

機関番号：33902

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592245

研究課題名 (和文) 歯髄再生促進因子を用いた新しい歯髄治療薬の開発

研究課題名 (英文) Novel pulp treatment agent with stimulator for pulp regeneration

研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60291770

研究成果の概要 (和文)：本研究は、歯髄創傷治癒モデルにおいて血管新生、歯髄創傷治癒・歯髄再生を促進する蛋白質を解析し、歯髄創傷時あるいは歯髄炎症時に、より早期に確実に歯髄再生に導く蛋白質療法を開発することを目的とする。当初の予定では、ラット歯髄創傷モデルを用いて、歯髄創傷治癒促進因子をプロテオーム解析により網羅的に解析する予定であったが、二次元電気泳動のためには、ラット切歯創傷時、創傷治癒途中、治癒後の歯髄から得られる蛋白量は十分ではなく、高い感度が得られなかったため、創傷治癒途中に特異的なスポットが得られなかった。よって、歯髄創傷治癒を促進する蛋白質は、歯髄幹細胞に対する遊走能が高いことが予想されたため、*in vitro*において、TAXIScan-FLを用いた水平化学走化性分析において、様々な遊走因子とその濃度勾配によるヒト歯髄幹細胞の遊走能の違いを時間経過で観察した。その結果、BDNFは非常に早く、SDF-1およびbFGFも比較的早く、GDNF、VEGF、MMP3、G-CSFは徐々に遊走が進み、遊走細胞数は10ng/ μ lが最も多くみられた。このうち、G-CSFは、すでに造血幹細胞の骨髓から末梢血中への動員の効能により、医薬品として認可されているため、歯髄創傷治癒促進因子としての有用性をイヌ歯髄切断面にスポンゼルとともに適用した。その結果、100ngではほとんど効果がみられなかった。今後、濃度と scaffold を変えて同様に検討する予定である。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of the present study was to analyze the protein that promotes vascularization, pulp wound healing and pulp regeneration to develop the protein therapy that promotes dental pulp healing earlier and safer at the time of pulp injury or the pulpitis. Though it was scheduled to analyze systematically the pulp stimulating factor by Mass spectrometry analyses in the rat dental pulp wound healing model at the beginning of the research, the amount of the protein obtained from the dental pulp tissue immediately after rat incisor pulp injury, during pulp wound healing process and after pulp healing was not enough and the sensitivity was not high. Therefore, a special spot was not detected by the two-dimensional electrophoretic analyses. It was speculated that the protein to enhance pulp wound healing may have high migratory effect. The migratory effect of the variety of migration factors and their concentration gradient was examined in the human dental pulp stem cells in the horizontal chemotaxis assay by TAXIScan-FL *in vitro*. BDNF had the highest effect, SDF-1 and bFGF had also comparatively higher effect on migration, and GDNF, VEGF, MMP3, and G-CSF stimulated migration gradually. The final concentration, 10ng/ μ l was the highest in the number of migrating cells. Among these, G-CSF was applied on the amputated pulp with spongel to examine the effect as the pulp stimulating factor, because it had already been approved as a medicine by the effect of the mobilization of the hemopoietic stem cells from the bone marrow to the peripheral blood. As a result, the effect was hardly seen in 100ng. It is scheduled to change the density and scaffold and to examine it similarly in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯髄炎治療薬、歯髄再生促進因子、プロテオミクス、質量分析、歯髄創傷治療法、ショットガン法

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、歯の寿命を高めるためには、歯髄をできるだけ長く保存する必要があると考えられる。歯髄再生に関して、現在のところ、根尖を1mm以上拡大し、徹底的な洗浄・消毒後根管を血餅で満たすと歯髄が再生されるという報告がある¹⁾。しかしながら、根管内に血管を新生させ、歯髄再生を促進させるために安全で有効なscaffoldならびに誘導因子の解明はなされておらず、抜髄後あるいは感染根管治療後に確実に歯髄を再生させる方法はいまだ確立されていない。私どもでは近年、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生による新しい歯髄治療法の開発を進めてきた。まず、歯髄組織から、血管新生能に優れた歯髄幹細胞を多く含むCD31⁺;CD146⁻ side population (SP)細胞を分取した。その細胞をマウス下肢虚血部に移植すると血管新生が促進され、イスの歯髄切断面上に自家移植すると完全に歯髄が再生されることを明らかにした^{2,3)}。またマイクロアレイ分析により、この歯髄由来CD31⁺;CD146⁻ SP細胞ではCD31⁺;CD146⁻ SP細胞と比較し、血管新生に関与する種々の前血管因子/サイトカインおよび基質分解酵素が高発現していることを明らかにした。特に、幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走、サイトカインやそのレセプターの活性制御、結合組織リモデリングや創傷治癒、血管新生促進など多岐にわたる機能を有するといわれているMMP1およびMMP3は数千倍以上のmRNA発現の上昇がみられた²⁾。次に、ラット歯髄創傷治療モデルを用いてMMP3の時間的・空間的発現の変化を検討すると、生活歯髄切断処置後24時間で最大のmRNA発現上昇を示し、歯髄切断面下の歯髄の血管周囲に遊走してきた歯髄幹細胞にMMP3の発現が

