

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592342

研究課題名（和文） 歯髄常在性マクロファージの起源と機能解析

研究課題名（英文） *In situ* proliferation and differentiation of macrophages in the dental pulp

研究代表者

中村 雅典 (NAKAMURA MASANORI)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50180394

研究成果の概要（和文）：

未だマクロファージ（Mφ）の分化、機能については議論の的となっており、統一された見解はない。歯髄内において常在性 Mφ の存在はよく知られているが、その場で増殖・分化するか、或いは血流を介して供給されるかは不明である。本研究では、正常 ICR マウスの発生過程における歯髄内常在性 Mφ の増殖・分化について、*in vivo* および、血流を完全に遮断した器官培養系（*in vitro*）を用いて解析を行った。

*in vivo* では生後 0 日から生後 5 日、*in vitro* は胎生 16 日下顎第一臼歯歯胚を摘出し 14 日まで培養を行った。さらに、増殖・分化因子の影響を調べるため M-CSF 中和抗体を用いた器官培養も行い、4%パラホルムアルデヒド固定、EDTA 脱灰後、凍結包埋を行った。各々の試料は、H-E 染色、Mφ 抗体である F4/80、CD68 を用いて免疫組織染色を行った。また、*in vivo* および、培養歯胚より実体顕微鏡下で歯乳頭、あるいは歯髄を分離し、Mφ の増殖・分化に関する因子の検出のため M-CSF や GM-CSF 等の mRNA 発現を RT-PCR を用いて検索した。

歯髄内の F4/80+、CD68+ Mφ 数は *in vivo* と *in vitro* で経目的に増加し、両者とも類似した成長曲線を示した。RT-PCR 分析では、両者で GM-, G-CSF mRNA の発現は弱かったものの、それぞれの歯乳頭、歯髄より GM-, G-, M-CSF の mRNA 発現が認められた。M-CSF mRNA は最も強く恒常的な発現を示した。M-CSF 中和抗体を用いた器官培養系においては歯髄内常在性 Mφ の増殖抑制を示した。M-CSF は、歯髄常在性マクロファージの発現に対する可能性が高い分子である可能性がある。そして、血清因子は、直接常在性マクロファージの発現に作用する可能性はない。これらの結果より、歯髄常在性 Mφ は歯髄内で増殖・分化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is well recognized that resident macrophages exist in the dental pulp. However, it is uncertain whether these macrophages proliferate and differentiate in the dental pulp *in situ*, or whether they constantly migrate from the blood stream into the dental pulp. In this study, we examined and compared the development of dental pulp macrophages in an organ culture system by using *in vivo* tooth organs to clarify the developmental mechanism of these macrophages. The first mandibular molar tooth organs from the ICR strain mice aged between 16-days of gestation (E16) to 5-days postnatal (5dPN) were used for *in vivo* experiments. The E16 first mandibular molar tooth organs were cultured for up to 14 days with or without 10% fetal bovine serum. Dental pulp tissues were analyzed with

immunohistochemistry to detect the macrophages and with RT-PCR for the detection of factors related to the macrophage development. The growth curves for the *in vivo*- and *in vitro*-cultured cells revealed similar numbers of F4/80 positive macrophages in the dental pulp. RT-PCR analysis indicated the constant expression of M-CSF in both *in vivo*- and *in vitro*-cultured dental pulp tissues. Anti-M-CSF antibodies significantly inhibited the increase in the number of resident macrophages in the dental pulp. These results suggested that (1) most of the dental pulp macrophages proliferated and differentiated in the dental pulp without a supply of precursor cells from the blood stream, (2) M-CSF might be the candidate molecule for the development of dental pulp macrophages, and (3) serum factors might not directly affect the development of the macrophages.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）マクロファージ、歯胚、M-CSF、GM-CSF、細胞分化

#### 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは1892年 Metchnikoff によって命名され、その後、Aschoff-清野の細網内皮系統学説、1970年以降は van Furth らの単核性食細胞系学説のもと単球に由来する細胞として位置づけられてきた。しかしながら現在まで、その発生、分化については未だ論争が続いている。更に、系統発生、個体発生のみならず一個体内における膨大なマクロファージの役割にも多くの未解決な問題が残されたままである。マクロファージには組織内に存在している組織常在性マクロファージと炎症等により誘導されてくる浸出性マクロファージが存在するが、現在主流をなしている van Furth らによる単核性食細胞系学説によれば、全てのマクロファージは血管内から血管外に流出した単球が分化し

