

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18995

研究課題名(和文) MMP-20ノックアウトマウスを用いた歯髄の硬組織形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of tertiary dentin formation in pulp tissue using MMP-20 knockout mice

研究代表者

岡本 基岐 (Okamoto, Motoki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60755354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄を失うと歯を喪失するリスクが上昇し、健康寿命にも直結するため、歯髄の活性を維持する直接覆髄処置は極めて重要である。一方、重要な処置であるが、その成功率は低く改善すべき課題である。

本研究では、直接覆髄の成功率を向上を目指した歯髄の創傷治癒機転に基づき、新規治療薬開発のため、これまでの研究成果に基づき、MMP-20欠失マウスを用いて実験を遂行した。しかし、予想に反してMMP-20は第三象牙質形成に必須分子ではないことが示された。そこで、mTOR阻害薬であるラパマイシンを投与するモデルで評価したところ、修復象牙質形成が再現性をもって阻害されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄を失うと歯を喪失するリスクが上昇し、ひいてはQOLや健康寿命に直結する問題であることが示されており、歯髄の活性を維持し治癒に導く直接覆髄は極めて重要な処置である。一方、直接覆髄の成功率はあまり高くなく、現在用いられている直接覆髄剤が歯髄の創傷治癒機転に基づく材料ではないことは解決すべき課題である。本研究ではmTOR分子を阻害するラパマイシンを投与することで、歯髄の創傷治癒が再現性をもって阻害された。これらの知見は歯髄炎に対する分子生物学的な標的としての可能性を示すとともに、先天的な象牙質形成不全や知覚過敏などに対する新たな治療戦略を基盤構築につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Since the risk of tooth loss increases dramatically after pulpotomy and is directly related to healthy life expectancy, direct pulp capping to maintain pulp activity is extremely important. On the other hand, although it is an important procedure, its success rate is low and it is an issue that needs to be improved.

In this research, we conducted an experiment using MMP-20-deficient mice based on our previous research results to develop a new therapeutic agent based on the wound healing mechanism of dental pulp to improve the success rate of direct pulp capping. However, contrary to our expectation, MMP-20 is not essential for the formation of tertiary dentin. We evaluated the effect of rapamycin, an inhibitor of mTOR, in the model, and found that the repair dentin formation was reproducibly inhibited.

研究分野：保存修復学

キーワード：歯髄 第三象牙質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、直接覆髄が行われるが、現在臨床で頻用されている水酸化カルシウム製剤など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くない。そのため、直接覆髄はその成功率の低さから、一般臨床医では躊躇され、歯髄は安易に除去される傾向にある。しかし、歯髄を失うと歯を喪失するリスクが上昇し、QOL や健康寿命に直結する問題であることが示されており、歯髄の活性を維持し治癒に導く極めて重要な処置である。

直接覆髄の成功率の低さは、臨床現場において歯髄の状態を完全に把握することが困難なことも一因であるが、現在用いられている直接覆髄剤が歯髄の創傷治癒機転に基づく材料ではないということも非常に大きな要因と考えられる。歯髄組織には覆髄剤なしでも、う蝕の緩慢な進行とともに硬組織が形成される、歯髄固有の防御反応を有することは周知の事実である。この歯髄固有の防御反応を最大限に高めることのできる覆髄剤が最良の覆髄剤であり、直接覆髄の成功率を向上させることができると考えられる。そこで申請者らは、歯髄の硬組織形成機序解明が必須と考え、ラットを用いた動物実験モデルにおいて、窩洞形成後の歯髄組織において Matrix metalloproteinase (MMP) 分子が特異的な発現を示し、特に MMP-20 で分解を受けた象牙質基質によって第三象牙質形成が促進されることを明らかにした。MMP-20 はエナメル関連タンパク分解酵素でありエナメル芽細胞より分泌され、エナメル質形成に関わっていることが報告されていた。最近の報告では、萌出後の象牙芽細胞においても、発現が認められることから、申請者の上記報告より象牙芽細胞より分泌される MMP-20 が象牙質基質に働きかけることで、歯髄の創傷治癒を促進する可能性が示唆された。しかしながら、MMP-20 が象牙質形成における働きはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