みられた。in vitroではMMP3は血管内皮細胞に対して、増殖、遊走、アポトーシス抑制作用を有した³⁾。これらの結果より、このラット歯髄創傷治療モデルにおいて、処置後24時間で歯髄幹細胞が創傷面に遊走し、MMP3をはじめとする血管新生あるいは歯髄再生に重要な因子を分泌する可能性が示唆された。一方、近年、質量分析計の技術革新および蛋白質・核酸配列データベースの充実により、蛋白質を大規模解析し、蛋白質の機能や細胞の機能情報ネットワークを明らかにする「プロテオミクス」研究が急速に進展しつつある。したがって、今回、この歯髄創傷治療モデルにおいて処置後24時間サンプルを処置直後と比較し、血管新生、歯髄創傷治療・歯髄再生を促進する蛋白質をプロテオミクスにより網羅的に解析する着想に至った。

1) Murray PE, Garcia-Gosoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. J Endod. 2007; 33(4), 377-390.

2) Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K. and Nakashima M. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells 26: 2408-2418, 2008.

3) Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H. and Nakashima M: Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. Amer. J. Pathol. 175(5): 1905-1914, 2009.

2. 研究の目的

歯髄創傷治療過程において血管新生、歯髄創傷治療・歯髄再生を促進する蛋白質をプロテオミクスにより網羅的に解析し、歯髄創傷時あるいは歯髄炎症時に、より早期に確実に歯髄再生に導く蛋白質療法を開発す

ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イヌ歯髄組織の蛋白質の網羅的プロテオーム解析

① イヌ歯髄創傷治癒過程からの蛋白質の分離・濃縮

正常歯髄ならびに生活歯髄切断2日、7日後のサンプルの歯髄組織を細切し、血液成分を除去後、PBSに溶解し、超音波にて粉碎後それぞれ Trizol に溶解し、RNA 抽出後、フェノール-エタノール上清からイソプロピルアルコールを用いて抽出する。沈殿物を 0.3M グアニジン塩酸(95%エタノール溶解)にて洗浄後、遠心し、さらに 80%エタノールにて洗浄し、蛋白質を得た。

② SDS-PAGE および in-gel digestion

①のサンプルを 5-20%グラジエントゲルにて電気泳動し、銀染色後、パターンを比較し、24 時間に特異的なスポットを得る。それぞれのスポットのゲルを脱塩し、acetonitrile 中で溶出し、凍結乾燥後トリプシン処理後、Zip-Tip μ C18 で濃縮した。

③ 質量分析

得られたペプチドをマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF/MS)にてペプチド断片の質量を測定し、得られた結果はデータベースを用い、PMF 法により蛋白質を同定した。また、蛋白質が微量である場合には、電気泳動を用いず、直接トリプシンで消化し、ナノ高速液体クロマトグラフィタンデム質量分析装置(nano LC-MS/MS)を用いてショットガン法により解析した。そして、その中に含まれるペプチドの質量と内部アミノ酸情報から蛋白質を同定した。

(2) 種々の遊走因子による歯髄幹細胞の遊走能

① TaxiScan による歯髄幹細胞の遊走に有効な遊走因子の比較

real time 水平化学走化性分析はイヌ 4 代目の歯髄幹細胞 CD31⁺SP 細胞を用いた。

TAXIScan-FL (Effector Cell Institute, 東京) は、6 μ m の孔のあいた silicon 及びガラスプレート間に、細胞の大きさに最適化(8 μ m)したチャンネルを形成し、チャンネル内の一端に細胞(10⁵cells/ml を 1 μ l)を注入した。10ng/ μ l の各種遊走因子 (BDNF, SDF-1, bFGF, GDNF, VEGF, MMP3, G-CSF, PDGF, GM-CSF)を一定濃度勾配に形成させるように 1 μ l ずつ反対側に置いた。遊走の video 像から、30 分ごとの遊走細胞数を 4 時間ま

