

機関番号：33902
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390512
 研究課題名（和文）安定型マトリックスメタロプロテナーゼ3を用いた新しい歯髄炎治療薬の開発

研究課題名（英文）Matrix metalloproteinase-3 in a stable form, a novel medicament for pulpitis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：感染の程度が異なるイヌ不可逆性歯髄炎モデルを確立し、MMP-3の効果を検討した。MMP-3処理後14日目まで血管と神経を伴う歯髄組織の再生が観察され、28日目まで象牙質マトリックス形成がみられた。未処理の歯髄組織は壊死していた。MMP-3処理群では3～7日目でコントロール群と比較してマクロファージや抗原提示細胞の浸潤は減少し、またIL-6の発現が有意に低下していた。これらの結果はMMP-3の抗炎症作用を示唆しており、MMP-3が新しい不可逆性歯髄炎の治療薬の候補として有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the canine model of irreversible pulpitis was established to examine the effect of MMP-3 in the inflamed pulp tissues. Regeneration of pulp tissue with vasculature and nerves was observed in this pulpitis model 14 days after MMP-3 treatment, followed by dentin matrix formation on the exposed pulp tissues by day 28. In the absence of MMP-3, whole pulp necrosis was observed on day 14 to 28. Infiltration of macrophage and antigen-presenting cells was significantly inhibited in MMP-3 treated pulp tissues compared with control on day 3 to 7. IL-6 expression was significantly decreased as early as day 3 in MMP-3 treated pulp. These results suggest that MMP-3 has anti-inflammatory effect and is promising drug candidates for irreversible pulpitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：再生歯学、MMP3（マトリックスメタロプロテナーゼ3）、抗炎症作用、
 歯髄炎治療薬、歯髄再生

1. 研究開始当初の背景

マトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)は主として細胞外マトリックスを分解する酵素群であり、病的組織破壊において主役を演じている。これまで、MMPに関する実験的および臨床データの多くが癌や関節炎で蓄積されてきた。よって、動物実験で効果が確認

されたMMP合成インヒビターが癌や関節炎の治療薬として臨床治験でその効果が検討された。しかし、全てのMMP合成インヒビターは有効性を示すことが出来ず、筋肉の痛みやこわばりが副作用として観察されたため治験は中止された。この結果はMMPの機能を再考する必要性を示唆している。最近の研究結

果からは MMP は細胞外マトリックスを分解するのみならず、細胞増殖、分化、血管新生、細胞死に関わる生理活性分子を切断することが明らかになっており、炎症における MMP の機能はこのように 2 面性を持つことが推測されている。

歯髄炎はう蝕と細菌感染によって引き起こされる。歯髄炎は感染に対する自然免疫とそれに続く獲得免疫の段階から構成される。歯髄ではまず象牙芽細胞がう蝕中の細菌に反応し様々な走化因子を放出し、続いて樹状細胞が誘導される。感染が持続すると獲得免疫反応が誘導される。歯髄炎は可逆性、不可逆性歯髄炎を経て壊死へと進行する。一旦露髄し細菌が感染すると、歯髄炎は不可逆性となり自然治癒は期待出来ないため、抜髄が唯一の治療手段になる。歯髄組織は歯牙象牙質の代謝に関わりその機能を維持する働きをもつため、歯髄組織の除去後は歯牙が劣化し抜歯の可能性が高まる。よって新しい歯髄炎治療薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

私達の以前の報告で MMP-3 が非感染性歯髄炎において細胞増殖、運動、血管新生を誘導することをラット歯髄炎モデルで示した。よって、本研究では感染した歯髄において MMP-3 が同様の効果を発揮するかを検討するために、感染の程度が異なるイヌ不可逆性歯髄炎モデルを確立し MMP-3 の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) イヌ不可逆性歯髄炎モデルの確立

雌ビーグル犬 (9 ヶ月) の大白歯の歯冠部を麻酔下で切断し、歯髄を露出し切断する (図 1A)。その後 24 時間開放し感染させた歯髄炎、72 時間開放し感染させた歯髄炎モデルを作製した。