萌出後に象牙芽細胞に存在する MMP-20 の役割について言及したものは我々の報告しかない。これまでに MMP-20 欠失マウスにおける報告は、エナメル質形成のみであり、後天的に生じる反応象牙質や修復象牙質形成に関する報告はない。

よって、MMP-20 欠失マウスを用いた覆髄実験モデルで後天的に生じる反応象牙質や修復象牙質形成を評価することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

MMP-20 欠失マウスは群馬大学生体調節研究所附属生体情報ゲノムリソースセンターよりノックアウトマウスを供与いただいた。MMP-20 における活性領域として重要な領域である Exon5 (触媒領域) HEXGHXXGXXH site が重要であるため CRISPR/Cas9 システムで欠失させた。ゲノム配列を調べ、MMP-20 欠失していることや次世代の繁殖に問題がないことを確認し、実験を遂行した。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で実施した(承認番号: 動歯-29-030-0)。

(1) マウス窩洞形成モデルの確立

MMP-20 欠失マウスおよび Wild type (WT) マウスをそれぞれ全身麻酔および局所麻酔下にて、上顎臼歯に露髄を伴う実験的規格窩洞を形成し、覆髄材料としてケイ酸カルシウム系セメント(ProRoot MTA, Dentsply sirona) にて直接覆髄を実施し、コンポジットレジンにて充填を行った。窩洞形成後 および 28 日目にマイクロ CT (m_CT2, リガク) にて画像撮

影をおこない、画像解析ソフト (TRI-3DBON, リガク) による形成された第三象牙質量の定量や石灰化度などの定性評価を行う。続いて通法に従い、脱灰連続切片を作製後、H-E染色を施し、歯髄の炎症状態の評価ならびに第三象牙質の形成量、速度、質の病理組織学的評価を行うこととした。

(2) ラット窩洞形成モデルにおけるラパマイシンの影響の検討

予想される結果として、MMP-20 欠失マウスでは硬組織誘導を認めないことが考えられたが、予想に反して MMP-20 欠失マウスにおいても WT マウスにおいても歯髄の創傷治癒の結果として、第三象牙質の誘導が確認された。そこで研究が予定通り進まなかった場合の実験計画に従って、ラット窩洞形成モデルにおけるラパマイシン (mTOR 阻害剤) の影響について詳細に検討した。

(3) ラパマイシンがヒト歯髄幹細胞の機能に与える影響の検討 (in vitro)

細胞毒性評価および細胞形態観察

ラパマイシンの歯髄細胞に対する毒性を評価するため LDH アッセイと光学顕微鏡による細胞形態観察をおこなった。ラパマイシン 10nmol/L を添加した石灰化誘導培地 (MSCgo™ Osteogenic XF, Cosmo Bio) にて歯髄幹細胞 (Lonza) を培養し、培養 3 日、7 日後に細胞培養上清を回収し、LDH アッセイ (TAKARA BIO INC) により細胞毒性評価をおこなった。また培養 3 日後の歯髄細胞形態を光学顕微鏡観察にて評価した。ラパマイシン非添加群、1%FBS 含有培地にて培養した群をコントロールとした。試料数は各条件につき 8 とした。

硬組織形成能評価 (Alizarin red 染色)

ラパマイシンを添加した石灰化誘導培地にヒト歯髄幹細胞を播種し、3 日おきに培地交換しつつ、21 日培養した後、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。ラパマイシン非添加群、1%FBS 含有培地にて培養した群をコントロールとした。試料数は各条件につき 8 とした。

網羅的な遺伝子解析の評価 (RNA-seq)

ラパマイシンを添加した石灰化誘導培地にヒト歯髄幹細胞を播種し、3 日おきに培地交換しつつ、7 日観培養した後、RNA を回収後、RNA-seq (illumina, Hiseq 2000) を行い、硬組織に影響を与える遺伝子検索をおこなった。