たものであり、マクロファージの局所組織内における増殖に関してはこれを基本的に否定している。

歯髄内には多くのマクロファージが存在することが知られている。また、近年の我々の研究により、歯冠歯髄と歯根歯髄内におけるマクロファージの局在が異なること、更には歯の発生過程における歯髄内マクロファージの免疫組織学的解析から、歯髄組織内でマクロファージが分化している可能性を示す所見を得た。エナメル質を除く他の歯の組織は神経堤細胞由来であるとされている。歯髄組織に存在するマクロファージが van Furth らの主張する単球由来であるのか、他の中胚葉由来間葉細胞或いは神経堤細胞に由来するのに関しても現在まで明確なデータはない。歯は器官培養により、その組織

形態を *in vivo* の形態と近いものに再現できる優れた器官でもある。器官培養時には生体から歯胚を取り出すために、器官培養系では造血組織からの単球の供給を否定することができる。このように、個体発生、移植系並びに器官培養法を用いて歯髄内に定着するマクロファージの動態を解析することは、これまでのマクロファージの論争に答えを示す有力な組織と考えられる。

## 2. 研究の目的

歯髄内に存在するマクロファージが血流を介して供給されるの単球由来の細胞であるのか、あるいは歯髄組織内で増殖・分化するのかについて血流を遮断した状態となる歯胚の器官培養系を用いて免疫組織化学的に解析するとともに、増殖・分化に関与する増殖因子についてもあわせて解析を行う。

## 3. 研究の方法

使用マウス：ICR 系マウス

*In vivo* における解析

### ○免疫組織学的解析

胎生期から生後6週までの下顎第一臼歯（歯胚）を用いて、歯髄内マクロファージを各種抗マクロファージ抗体（F/80, MOMA-1, MOMA-2, BM8, CD14, CD68, Ia 等）を用いて、染色を行い、経時的なマクロファージの局在、性状の変化を解析する。

### ○BrdU ラベル歯髄の免疫組織学的解析

BrdU により歯髄増殖細胞をラベルし、BrdU とマクロファージ抗体による二重免疫組織染色を行い、マクロファージの歯髄内における増殖について解析を行う。

### ○超微形態学的解析

歯髄内におけるマクロファージの超微形態学的構造を解析し、過去の報告との整合性を図る。

○歯髄内におけるマクロファージ増殖、分化制御因子の解析

マクロファージの増殖、分化制御に関与するサイトカイン mRNA (M-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-6 等) の発現、局在を PT-PCR と *in situ hybridization* により解析を行う。

器官培養系を用いた解析

### ○免疫組織学的解析

胎生14ないし16日の歯胚を器官培養し、その培養過程の歯胚におけるマクロファージを各種抗マクロファージ抗体を用いて、染色を行い、経時的なマクロファージの局在、性状の変化を解析し、*in vivo* における結果との比較検討を行う。

### ○BrdU ラベル歯髄の免疫組織学的解析

BrdU により歯髄増殖細胞をラベルし、BrdU とマクロファージ抗体による二重免疫組織染色でマクロファージの歯髄内における増殖について解析し、*in vivo* における結果との比較検討を行う。

### ○超微形態学的解析

歯髄内におけるマクロファージの超微形態学的構造を解析し、*in vivo* における結果との比較検討を行う。

○歯髄内におけるマクロファージ増殖、分化制御因子の解析

マクロファージの増殖、分化制御に関与するサイトカイン mRNA の発現と局在を解析し、*in vivo* における結果と比較検討を行う。

## 4. 研究成果

*In vivo* における解析では、胎生16日の歯胚では、F4/80, ER-MP20, 並びに ER-MP58 陽性細胞は認められるが、CD68 陽性細胞は認められなかった。経日的に F4/80 と CD68 陽性細胞は増加したが、ER-MP20 と ER-MP58 陽性細胞は増加しなかった（図1 A, D）。歯胚培養系においても同様の結果が認められた（図1 B, C, E, F）。

