

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10146

研究課題名（和文）ヒト歯髄の創傷治癒過程におけるM2マクロファージとシュワン細胞の相互作用の解明

研究課題名（英文）Interaction between M2 macrophages and Schwann cells during wound healing in human dental pulp

研究代表者

吉羽 永子（Yoshiba, Nagako）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10323974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫機能の中心的役割を担っているマクロファージには、機能的に異なる性質を持つ2つのタイプがあることが知られている。すなわちM1型マクロファージと称される炎症を促進するものと、その反対にM2型マクロファージという炎症を抑制し組織の修復に働くタイプのものである。本研究では、ヒト歯髄組織におけるマクロファージの特にM2型の動態について解析したところ、シュワン細胞がM2型の誘導に大きく関与していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯髄組織を用い、小動物とは異なるマクロファージの動態の解明に繋がった。CD163陽性M2型マクロファージは、常にシュワン細胞と共在し、神経線維保護機能や痛みコントローへの関与が示唆された。また、マクロファージの表現型は細胞外基質の影響を受けていることが明らかとなった。一方、長年に渡り論争の的となってきた歯髄リンパ管の存在は、ラミニン-332を応用することでその存在が明らかとなり、今後のリンパ管研究に新たな展開が生まれた。

研究成果の概要（英文）：Macrophages, which play a central role in immune function, are known to have two types with different functional properties. One is called M1 type, which promotes inflammation, and the other is called M2 type, which suppresses inflammation and works for tissue repair. In this study, we analyzed the dynamics of macrophages, especially the M2 type macrophages, in human dental pulp and found that Schwann cells are greatly involved in the induction of the M2 type macrophages.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：ヒト歯髄 創傷治癒 マクロファージ シュワン細胞 ラミニン リンパ管

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは誘導因子により、異なる性質を持つ2つのタイプに分極化することが知られている。すなわち M1 型マクロファージと称される炎症を促進するものと、その反対に M2 型マクロファージという炎症を抑制し組織の修復に働くタイプのものである。M2 型マクロファージは創傷治癒には欠かせない TGF- β (transforming growth factor- β) や血小板由来増殖因子をはじめ、さまざまな細胞外基質やその代謝に関わる MMP(matrix metalloproteinase) や TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase) も分泌することで、創傷治癒に重要な役割を担うとされている。私達は先に、これらの因子が歯髄創傷治癒・再生時に重要であることを報告してきた。そこで本研究では、マクロファージにも注目することで、より効果的な「ヒト歯髄の保存と再生療法」への新たな展開を目指している。

2. 研究の目的

炎症を抑制し組織修復に働くとされる M2 型マクロファージの、ヒト歯髄における動態に関する報告はこれまでなされていない。したがって、より有効な歯髄保存治療と歯髄組織再生治療の創生を目的として、本研究では、マクロファージの特に M2 型の動態について、これまでの私達の所見を元に、特にシュワン細胞との相互作用の視点から *in vivo* および *in vitro* において解析する。一般に組織から分離した初代培養細胞は、株化細胞に比べ増殖が遅く培養を維持することが難しいとされるが、一方で正常性が高く元の臓器と類似した性質を持つという点で重要である。よって、*in vitro* の実験では、ヒト歯髄から磁気細胞分離法によりシュワン細胞を取り出す方法を確認し、その初代培養細胞とヒトマクロファージを共培養することで、その相互関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画は、新潟大学歯学部倫理委員会での承認を得て行った(承認番号 2015-5086)。本研究で用いるヒトの歯髄組織は、矯正治療上抜歯が必要と診断された歯が対象である。ヘルシンキ宣言の趣旨に基づき、事前に十分な説明を行うとともに、文書による承諾を得ることにより、倫理上の対策を講じた。