(4) ラット窩洞形成モデルにおけるラパマイシンの影響の検討

マウスの窩洞形成モデルに基づき、窩洞形成 4 時間前に、ラパマイシン (Shigma) を腹腔内投与し、窩洞形成モデルによる評価をおこなった。窩洞形成後は 4 日おきにラパマイシンを腹腔内投与を 28 日まで継続した。なおコントロール群は MTA を用いて直接覆髄を行い、PBS を腹腔内投与した群とした。試料数は各条件につき 6 とした。

4. 研究成果

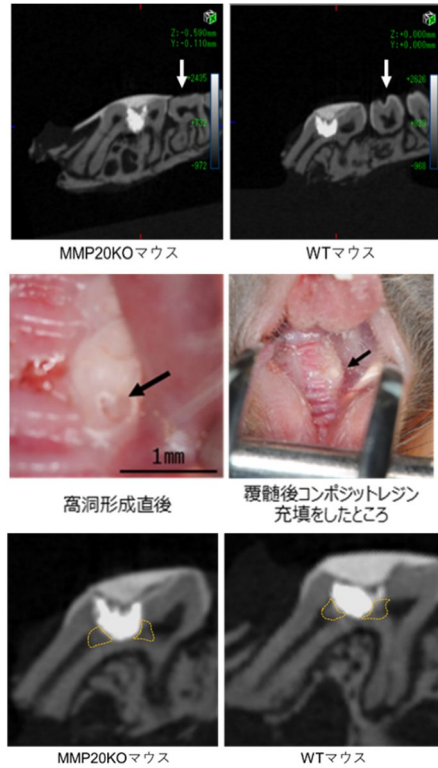
(1) マウス窩洞形成モデルの確立

歯冠の大きさがラットの約 1/3 のマウスの歯に対する規格化された窩洞形成モデルの確立を目指した。ラットの実験設備・器具を調整し、さらに拡大鏡を用いることで、規格化した窩洞形成を達成できた。ジェノタイプングにより、MMP-20 欠失マウスと WT マウスを区別し

た上で、それぞれを窩洞形成モデルにて評価をおこなったところ、これまでに報告されているよう、MMP-20 欠失マウスではエナメル質の形成不全が確認された (右図, 白矢印: 上顎第二臼歯).

予想に反して、MMP-20 欠失マウスにおいても WT マウスにおいても歯髄創傷治癒としても第三象牙質形成が確認された (右下図, 黄色点線で囲まれた領域が第三象牙質).

エナメル質, エナメル芽細胞においては MMP-20 の役割を補償する分子として, カリクレイン関連ペプチターゼ 4 (KLK4) が報告されているが, 歯髄の創傷治癒に関連する象牙芽細胞において KLK4 の発現は確認されていない. 予想される結果と異なる結果が得られたことについて, MMP-20 の欠失が歯髄組織の創傷治癒にとって必須の分子でない可能性とも考えられるが, 発生過程における KLK4 に代わる未知の分子が存在する可能性が示唆された.

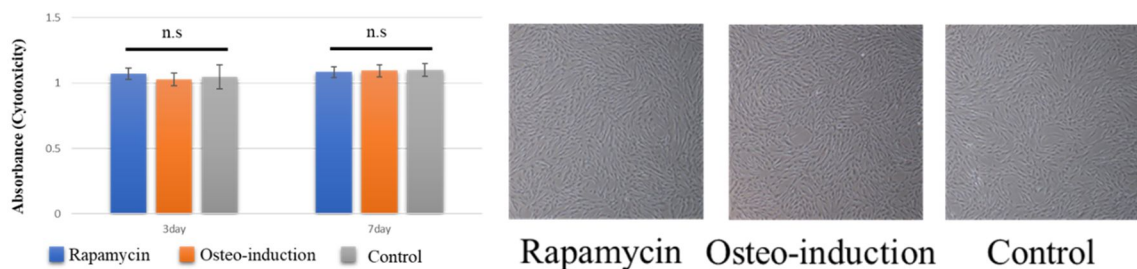


そこで研究が予定通り進まなかった場合の実験計画に従って, これまでの一連の研究で第三象牙質形成との関連がラット窩洞形成モデルにおけるラパマイシン (mTOR 阻害剤) の影響について詳細に検討した.

