

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：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592417
 研究課題名（和文） 象牙質・歯髄複合体の修復再生機構の解明
 —組織培養法を用いた歯髄細胞の動態解析—
 研究課題名（英文） A study on the mechanisms of tissue repair and regeneration
 of dentin-pulp complex
 研究代表者
 吉羽 邦彦（YOSHIBA KUNIHICO）
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号：30220718

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、象牙質・歯髄複合体の修復再生過程における歯髄細胞の動態と象牙芽細胞への分化機構を解明することである。ラット臼歯の組織培養法を用いて歯髄の変化を観察した結果、 α -smooth muscle actin (SMA)陽性細胞が増殖することが示された。また歯髄の象牙芽細胞層下にThy-1陽性細胞が局在し、これらの細胞が高い硬組織形成能を持つことが明らかにされた。歯髄組織に存在するこれら α -SMA陽性、あるいはThy-1陽性細胞が歯髄の修復再生過程に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate cellular events during pulp tissue repair and reparative dentin formation after tooth injury. The up-regulation of α -smooth muscle actin (SMA) was characteristically observed in fibroblastic cells in an organ culture system of rat molar. Thy-1-positive dental pulp cells localized in the subodontoblastic layer had the ability to differentiate into hard tissue-forming cells. The α -SMA-positive and/or Thy-1-positive cells may play a role in tissue repair and regeneration of dental pulp.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質・歯髄複合体、修復・再生、歯髄組織幹細胞、象牙芽細胞、組織培養

1. 研究開始当初の背景

歯髄組織はう蝕や修復処置などの物理的・化学的刺激により象牙質を修復再生する能力を有しているが、そのメカニズム、特に歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導機構に関しては不明の点が多い。近年、歯髄組織幹細胞／前駆細胞の存在が報告され、これらの細胞が様々な刺激に反応して増殖し、硬組織

形成細胞へと分化すると考えられている。しかしながらこのような幹細胞／前駆細胞が歯髄のどこに存在するのか、またどのようなメカニズムで創傷部に移動して硬組織形成細胞へと分化するのか未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、象牙質・歯髄複合体の修

復再生過程における歯髄組織幹細胞／前駆細胞の動態、分化ならびに硬組織形成機構を明らかにすることであり、歯髄組織に存在する幹細胞／前駆細胞の増殖と象牙芽細胞への分化ならびに硬組織形成を賦活化させる因子を解明しようとするものである。

3. 研究の方法

歯髄の創傷治癒、修復再生過程における各種細胞分化・硬組織形成マーカーの発現、局在の変化について免疫組織化学的、分子生物学的に観察するとともに、組織培養法を確立し、この系における歯髄組織変化について検討した。また覆髄材の生体内における挙動と組織反応についてもあわせて検討した。

検討事項は以下のとおりである。

- (1) 組織培養法の確立とこの系における歯髄組織変化
- (2) 半導体レーザー照射後のラット臼歯歯髄反応
- (3) Thy-1 陽性細胞の局在と硬組織形成能
- (4) 覆髄材の生体内挙動と組織反応

4. 研究成果

(1) 組織培養法におけるラット臼歯歯髄組織変化

4 週齢ラット上顎第一臼歯を 1～7 日間培養し、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性細胞の動態について観察した。抜去直後の歯髄では、 α -SMA 陽性細胞は血管に沿って局在して観察された。一方、培養歯の歯冠部歯髄は経時的に変性像を示したが、根尖部では α -SMA 陽性の線維芽細胞様細胞が培養 2 日後から出現し、経時的に増加して観察された。これらの結果から、 α -SMA 陽性細胞が歯髄組織修復に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) 半導体レーザー照射後のラット臼歯歯髄反応

①非コラーゲン性タンパクの局在

低出力条件 (0.5W) では、明瞭な細管構造を有する象牙質様新生硬組織の形成が照射部直下に観察され、この新生硬組織と原生象牙質との境界部に dentin matrix protein-1 (DMP-1) 陽性反応が認められた。一方、高出力条件 (1.5W) では不規則もしくは骨様の新生硬組織が多量に形成され、原生象牙質と新生硬組織との境界部には osteopontin (OPN) および DMP-1 陽性反応が観察され、さらに DMP-1 陽性反応は新生硬組織内にも認められた。このような両出力条件間での OPN および DMP-1 の局在の相違は、新生硬組織の形成・石灰化機序あるいは組成の相違を反映している可能性が示唆された。

②非コラーゲン性タンパクの遺伝子発現

出力 1.5W, 60 秒×3 回照射の条件で半導体

レーザー照射を行い、非コラーゲン性タンパク (dentin sialoprophosphoprotein, bone sialoprotein, dentin matrix protein-1, osteopontin, osteonectin, osteocalcin) の mRNA 発現を RT-PCR 法にて観察した。その結果、全ての mRNA 発現が 3 日後までに増加を示し、象牙芽細胞様細胞の再配列の観察される 7 日後も発現亢進が持続して認められた。新生硬組織形成細胞の分化過程に非コラーゲン性タンパクの発現が関連していることが示唆された。