- (1) *In vivo*: ヒト歯髄直接覆髄後の dentin bridge 形成過程 様々な病態のう蝕歯髄において、M1/M2 マクロファージとシュワン細胞の局在性の変化、およびそのクロストークに関わる因子についての検索については、矯正治療などにより要抜歯と診断された歯を用いた。ヒトの歯を用いた直接覆髄法は、一般的な臨床術式に従った。すなわち、浸潤麻酔をした後、ダイヤモンドポイントとスチールラウンドバーにて露髄後、洗浄、MTAにて覆髄の後、アイオノマーセメントとコンポジットレジンにて修復処置を施した。組織切片を作成後、免疫組織学的染色により各種マーカーの局在を検索した。また、FACSによりヒト歯髄における常在性マクロファージの割合についても解析した。
- (2) *In vitro*: ヒト歯髄から磁気細胞分離法によりシュワン細胞を取り出し、シュワン細胞の初代培養とマクロファージの共培養系を利用して、その相互の依存性について解析した。実験に必要な量のマクロファージをヒト歯髄組織から得るのは困難であったため、マクロファージの実験系ではスタンダードに使用されている THP-1 細胞を用いた。さらに、ラミニンアイ

ソフォームがマクロファージの分極化に影響を及ぼすかどうかを検索するため、各種ラミニンアイソフォームをコートした培養プレート上で THP-1 マクロファージを培養し、その変化を解析した。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は、以下の通りである。

(1) ヒト歯髄組織創傷治癒過程において、その動態を検索したところ、M2 型マクロファージにおいて特徴的な局在を見出した。すなわち、ヒト健全歯髄では M1 型は歯髄全体に散在するのに対し M2 型はシュワン細胞と共存し、さらに直接覆髄による被覆硬組織 (dent in bridge) 形成過程では M1 型は創面に集積するのに対し、M2 型は創面には集積せず常にシュワン細胞と共存するという想定外の局在を呈しており、これは以前に解析したラット歯髄を用いた実験とは全く異なる所見であることが分かった (Yoshida et al., J Dent Res 2020)。

(2) シュワン細胞と M2 型マクロファージの相互作用をさらに解析するために、ヒト歯髄組織から MACS (Magnetic-activated cell sorting) によりシュワン細胞を取り出し、in vitro において THP-1 細胞由来マクロファージ (M0) との共培養を試みた結果、シュワン細胞に接触しとどまっている THP-1 マクロファージは、その形を球状から紡錘形に変化させ、CD163 陽性の M2 型マクロファージに分化することが明らかとなった。本研究から、ヒト歯髄組織における M2 マクロファージの動態が初めて明らかとなり、その分極化にはシュワン細胞が大きく関わっていることが示唆された (Yoshida et al., J Dent Res 2020)。

(3) 一方、マクロファージは何らかの基質に接着して存在することから、基底膜の構成成分であるラミニンにも注目し研究を進めた。ラミニンは、鎖/鎖/鎖の組み合わせにより現在 19 種類以上のアイソフォームが報告され、組織特異的に分布する。その受容体であるインテグリンは鎖/鎖/鎖をもち、各ラミニンタイプへの結合特異性は異なる。これらの特異性がマクロファージの表現型とその機能に影響していることも明らかになった (図 1)。一方、この研究過程において、一般に皮膚などのラミニンタイプとされる 3 鎖が歯髄でも検出され、それはリンパ管内皮細胞において発現されることが明らかとなった (図 2)。