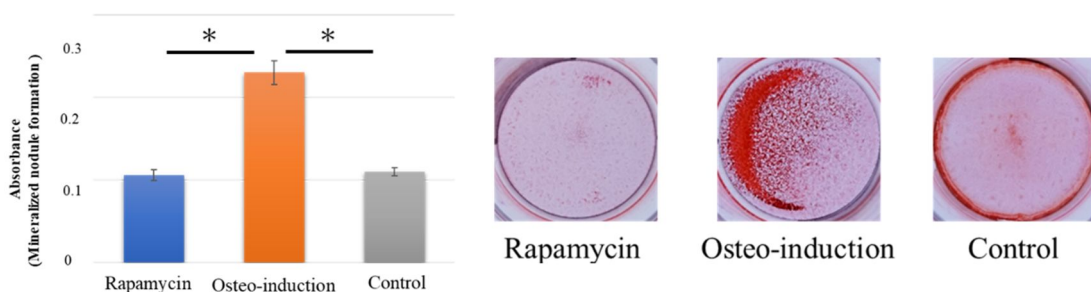
(2) ラパマイシンがヒト歯髄幹細胞の機能に与える影響の検討 (in vitro)

細胞毒性評価および細胞形態観察

LDH assay による評価の結果, Control 群, ラパマイシン群ともに細胞毒性を示さなかった (下図). 光学顕微鏡による歯髄細胞の形態観察の結果, ラパマイシン群は他群と比較して形態学的な差異は観察されなかった (下図).

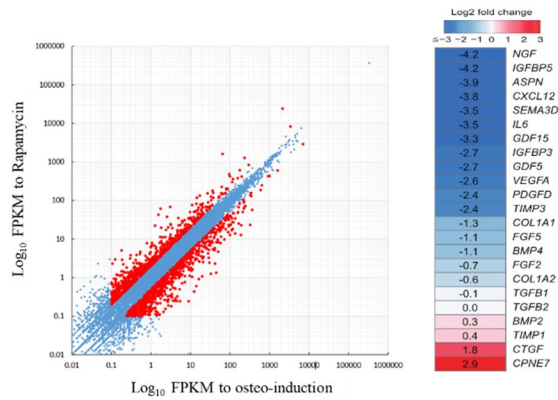


Alizarin Red 染色による評価をおこなったところ, ラパマイシン群は歯髄細胞の硬組織形成能を優位に低下させた (下図).



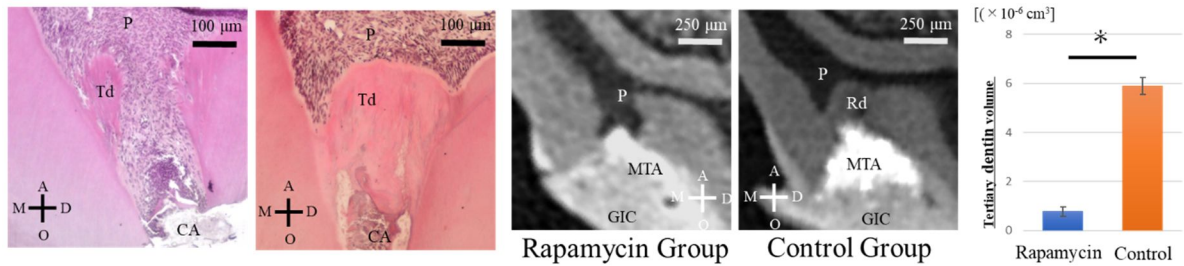
網羅的な遺伝子解析の評価
(RNA-seq)

ラパマイシン群の遺伝子変化を網羅的に検索することで硬組織に影響を与える遺伝子の検索を行った結果、歯髄の文化に影響を与える複数の遺伝子が候補として挙げられた (右図).