歯髄内でマクロファージが増殖している

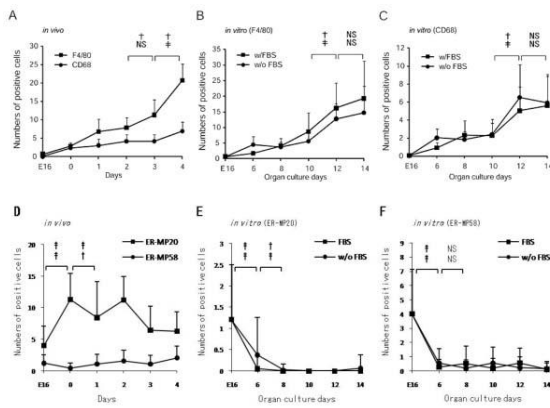


図1 in vivoにおけるマクロファージ増殖

かについてPCNAとF4/80による二重染色を行ったところ、共陽性細胞が認められたことから、歯髄内で増殖していることが示された(図2)。

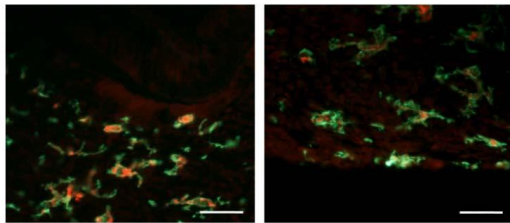


図2 PCNA(red)とF4/80(green)の二重染色

次に、分化・増殖に関与する因子についてPT-PRCを用いて解析したところ、GM-CSFとM-CSFが強い発現を示した(図3)ことから、M-CSFの中和抗体を用いて器官培養したところ、マクロファージの増殖・分化が抑制された(図4)。

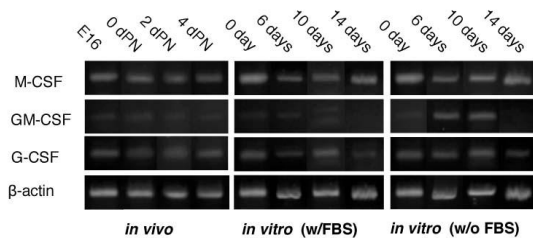


図3 in vivoと歯胚培養でのRT-PCR所見

以上の結果から、歯髄常在性マクロファージは歯髄内で分化・増殖することが明らかとなった。また、その分化・増殖を促す因子として、M-CSFが重要であることも合わせて明らかとなった。

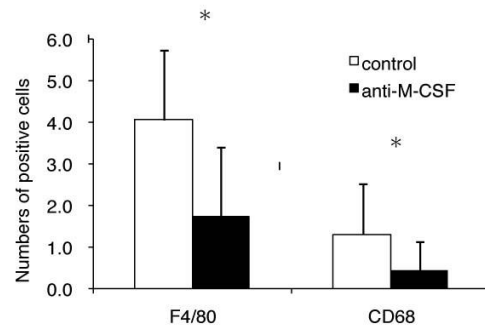


図4 抗M-CSF抗体による抑制

## 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 19 件)

Shibata M, Goto N, Goto J, Nonaka N, Nakamura

M. Morphometric and functional correlation of human neuronal somata: Pyramidal motor, special sensory and general sensory systems. Okajima Folia Anat Jpn 85: 115-117, 2009

Takahashi T, Ibata M, Yu Z, Shikama Y, Endo Y, Miyauchi Y, Nakamura M, Tashiro-Yamaji J,

Miura-Takeda S, Shimizu T, Okada M, Ueda K, Kubota T, Yoshida R. Rejection of

intradermally injected syngeneic tumor cells from mice by specific elimination of

tumor-associated macrophages with

liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate, followed by induction of

CD11b(+)/CCR3 (-)/Gr-1 (-) cells cytotoxic against the tumor cells. Cancer Immunol

Immunother 58: 2011-2023 2009

Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R,

Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Wada N, Nohno

T, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R. Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in

interdigital programmed cell death during limb development. Dev Biol 335: 396-406

2009

- Yu Z, Ohba M, Nakamura M, Sasano T, Ono M, Sugawara S, Endo Y. Dynamics of platelet mobilization into lungs in response to 5-hydroxytryptamine (serotonin) in mice. *Thrombosis and Haemostasis* 102:1251-8 2009
- Shirota T, Nakamura A, Matsui Y, Hatori M, Nakamura M, Shintani S: Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants in the maxilla: report of a case. *Clin Oral Implants Res.* 20:1402-8 2009
- Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through RANKL expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A.* 15:3991-4000 2009
- Fujioka M, Sasa R, Inoue M, Nakamura M: Immunological Characterization of Junctional Epithelium: An Immunohistochemical Study. *Dent Med Res* 29:253-258, 2009
- Murayama T, Endo Y, Kawawa T, Baba K, Nakamura M: Direct Resorption of Calcified Cartilage by Macrophages during Primary Bone Marrow Cavity Formation. *Dent Med Res* 30:1-8, 2010
- Miyauchi Y, Mayahara M, Sasa R, Inoue M, Nakamura M: Localization and Phenotype of Resident Macrophages in the Dental Pulp during Rat Mandibular First Molar Development. *Dent Med Res* 30:15-21, 2010
- Nagai Y, Mayahara M, Suzuki O, Hisamitsu H, Nakamura M: Morphometrical, Histological and Ultrastructural Analyses of Bone Formation and Resorption Induced by Synthetic Octacalcium Phosphate in Mouse Bone Marrow. *Dent Med Res* 30:29-35, 2010
- Nakayama M, Yagi H, Endo Y, Maki K, Nakamura M: Direct Bone Destruction by Neutrophils in Collagen-induced Arthritis Treated with Bisphosphonates. *Dent Med Res* 30:211-218, 2010
- Tsuzurahara F, Nakamura M: Macrophages Are Key Cells for the Initiation of Meckel's Cartilage Disappearance. *J Oral Biosci* 52:150-154, 2010
- Yoda E, Hachisu K, Taketomi Y, Yoshida K, Nakamura M, Ikeda K, Taguchi R, Nakatani Y, Kuwata H, Murakami M, Kudo I, Hara S: Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>gamma-deficient mice. *J Lipid Res.* 51:3003-15, 2010
- Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, Nishimura R, Inoue T, Nakamura M, Baba K, Kamijo R: Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol* 225:709-719, 2010
- Ikeda M, Ohtsuka H, Iwasaki Y, Ikeda-Isogai M, Baba K, Nakamura M: Immunohistochemical comparison of ontogenic development of bone marrow hematopoiesis in two different ossification system. *Dent Med Res* 30:228-236, 2010
- Tsuzurahara F, Soeta S, Kawawa T, Baba K, Nakamura M: The role of macrophages for the disappearance of Meckel's cartilage during development in mice. *Acta Histochem* 113:194-200, 2011
- Otsuka H, Yagi H, Endo Y, Nonaka N, Nakamura