で計測した。

② TaxiScan による歯髄幹細胞の遊走に有効な遊走因子の濃度

TAXIScan-FL のマイクロチャンネルにイヌ 4 代目の歯髄幹細胞 CD31⁺SP 細胞を 10⁵cells/ml を 1 μ l 注入し、G-CSF の濃度を 0,0.1,1,5,10,20,40,100ng/ μ l で 1 μ l ずつ、反対側にいれ、遊走の video 像から、30 分ごとの遊走細胞数を 1 時間半まで計測した。

(3) イヌ生活歯髄切断における G-CSF による歯髄幹細胞の遊走・増殖の検討
全身麻酔後、イヌ上顎犬歯の完全根尖完成歯の歯髄を生活歯髄切断し、軽度の歯髄炎を起こさせた後、G-CSF 100ng を歯髄切断面に塗布した。その上にスポンゼルを軽圧にて置き、窩洞はリン酸亜鉛セメント及びボンディング材で処理した後、コンポジットレジンで修復した。コントロールとして、PBS 塗布を用いた。14 日後に標本を作製し、形態分析のために 4%paraformaldehyde(PFA)で 4°C一晩固定し、10%ギ酸にて脱灰後、paraffin 切片(厚さ 5 μ m)を HE 染色し、形態学的に観察した。

4. 研究成果

(1) イヌ歯髄組織の蛋白質の網羅的プロテオーム解析

イヌの歯 1 本分の蛋白質が微量であるため、直接、nano LC-MS/MS を用いてショットガン法により解析した。その中に含まれるペプチドの質量と内部アミノ酸情報から、イヌのデータベースにより蛋白質を同定したところ、535 種類の蛋白質が得られた。さらに、正常歯髄とともに、イヌの生活歯髄切断後 2 日および 7 日の歯髄組織も同様に処理を行って比較、解析し、生活歯髄切断後 2 日に高発現する歯髄再生促進因子を検討したが、特に重要と考えられる蛋白質は同定できなかった。よって、以後、歯髄創傷治癒を促進する蛋白質は歯髄幹細胞に対する遊走能が高いことが予想されたため、以下のように、種々の遊走因子の歯髄再生に対する効果を in vitro および in vivo で検討した。

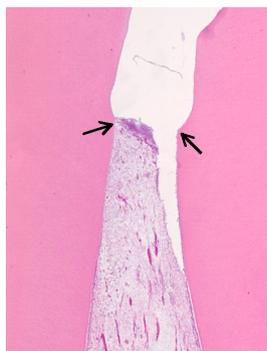
(2) 種々の遊走因子による歯髄幹細胞の遊走能

TAXIScan-FL を用いて、遊走因子による遊走能の違いを時間経過で観察したところ、BDNF は非常に早く歯髄幹細胞が遊走し、2 時間でプラトーに達した。SDF-1 および bFGF も比較的早く遊走が進んだ。GDNF、VEGF、MMP3、G-CSF とともに徐々に遊走細胞が増加し、4 時間後には、PDGF、GM-CSF 以外、ほぼ同一の遊走

細胞数となった。

G-CSF の濃度の違いによる遊走能の違いを時間経過観察すると、10ng/μl が最も遊走細胞数が多く、ついで、5、40、20、100、1、0.1ng/μl の順に遊走細胞数の減少がみられた。

(3) イヌ生活歯髄切断における G-CSF による歯髄幹細胞の遊走・増殖の検討
イヌの生活歯髄切断による軽度の歯髄炎に G-CSF100ng 塗布した場合、炎症の増悪はみられなかったが、特に、歯髄幹細胞の遊走や増殖の促進はみられなかった (図 1)。よって、今後、GCSF の濃度および scaffold を変えて同様に検討する予定である。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

中島美砂子: 教育講演 「歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生 新しいう蝕・歯髄炎治療の実用化を目指して」 第 48 回日本小児歯科学会大会 名古屋 2010 年 5 月 20 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 60291770

(2) 研究分担者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 40064878

中島 美砂子 (NAKASHIMA MISAKO)
国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・室長

研究者番号: 20207773

渡邊 淳 (WATANABE ATUSHI)

国立長寿医療研究センター・共同利用推進室・室長

研究者番号: 90321843

(H20、H21)