(3) ラット歯髄における Thy-1 陽性細胞の局在と硬組織形成能の検討

①ラット歯髄における Thy-1 陽性細胞の局在

ラット下顎切歯および臼歯における Thy-1 の局在を免疫組織化学的に観察した。その結果、Thy-1 の免疫局在は鐘状期以降の subodontoblastic layer で強い陽性反応を示したが、象牙芽細胞およびその他の歯髄細胞では陰性であった。歯髄傷害後の象牙質・歯髄複合体の修復再生過程に Thy-1 陽性細胞が関連している可能性が示唆された。

②Thy-1 陽性歯髄細胞の硬組織形成能

ラット歯髄から分取した Thy-1 陽性細胞を BMP-2 添加条件下で培養したところ、顕著な ALP 活性の上昇を示し、アリザリンレッド陽性の石灰化基質も早期に観察された。また、Thy-1 陽性、陰性細胞をヒドロキシアパタイトとともに皮下移植すると、硬組織形成が陽性細胞群で有意に多く観察された。Thy-1 陽性細胞は、in vitro および in vivo において高い硬組織形成能を示すことから、歯髄創傷治癒過程において象牙芽細胞へと分化して歯髄の修復・再生に関与することが示唆された。

(4) 覆髄材 Mineral trioxide aggregate (MTA) の生体内挙動と組織反応

MTA をラット皮下組織内に移植し、組織-MTA 界面部近傍での各種元素の分布状況の変化を観察するとともに、移植体周囲結合組織を TEM にて微細構造学的に観察した。MTA をラット皮下組織内に移植すると、MTA 表層部における Ca 溶脱層の形成と Si, Al の集積、および MTA 表面における結晶様構造物の沈着が生じた。さらに、MTA 周囲の結合組織中では針状結晶様構造物の形成が確認された。MTA から溶出した Ca と組織中の P が反応して結晶様構造物が形成され、これらが覆髄後の硬組織形成に関与している可能性が示唆された。

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 8 件)

- ①. Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Hosoya A, Shigetani Y, Yamanaka Y, Izumi N, Nakamura H, Okiji T: Expressional alterations of fibrillin-1 during wound healing of human dental pulp. *Journal of Endodontics*. 38(2): 177-184, 2012. (査読有)
- ②. 興地隆史, 韓 臨麟, 重谷佳見, 吉羽邦彦: MTA の理化学的・生物学的特性と臨床. *日本歯内療法学会雑誌* 33(1): 3-13, 2012. (査読有)
- ③. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Yoshiba N, Okiji T: Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *International Endodontic Journal*. 44(7): 669-675, 2011. (査読有)
- ④. Shigetani Y, Sasa N, Suzuki H, Okiji T, Ohshima H: GaAlAs laser irradiation induces active tertiary dentin formation after pulpal apoptosis and cell proliferation in rat molars. *Journal of Endodontics*. 37(8): 1086-1091, 2011. (査読有)
- ⑤. Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshiba K, Yoshiba N, Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H: Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. *Journal of Oral Biosciences*. 52(2): 72-80, 2010. (査読有)
- ⑥. 重谷佳見, 大倉直人, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 大島勇人, 興地隆史: 半導体レーザー照射後のラット臼歯における非カラーゲンタンパクの遺伝子発現. *日本歯科保存学雑誌*, 53(5): 495-501, 2010. (査読有)
- ⑦. 吉羽邦彦, 鞍立桃子, 重谷佳見, 韓臨麟, 吉羽永子, 興地隆史: Mineral trioxide aggregate (MTA) の物理化学的特性と直接覆髄後の歯髄反応; 新潟歯学会雑誌, 39(2): 181-182, 2009. (査読有)
- ⑧. Okiji T, Yoshiba K: Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *International Journal of Dentistry*. vol. 2009, Article ID 464280, 12 pages, 2009. (査読有)

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ①. 吉羽邦彦, 重谷佳見, 山中裕介, 武井絵

梨花, 吉羽永子, 興地隆史: Mineral Trioxide Aggregate の生体内組成変化: ラット皮下移植による検討. 日本歯科保存学会 2011 年度季学術大会 (第 135 回), 2011 年 10 月 20 日, 大阪