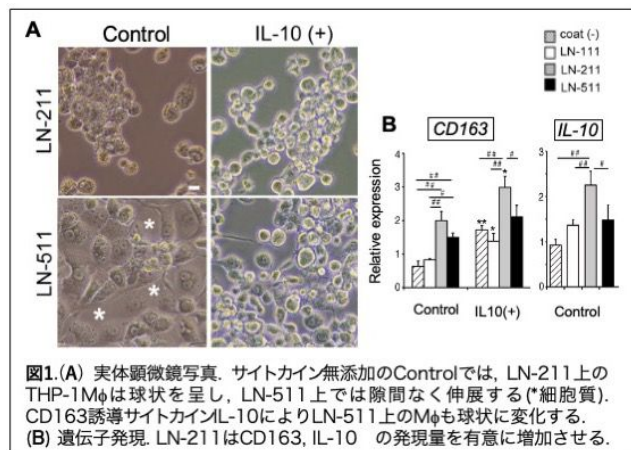


図1.(A) 実体顕微鏡写真。サイトカイン無添加のControlでは、LN-211上のTHP-1Mφは球状を呈し、LN-511上では隙間なく伸展する(*細胞質)。CD163誘導サイトカインIL-10によりLN-511上のMφも球状に変化する。(B) 遺伝子発現。LN-211はCD163、IL-10 の発現量を有意に増加させる。

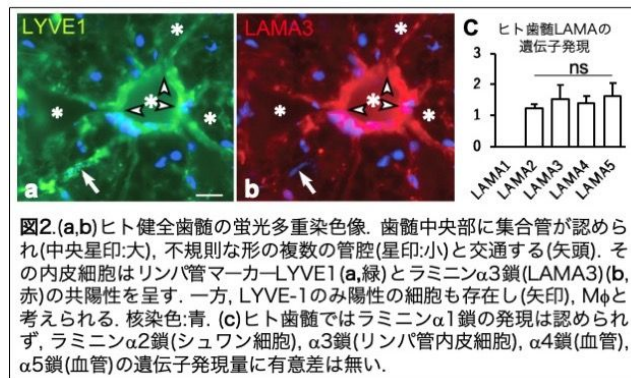


図2.(a,b)ヒト健全歯髄の蛍光多重染色像。歯髄中央部に集合管が認められ(中央星印:大)、不規則な形の複数の管腔(星印:小)と交通する(矢頭)。その内皮細胞はリンパ管マーカー-LYVE1(a,緑)とラミニンα3鎖(LAMA3)(b,赤)の共陽性を呈す。一方、LYVE-1のみ陽性の細胞も存在し(矢印)、Mφと考えられる。核染色:青。(c)ヒト歯髄ではラミニンα1鎖の発現は認められず、ラミニンα2鎖(シュワン細胞)、α3鎖(リンパ管内皮細胞)、α4鎖(血管)、α5鎖(血管)の遺伝子発現量に有意差は無い。

皮細胞において発現されることが明らかとなった (図 2)。これまでマクロファージの分極化は微小環境によるサイトカインによると考えられてきたが、本研究により細胞外基質

であるラミニンがマクロファージの機能にも影響を与えていることが明らかとなった。さらに、ヒト歯髄ではリンパ管内皮細胞がラミニン-332 を発現することが見出され、今後リンパ管再生治療に応用できる可能性が示唆された (Yoshida et al., *ImmunoHorizons* 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida N, Edanami N, Ohkura N, Maekawa T, Takahashi N, Tsuzuno T, Maeda T, Tabeta K, Izumi K, Noiri Y, Yoshida K	4. 巻 5
2. 論文標題 Laminin Isoforms in Human Dental Pulp: Lymphatic Vessels Express Laminin-332, and Schwann Cell-Associated Laminin-211 Modulates CD163 Expression of M2-like Macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 1008-1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2100110.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida N, Edanami N, Ohkura N, Maekawa T, Takahashi N, Tohma A, Izumi K, Maeda T, Hosoya A, Nakamura H, Tabeta K, Noiri Y, Yoshida K	4. 巻 99
2. 論文標題 M2 phenotype macrophages colocalize with Schwann cells in human Dental Pulp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 329-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034519894957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉羽永子, 大倉直人, 前川知樹, 泉健次, 細矢明宏, 中村浩彰, 前田健康, 野村由一郎, 吉羽邦彦
2. 発表標題 ヒト歯髄においてシュワン細胞はマクロファージをM2型へ転換する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉羽 邦彦 (Yoshida Kunihiko) (30220718)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大倉 直人 (Ohkura Naoto) (00547573)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	
研究分担者	枝並 直樹 (Edanami Naoki) (80804567)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関