年3月5日,
東京
- ⑭. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 吉羽永
子, 興地隆史:Mineral Trioxide
Aggregate (MTA) に対するラット臼歯歯
髄の反応-硬組織形成過程の免疫組織化
学的研究-. 日本歯科保存学会2006年秋
季学術大会 (第125回), 2006年11月9日,
鹿児島

- ⑮. 細矢明宏, 中村浩彰, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 山田博仁, 笠原悦男, 小澤英浩: ラット臼歯皮下移植後の歯槽骨再生. 日本歯科保存学会2006年秋季学術大会 (第125回), 2006年11月9日, 鹿児島市民文化ホール
- ⑯. 吉羽永子, 吉羽邦彦, 興地隆史, 斎藤正寛, 横井隆政, 細矢明宏, 網塚憲生, 小澤英浩: マウス歯の発生過程におけるTIMP-2とPeriostinは類似の時間的空間的発現パターンを示す. 第48回歯科基礎医学会学術大会, 2006年9月23日, 横浜
- ⑰. 細矢明宏, 中村浩彰, 二宮 禎, 平賀 徹, Zhao Chen, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男, 小澤英浩: 歯根膜組織の歯槽骨再生能. 第48回歯科基礎医学会学術大会, 2006年9月22日, 横浜
- ⑱. 細矢明宏, 中村浩彰, 吉羽邦彦, 岡部高弘, 脇谷滋之, 小澤英浩: ラット臼歯皮下移植実験モデルにおける歯槽骨再生に関する免疫組織化学的研究. 第9回日本組織工学会, 2006年9月7日~8日, 京都
- ⑲. 細矢明宏, 中村浩彰, 二宮 禎, 吉羽邦彦, 中谷宏幸, 脇谷滋之, 山田博仁, 笠原悦男, 小澤英浩: α -平滑筋アクチンの歯周組織発生過程における局在と歯槽骨形成との関連. 第24回日本骨代謝学会学術集会, 2006年7月8日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 30220718

(2) 研究分担者

吉羽 永子 (YOSHIBA NAGAKO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 10323974

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO) (2006年度)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 70350824