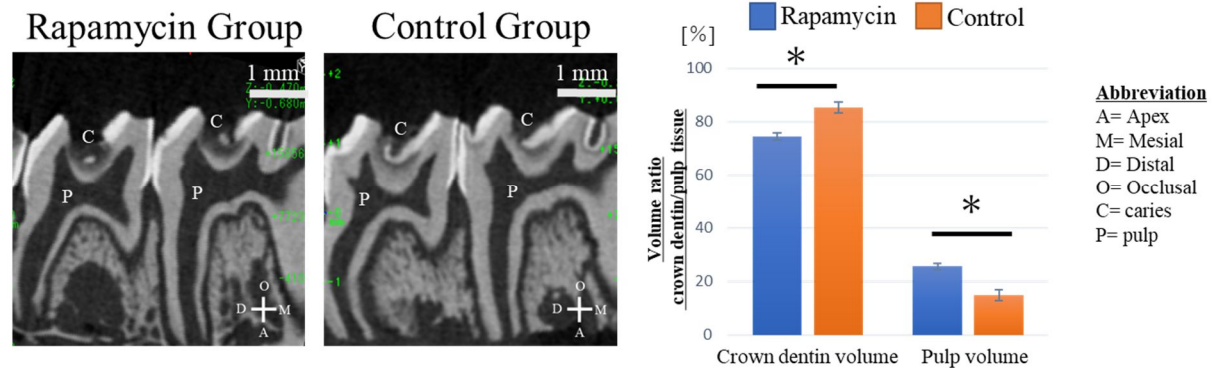


(3) ラット窩洞形成モデルにおけるラパマイシンの影響の検討

ラパマイシンを投与することで、第三象牙質形成が阻害されることがマイクロCT, 病理組織像から明らかとなった (下図).



以上の結果より、歯髄の創傷治癒においてmTOR分子が重要な働きをしていることが示唆された。また、長期飼育した場合、ラパマイシン投与することで窩洞形成などの外来刺激に関係なく形成される第二象牙質形成は阻害されていることが明らかとなった(下図)。



これらの知見は外来刺激に対する歯髄の創傷治癒機序を示すだけでなく象牙質形成のメカニズムに迫るものであり、歯髄炎に対する分子生物学的な標的としての可能性を示すとともに先天的な象牙質形成不全や知覚過敏などに対する新たな治療戦略を基盤構築につながるものである。

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 Okamoto M, Ali M, Komichi S, Watanabe M, Huang H, Ito Yuki, Miura J, Hirose Y, Mizuhira M, Takahashi Y, Okuzaki D, Kawabata S, Imazato S, Hayashi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Surface pre-reacted Glass filler contributes to tertiary dentin Formation through a Mechanism different than that of hydraulic calcium-silicate cement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine.	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8091440.	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 Okamoto Motoki, Matsumoto Sayako, Sugiyama Ayato, Kanie Kei, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Ali Manahil, Ito Yuki, Miura Jiro, Hirose Yujiro, Uto Koichiro, Ebara Mitsuhiro, Kato Ryuji, Yamawaki-Ogata Aika, Narita Yuji, Kawabata Shigetada, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 12
2. 論文標題 Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 937 ~ 937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12040937	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡本 基岐, 高橋 雄介, 黄 海玲, 小道 俊吾, Manahil Ali, 渡邊 昌克, 松本 紗也子, 林 美加子
2. 発表標題 生物学的覆髄材料の臨床的評価を目指したラット覆髄モデルの開発.
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Watanabe M, Huang H, Cooper P, Hayashi M.
2. 発表標題 The role of mTOR signal on reactionary and reparative dentin formation in vivo.
3. 学会等名 Pulp Biology Regeneration Group symposium 2019 (国際学会)
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
研究協力者	渡邊 昌克 (Watanabe Masakatsu)	大阪大学・歯学研究科・大学院生 (14401)	
研究協力者	黄 海玲 (Huang Hailing)	大阪大学・歯学研究科・大学院生 (14401)	

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
---------	---------