

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09883

研究課題名(和文) 歯髄治癒過程における神経伝達物質と自然免疫制御による象牙質再生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of dentin regeneration mechanisms through neurotransmitters and innate immune regulation in the dental pulp healing process.

研究代表者

武藤 徳子 (Mutoh, Noriko)

神奈川県立歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40510433

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)：歯髄組織中の神経線維は、末梢神経終末の髄鞘が消失した自由終末であり、侵害受容器である。自然免疫活性化を直接調節する神経ペプチドを放出しており、その結果、血管拡張および神経性炎症を誘発する。C線維から放出されたCGRPの発現は、健康な歯髄と比較して、炎症を起こしたヒトの歯髄で有意に高くなっているとの報告があり、本研究結果でも同様の結果が得られた。CGRPに免疫反応を示す神経軸索が象牙芽細胞層に局在していたことから、CGRPを介した神経介在性免疫調節経路により自然免疫系の制御が起こり、歯の損傷後の修復象牙質形成促進が認められたと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外的侵襲後の神経ペプチドを介した自然免疫制御メカニズムと修復象牙質形成促進との関わり及び、歯髄修復過程における神経ペプチド、マクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の増殖・分化、再生神経線維間の相互関係およびM2マクロファージの活性化と歯髄神経再生が伴っていることについて、組織学的に解析した。歯髄組織においても、CGRPを介した神経系により自然免疫系の制御が起こり、歯の損傷後の歯髄治癒過程に影響があり、修復象牙質形成促進が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The nerve fibers in dental pulp tissue are free nerve endings where the myelin sheath of peripheral nerve terminals is absent, serving as nociceptors. They release neuropeptides that directly regulate innate immune activation, thereby inducing vasodilation and neurogenic inflammation. Reports indicate significantly higher expression of CGRP released from C fibers in inflamed human dental pulp compared to healthy pulp, consistent with findings from this study. Neuroaxons showing immune reactivity to CGRP were localized in the odontoblastic layer, suggesting that neuroimmune modulation via CGRP may control the innate immune system, promoting reparative

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄 自然免疫 神経伝達物質

### 1. 研究開始当初の背景

CGRP 受容体は、好中球、単球、マクロファージなどの自然免疫に関連する細胞において高い発現を示し、さらに侵害受容体の活性化と免疫抑制を生み出す際、神経を介する免疫調節経路を利用し末梢末端からの神経ペプチドの放出をもたらし、血管拡張および神経性炎症を誘発する。(Nature 501:52-57.2013) CGRP がヘルパーT(Th)細胞やマクロファージに発現する CGRP 受容体を介すると Th1 細胞から Th2 細胞へ形勢が変化し、制御性 T 細胞 (Treg) の機能を促進し、Th17 細胞を活性化させ、マクロファージを M2 型へと分化させる。(J Immunol. 12:68-93 2011)。歯髄組織において CGRP の発現が象牙芽細胞層および血管関連神経に認められている。(Histochemistry.95:115-21.1990 J.Anat.202:195-203. 2003) 歯髄組織中の C 線維から放出された CGRP は、象牙芽細胞層に局在しており、健康な歯髄と比較して、炎症を起こしたヒトの歯髄で有意に高くなっている (Int Endod J. 39:394-400. 2006)。申請者らは、歯の切削により、象牙質-歯髄界面において自然免疫をつかさどる受容体として細胞の表面に Toll-like receptors (TLR) と呼ばれる膜タンパクを発現している樹状様細胞、象牙芽細胞、マクロファージの存在を示した (Mutoh et al J Endod 33: 1183-1186, 2007., J Endod 35: 975-980, 2009)。