(2) イヌ不可逆性歯髄炎モデルへの MMP-3 の適用

(1) で作製した歯髄炎に 50ng の精製 MMP-3 を適用しリン酸セメントで仮封した (図 1A)。さらに生理食塩水を適用した歯髄炎を比較対照群とした。

(3) 組織学的検討

組織学的検討にはイヌ 24 匹、歯牙 78 本を用いた。抜歯した歯牙は 4%パラホルムアルデヒドで固定し脱灰後パラフィンに包埋し薄切し切片を作製した。パラフィン切片は HE、マッソントリクロム染色、免疫染色に用いた。免疫染色に用いた抗体は BS-1 lectin (Vector Laboratories)、anti-TuJ1 (Covance)、anti-GAP43 (Chemicon)、anti-CD68 (abcam)、

anti-MHC class II (AbD Serotec) である。1 次抗体反応後 HRP ラベル 2 次抗体を反応させ diaminobenzidine solution (Vector Laboratories) で発色した。

(4) IL-6 および TNF α タンパク量測定

歯髄組織中の IL-6 および TNF α タンパク濃度を測定するためにイヌ 7 匹から 28 本の歯牙を用いて歯髄組織を摘出し組織ホモジネートを作製した。組織ホモジネート中の IL-6 および TNF α タンパク濃度は ELISA kit (R&D Systems) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 軽度および重度不可逆性イヌ歯髄炎モデルの確立

歯髄切断後 24 時間開放した歯髄では血管拡張、好中球の浸潤が切断歯髄直下に観察された (図 1B)。72 時間開放した歯髄では炎症細胞の浸潤が歯根中央部まで広がっていた (図 1C)。さらにいずれの歯髄組織も仮封後 14 日目には壊死していた。以上の結果から 24 時間開放、72 時間開放歯髄をそれぞれ軽度または重度不可逆性歯髄炎モデルとした。

Figure 1

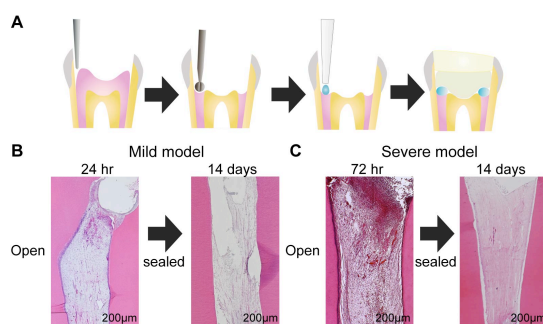
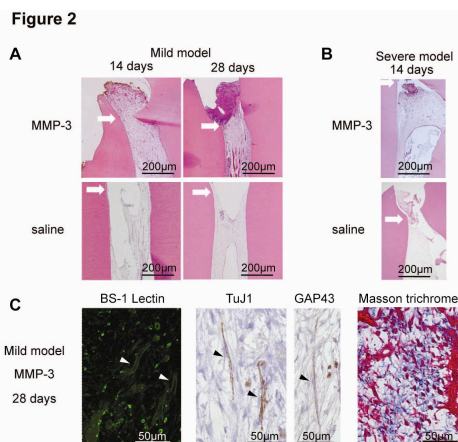


図 1 軽度および重度不可逆性歯髄炎モデルの組織像

(2) 不可逆性歯髄炎モデルでの MMP-3 による歯髄組織再生

(1) で確立した軽度および重度歯髄炎モデルでの MMP-3 の効果を検討した。軽度歯髄炎モデルに MMP-3 を処理後、14 および 28 日後に観察したところ歯髄組織は壊死することなく再生していた (図 2A)。一方、生理食塩水を処理した歯髄は 14 日および 28 日後で壊死していた。また MMP-3 処理した重度歯髄炎は軽度歯髄炎と異なり 14 日目で歯髄組織は壊死していた (図 2B)。次に、軽度歯髄炎に MMP-3 を処理後 28 日の標本を用いて再生した歯髄組織の検討を行った。再生歯髄には BS-1 レクチン陽性の新生血管、TuJ1 または GAP43 陽性の神経細胞が観察され、マッソントリクロム染色ではコラーゲンの産生も確認された (図 2C)。