M: Kupffer cells support extramedullary erythropoiesis induced by nitrogen-containing bisphosphonate in splenectomized mice. *Cell Immunol* 271:197-204, 2011

Yu Z, Otsuka H, Yamaguchi K, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S, Nakamura M, Endo Y: Roles of platelets and macrophages in the protective effects of lipopolysaccharide against concanavalin A-induced murine hepatitis. *Biochim Biophys Acta*. 1812:1069-1079, 2011

Iwasaki K, Otsuka H, Yanagisawa N, Hisamitsu H, Manabe A, Nonaka N, Nakamura M: In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. *Cell Tissue Res*. 346:99-109, 2011

[学会発表] (計 47 件)

岩崎之克, 柳澤伸彰, 大塚裕忠, 久光久, 真鍋厚史, 中村雅典 歯髄内常在性マクロファージの増殖・分化機序. 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会 2009

大塚裕忠, 中村雅典 造血・リンパ器官形成幹細胞 窒素含有ビスホスホネート投与脾臓摘出マウスの肝臓における髄外造血について. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009

大塚裕忠, 中村雅典 脾臓摘出マウスへの窒素含有ビスホスホネート投与により誘導された髄外造血について. 日本獣医学会総会・学術集会 2010

武富芳隆, 佐藤弘泰, 田中智之, 中村雅典, 上野紀子, 西藤泰昌, 山本圭, 杉本幸彦, 原俊太郎, 村上誠 III型sPLA2はマスト細胞介在性アナフィラキシーを制御する. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会 2010

野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典 マウス唾液腺におけるPACAP、PAC-1レセプタ

一の免疫組織化学的研究. 第51回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2010

岩崎之克, 柳澤伸彰, 大塚裕忠, 久光久, 真鍋厚史, 中村雅典 歯髄内常在性マクロファージの増殖・分化機序. 第46回口腔組織培養学学術集会 2010

野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典 マウス唾液腺におけるPACAPとPAC-1受容体の免疫組織学的局在. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010

小野美樹, 高見正道, 須澤徹夫, 山田篤, 宮内知彦, 馬場一美, 中村雅典, 槇宏太郎, 上條竜太郎 成体における神経堤由来細胞の分布とそれを用いた骨芽細胞の分化誘導. 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011

野中直子, 中村雅典 マウス唾液腺におけるPACAPレセプターの局在とPACAPの唾液分泌への効果. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会 2011

野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典 マウス唾液腺におけるPACAPレセプターおよびVPレセプターの免疫組織化学的局在と唾液分泌への効果. 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2011

大塚裕忠, 中村雅典 窒素含有ビスホスホネート投与によって誘導された肝臓内造血について. 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 2011

野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典 マウス唾液腺におけるPACAPレセプターの局在とPACAP経鼻投与による唾液分泌量の亢進. 第11回日本抗加齢医学会総会 2010

他 35 件

[図書] (計 2 件)

脇田稔・山下靖雄 監修口腔解剖学 医歯薬出版株式会社 2009

磯川桂太郎・中村雅典・柳澤孝彰・渡邊弘樹 著 組織学・口腔組織学<第3版> わかば出版 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 雅典 (NAKAMURA MASANORI)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50180394

### (2) 研究分担者

野中 直子 (NONAKA NAOKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20307052

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：