### 2. 研究の目的

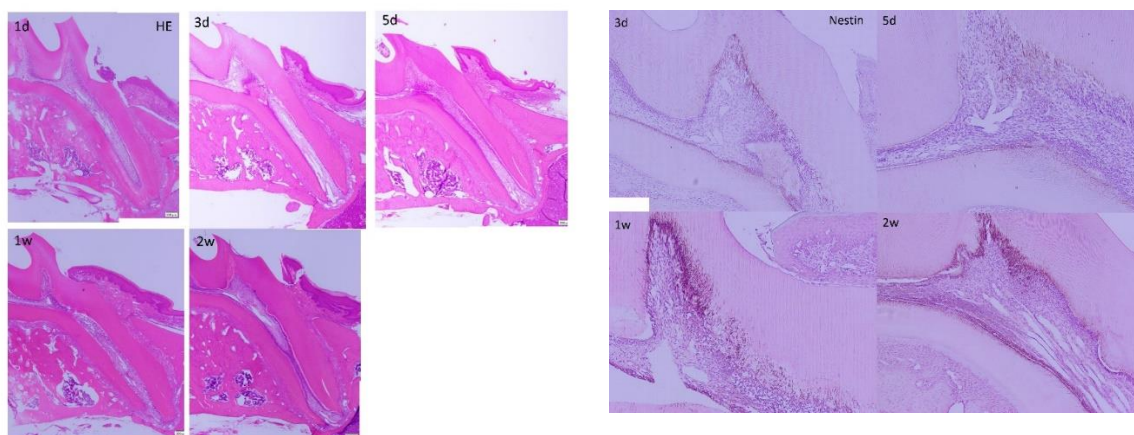
歯の損傷後の歯髄修復過程において、マクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の増殖、再生神経線維間の相互作用が、歯髄修復過程に重要な役割を担っていることを明らかにした。本研究は、神経伝達物質とこれら細胞間との相互作用を解明することを目的とし、マクロファージの極性を局所的に調節し、自然免疫を活性化することにより歯髄炎の回復及び歯髄界面の硬組織形成を効率的に誘導する方法論を確立し、外的侵襲後の神経ペプチドを介した自然免疫制御メカニズムと修復象牙質形成促進との関わりを解明するために、歯髄修復過程における神経ペプチド、マクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の増殖・分化、再生神経線維間の相互関係および M2 マクロファージの活性化と歯髄神経再生による新規歯髄再生療法を開発する基盤となる知見を提供することを目的とした。

### 3. 研究の方法

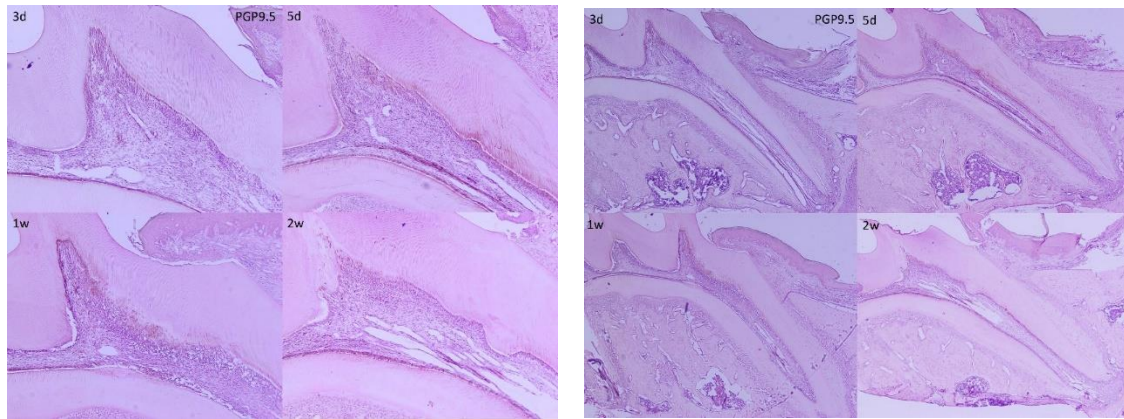
実験的歯の損傷モデルとして、8 週齢ラット (Wistar) 臼歯近心隣接面にグループ状に窩洞を形成し、経時的 (1, 3, 5 日、1, 2 週) に動物を固定し、通常通りパラフィン切片を作製し、歯髄損傷における細胞動態をヘマトキシリンエオジン染色にて観察し、抗 Ki67 抗体による免疫染色にて術後歯髄治癒過程における細胞増殖活性を、さらに神経線維、M1・M2 マクロファージ、樹状細胞の動態、CGRP 発現パターンの解析は、PGP9.5、抗 F4/80、CD206、CGRP 抗体を用いて、免疫組織化学に解析した。

### 4. 研究成果

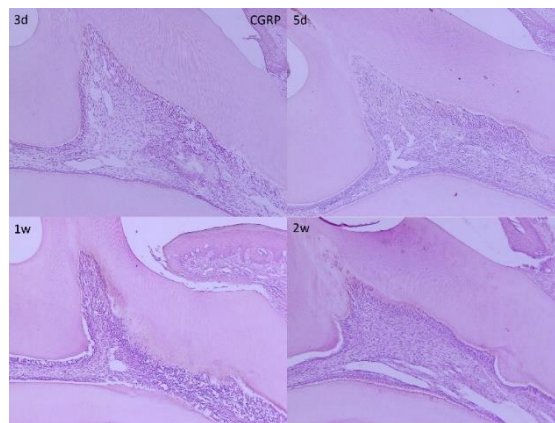
(1) 本研究において、組織を解析した結果、窩洞形成 3 日後より、窩洞直下及び髓角付近の象牙芽細胞層において nestin 陽性所見を示す細胞が認められ、その発現は、1w, 2w において修復象牙質の形成に伴い、その所見は強い所見が認められた。