- ②. 重谷佳見, 吉羽邦彦, 鞍立桃子, 吉羽永子, 山中裕介, 興地隆史: 水酸化カルシウム直接覆髄後の被蓋硬組織形成過程-ラット臼歯における免疫組織化学的研究-. 日本歯科保存学会 2011 年度季学術大会 (第 135 回), 2011 年 10 月 20 日, 大阪
- ③. Yoshiba K, Shigetani Y, Yamanaka Y, Takei E, Yoshiba N, Okiji T: Compositional changes of mineral trioxide aggregate subcutaneously implanted in rats. 59th Annual Meeting of JADR, 2011 年 10 月 8 日, 広島
- ④. Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Shigetani Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Expression of alpha-smooth muscle actin in dental pulp wound healing. 59th Annual Meeting of JADR, 2011 年 10 月 8 日, 広島
- ⑤. 細矢明宏, 平賀 徹, 二宮 禎, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰: Thy-1 陽性 subodontoblastic layer 細胞の高い硬組織形成能. 第 9 回日本再生歯科医学会学術大会, 2011 年 9 月 10 日, 大阪
- ⑥. 吉羽邦彦, 重谷佳見, 山中裕介, 武井絵梨花, 吉羽永子, 興地隆史: Mineral Trioxide Aggregate のラット皮下移植後の組成変化. 第 32 回日本歯内療法学会学術大会, 2011 年 7 月 31 日, 長崎
- ⑦. Kanako T, Yamanaka Y, Yoshiba K, Yoshiba N, Suda H, Okiji T: Dentin sialophosphoprotein expression in engineered dentin pulp-like tissue. 58th Annual Meeting of JADR, 2010 年 11 月 20 日, 北九州
- ⑧. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 重谷佳見, 金子友厚, 細矢明宏, 興地隆史: ラット臼歯培養系における歯髄組織の変化に関する免疫組織化学的観察. 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回), 2010 年 10 月 28, 29 日, 岐阜
- ⑨. 重谷佳見, 大倉直人, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 細矢明宏, 興地隆史: 半導体レーザー照射後のラット臼歯における非カラーゲンタンパクの遺伝子発現. 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回), 2010 年 10 月 28, 29 日, 岐阜
- ⑩. 細矢明宏, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男, 中村浩彰: Thy-1 陽性歯髄細胞の局在および硬組織形成能. 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回),

- 2010年10月28,29日,岐阜
- ⑪. 大倉直人, 重谷佳見, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 細矢明宏, 興地隆史: ラット炎症歯髄に対する薬物輸送担体の遺伝子発現解析. 日本歯科保存学会 2010年度秋季学術大会(第133回), 2010年10月28,29日, 岐阜
- ⑫. Shigetani Y, Ohkura N, Hosoya A, Yoshiba K, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T: Temporal changes in mRNA expression of mineralized tissue matrix proteins in GaAlAs laser irradiated rat molars. 8th World Endodontic Congress of IFEA, 2010年10月8日, Athens (Greece)
- ⑬. 吉羽永子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 興地隆史, 細矢明宏, 中村浩彰: ヒト歯髄組織においてFibrillin-1はMMP-3により分解され細胞分化と石灰化を誘導する. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月21,22日, 東京
- ⑭. 細矢明宏, 平賀徹, 二宮禎, 雪田聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰: Thy-1陽性歯髄細胞の硬組織形成能に関する形態学的研究. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月21,22日, 東京
- ⑮. 重谷佳見, 大倉直人, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 興地隆史: 半導体レーザー照射後のラット臼歯における硬組織関連タンパクの遺伝子発現. 第31回日本歯内療法学会学術大会, 2010年7月24,25日, 東京
- ⑯. Yoshiba K, Yoshiba N, Shigetani Y, Hosoya A, Okiji T: Tissue alteration of rat dental pulp in whole tooth culture. 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月15日, Barcelona (Spain)
- ⑰. Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Hosoya A, Shigetani Y, Okiji T: Expressional alterations of fibrillin-1 during wound healing of dental pulps. 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010年7月15日, Barcelona (Spain)
- ⑱. 吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 細矢明宏, 重谷佳見, 興地隆史: ヒト歯髄創傷治癒過程で生じる Fibrillin-1 の分解は細胞分化と石灰化を誘導する. 日本歯科保存学会 2010年度春季学術大会(第132回), 2010年6月4日, 熊本
- ⑲. Shigetani Y, Ohkura N, Sasa N, Yoshiba K, Yoshiba N, Okiji T: Gene Expression of Mineralized Tissue Matrix Proteins in GaAlAs Laser-irradiated Rat Molars. The 8th Joint Scientific Meeting between JEA and KAE, 2010年3月27

- 日, Busan (Korea)
- ⑳. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Okiji T: Immunolocalization of osteopontin and dentin matrix protein-1 during reparative dentinogenesis in rat molars after direct pulp capping with calcium hydroxide. The 11th Joint Meeting between Korean Academy of Conservative Dentistry and Japanese Society of Conservative Dentistry, 2009年11月13日, Jeju (Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 30220718

(2) 研究分担者

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

重谷 佳見 (SHIGETANI YOSHIMI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 80397132