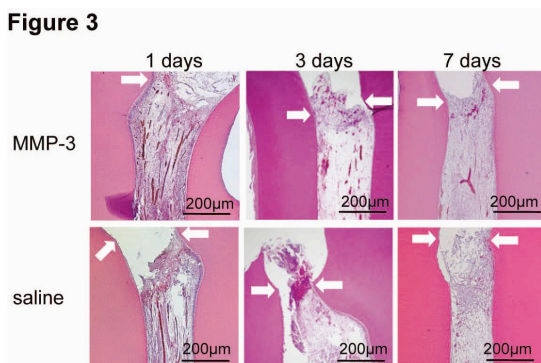
図2 軽度歯髄炎モデルでのMMP-3による歯髄組織再生



(3) MMP-3による炎症細胞浸潤の抑制
 軽度歯髄炎モデルを用いて、MMP-3処理後の治癒の経時変化を観察した(図3)。MMP-3処理後1日目では切断歯髄直下に炎症細胞の浸潤が観察されたが、3日および7日後ではこれらの炎症細胞は消失し切断した歯髄より上部に再生歯髄組織が増殖していた。一方、生理食塩水を処理した群では炎症細胞浸潤の抑制は観察されず、7日目まで歯髄組織は壊死していた。

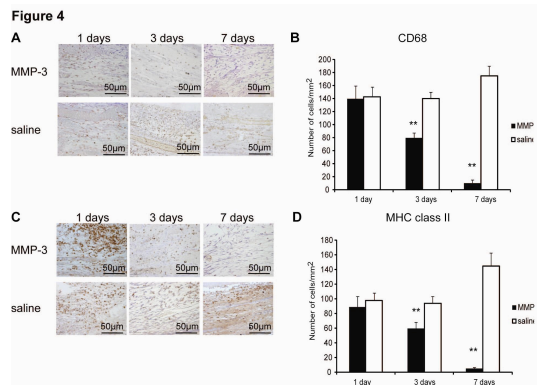
図3 軽度歯髄炎モデルでの経時変化

さらに、抗CD68抗体と抗MHC class II抗体



体を用いてマクロファージと抗原提示細胞の局在をそれぞれ検討した。MMP-3処理後3日目の歯髄でマクロファージはコントロールに比較して約50%程度減少し、7日目ではほとんど観察されなかった(図4A, B)。また、抗原提示細胞はMMP-3処理後3日目の歯髄でコントロールに比較して約30%程度減少し、7日目ではほとんど観察されなかった(図4C, D)。

図4 軽度歯髄炎モデルでのマクロファージおよび抗原提示細胞の局在



(4) MMP-3による炎症性サイトカイン発現の抑制

(3)の免疫染色の結果でMMP-3処理後3日目より炎症細胞浸潤の抑制が観察された。よって、MMP-3処理後3日目の歯髄を摘出し組織ホモジネートを作製し、炎症性サイトカインIL-6およびTNF α のタンパク量をELISAで測定した。その結果、IL-6の発現はMMP-3処理によりコントロールと比較して有意に低下していた(図5A)。一方、TNF α の発現は変化がなかった(図5B)。

Figure 5

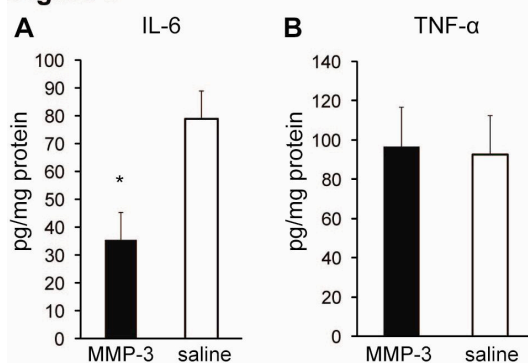


図5 軽度歯髄炎モデル歯髄組織ホモジネート中のIL-6およびTNF α タンパク量

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1件)

- ① Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M., Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. Amer. J. Pathol. 査読有、175(5), 2009,

1905-1914.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 中島美砂子: 歯髄再生による新しい歯内治療法の臨床研究に向けて. 第 38 回福岡歯科大学学会総会/シンポジウム、福岡、2011 年 12 月 11 日
- ② 尾関伸明、折本 愛、川合里絵、田中 毅、中田和彦、中村 洋: iPS 細胞と ES 細胞における炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 の役割. 第 9 回日本再生歯科医学会、大阪、2011 年 9 月 10 日
- ③ 中島美砂子: 歯髄再生による新しい歯内治療法の開発. 大阪歯科大学大学院 50 周年記念講演会、大阪、2011 年 9 月 8 日
- ④ 尾関伸明、折本 愛、川合里絵、田中 毅、中田和彦、中村 洋: 歯髄細胞における炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 の役割. 第 134 回日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会、千葉、2011 年 6 月 10 日
- ⑤ 尾関伸明、折本 愛、川合里絵、田中 毅、中田和彦、中村 洋: 歯髄細胞と万能幹細胞における炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 の役割. 第 78 回愛知学院大学歯学会、名古屋、2011 年 6 月 5 日
- ⑥ 中島美砂子: スーパー特区を活用した歯科再生医療の推進. 平成 22 年度あいち健康長寿産業クラスター成果発表会、愛知、2011 年 3 月 18 日
- ⑦ 中島美砂子: 象牙質・歯髄再生による新しい蝕・歯髄炎治療法の実用化の現状と課題. 第 10 回日本再生医療学会総会/シンポジウム、東京 2011 年 3 月 2 日
- ⑧ Nakamura H, Eba H, Iohara K, Matsushita K, Nakata K, Nakashima M: MMP-3 accelerates dental pulp healing in partial pulpitis model in the dog. International Federation of Endodontic Associations, 8th World Endodontic Congress, Athens, Greece, 2010, October 7.
- ⑨ 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生による新しい蝕・歯髄炎治療法の開発. 第 64 回日本口腔科学会学術集会、札幌、2010 年 6 月 24 日
- ⑩ 江場久哲、中島美砂子、庵原耕一郎、松下健二、中田和彦、中村 洋: MMP-3 はイス一部性歯髄炎モデルにおいて歯髄治癒を促進する. 第 132 回日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会、熊本、2010 年 6 月 4 日
- ⑪ 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生. 第 6 回長崎障害者支援再生医療研究会、長崎、2010 年 2 月 23 日

- ⑫ 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生. 愛知学院大学口腔先端科学研究所講演会、名古屋、2010 年 2 月 19 日
- ⑬ 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生/口腔 QOL 連続シンポジウム in Tokushima 2009-2010、徳島、2010 年 1 月 22 日
- ⑭ 中島美砂子: 歯髄幹細胞を用いた歯髄の再生. 第 130 回日本歯科保存学会 2009 年度春季学術大会、北海道、2009 年 6 月 12 日

[図書] (計 1 件)

- ① 中島美砂子、クインテッセンス出版株式会社、シリーズ MIT に基づく歯科臨床 治療の歯内療法 「歯髄再生療法の現状と将来」2010、9 ページ

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

- ① 名称: 薬剤、歯科材料、及びスクリーニング方法: 歯髄及び/又は象牙質形成促進のための薬剤及びその利用
発明者: 中島美砂子、中村 洋
2010 年 10 月 6 日
12/936474 (米国移行番号)
09730839.9 (欧州移行番号)
200980112243.1 (中国移行番号)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 40064878
- (2) 研究分担者
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

中田 和彦 (NAKATA KAZUHIKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 70265865

江口 傑徳 (EGUCHI TAKANORI)
国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・室長 (前)
研究者番号: 20457229