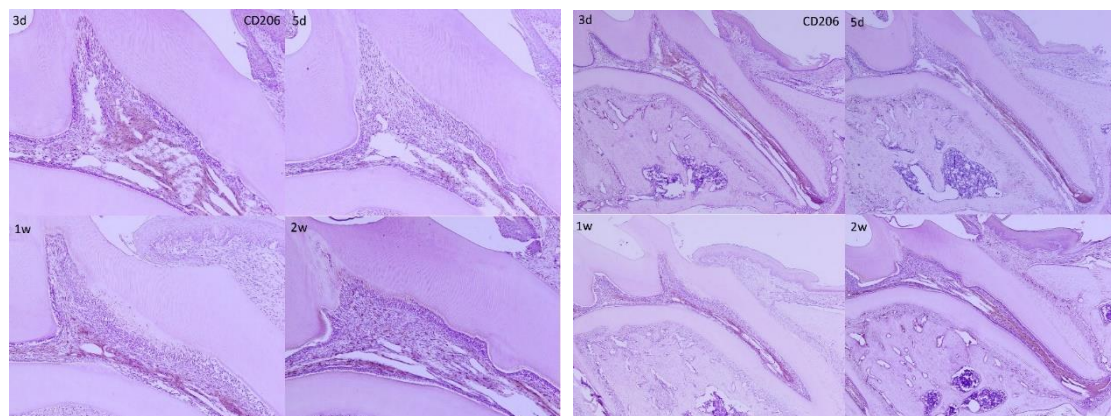
- (2) 神経線維を示す PGP9.5 所見においては、象牙芽細胞層に継続的に陽性所見が認められており、窩洞形成直下の歯髄組織においては、1, 3 日に弱い陽性所見が認められたが、5 日以降にその発現は強くなり、2 週間後には、修復象牙質周囲の象牙芽胞層に他の部位と同様な所見として認められた。



- (3) 神経ペプチドの所見を示す CGRP 陽性所見は、3、5 日後に弱く、窩洞直下の歯髄-象牙質界面に認められ、1 週間後には、修復象牙質の形成が認められる象牙芽細胞層に陽性所見が認められ、2 週まで継続していた。



- (4) 歯髄の感染に伴う M2 マクロファージの所見については、1, 3 日後まで歯冠部、歯根歯髄組織の中央部に局在しており、5 日後には、歯根部を中心とした局在となり、1 週間後には、歯冠部は髓床底を中心とした陽性所見となり、これは、2 週後は歯冠部に広く局在していた。



神経ペプチドの発現状態を分析した結果、CGRP 受容体は、好中球、マクロファージで高い発現を示した。つまり自然免疫活性化の調節における神経ペプチドの役割をサポートしていると考えられる。侵害受容器は、感染により、自然免疫活性化を直接調節する神経ペプチドを放出しており、その結果、血管拡張および神経性炎症を誘発する。細菌感染により多くの侵害受容器の活性化とより大きな免疫抑制を生み出すことにより、病原性のためにこれらの神経介在性免疫調節経路を利用し、感染組織内に広がる能力を進化させた可能性がある。歯髄組織中の神経線維は A $\delta$  線維と C 線維であり、いずれも末梢神経終末の髓鞘が消失した自由終末であり、侵害受容器

である。特にC線維から放出された CGRP の発現は、健康な歯髄と比較して、炎症を起こしたヒトの歯髄で有意に高くなっているとの報告があり、本研究結果でも同様の結果が得られた。多くの歯髄組織中のペプチド作動性神経線維において、血管関連神経の多くが CGRP を発現しており、CGRP に免疫反応を示す神経軸索が象牙芽細胞層に局在している。歯髄組織においても、CGRP を介した神経系により自然免疫系の制御が起こり、歯の損傷後の歯髄治癒過程に影響があり、修復象牙質形成促進が認められたと考えられる。これは、cAMP 依存性リプレッサー機構を介して樹状細胞における TNF- $\alpha$  の転写を減衰し、さらに CGRP がヘルパーT(Th)細胞やマクロファージに発現する CGRP 受容体を介すると Th1 細胞から Th2 細胞へ形勢が変化し、制御性 T 細胞 (Treg) の機能を促進し、Th17 細胞を活性化させ、マクロファージを M2 型へと分化させることが報告されていることから、今後は、歯髄組織における自然免疫機構の調節機構の研究を継続させていく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糸永和広 山根雅仁 山崎詩織 石井信之 武藤徳子
2. 発表標題 歯髄治癒過程における神経伝達物質と自然免疫制御による象牙質再生機構の解明
3. 学会等名 第59回神奈川歯科大学学会総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	石井 信之  (Tani-Ishii Nobuyuki)  (20163610)	神奈川歯科大学・歯学部・教授    (32703)	
研究分担者	大島 勇人  (Ohshima Hayato)  (70251824)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

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