

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 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592119

研究課題名（和文）

歯髄創傷治癒過程で Fibrillin-1 はどのように細胞分化と石灰化に関与するか

研究課題名（英文）

Degradation and down-regulation of fibrillin-1 during wound healing of human dental pulp tissue

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

組織は細胞とそれをとりまく細胞外基質により構成される。近年、細胞外基質の細胞増殖・分化制御に対する直接的な機能が明らかになるにつれ、歯髄組織における細胞外基質への理解は、歯髄組織保存治療さらには歯髄組織再生にあたり、益々重要であると考えられる。細胞外基質の 1 つ fibrillin-1 は、結合組織の構成を担っているだけでなく、形質転換成長因子 transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルの細胞外基質制御因子としての機能が、ここ数年注目されている。TGF- β は、象牙芽細胞の成熟化と細胞外基質の分泌に必須な因子である。そこで本研究では、fibrillin-1 の歯髄組織における修復および再生・新生への機序を解明する目的で、直接覆髄における修復象牙質形成後の歯髄組織と、さらには歯髄組織培養における組織変化を解析した。その結果、歯髄組織創傷治癒初期ならびに培養歯髄において、fibrillin-1 タンパクの分解によると思われる免疫組織陽性反応の消失と mRNA の下方制御がおきていることが確認された。また、fibrillin-1 タンパクの欠損する部位では、その発現には TGF- β 1 が必須とされている α -SMA 陽性線維芽細胞が一過性に出現していた。さらには、この α -SMA 陽性線維芽細胞の一部の細胞が修復象牙芽細胞へと分化することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Degradation of fibrillins, the major constituents of microfibrils, is known to facilitate the release of active transforming growth factor- β (TGF- β), a signaling molecule contributing to mineralized tissue barrier formation in exposed dental pulps. To examine the involvement of fibrillins in the barrier formation, temporospatial expression of (i) genes and proteins of fibrillins, and (ii) factors possibly associated with fibrillin degradation and cytodifferentiation were examined in exposed human pulps. Human pulp slice cultures were also examined for the role of fibrillins in mineralization. Degradation and downregulation of fibrillin-1 expression took place during the mineralized tissue barrier formation in exposed pulps *in vivo* as well as in pulp slice cultures, which should be correlated with the temporary appearance of α -SMA-positive fibroblasts and pulpal tissue mineralization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：fibrillin-1, TGF- β , dental pulp

α -SMA

1. 研究開始当初の背景

歯髄幹細胞を有し優れた硬組織形成能を有する歯髄組織を、最大限保存することは極めて重要である。組織は細胞とそれを取りまく細胞外基質により構成される。近年、細胞外基質は細胞の増殖・分化の制御に直接かかわっていることが明らかになり、歯髄組織における細胞外基質への理解は、歯髄保存治療にあたり益々重要である。

2. 研究の目的

細胞外基質である fibrillin-1 は、組織に弾性を与えている弾性線維系に必須な構成成分である。しかし、この fibrillin-1 は、結合組織の構成を担っているだけでなく、形質転換成長因子 transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルを制御していることが近年明らかになった。TGF- β は、象牙芽細胞の成熟化と細胞外基質の分泌に必須な因子である。本研究の目的は、ヒト歯髄組織の創傷治癒／硬組織形成過程で展開される細胞分化・細胞外基質・石灰化の関連について、fibrillins 特に fibrillin-1 の関与を糸口に追究し、歯髄組織の修復および再

生・新生への機序を解明することにある。

3. 研究の方法

本研究計画では、in vivo における MTA、Ca(OH)₂、 α -TCP によるヒト歯髄直接覆髄後の組織反応の研究に加え、in vitro における fibrillin-1 の機能検索を行った。そのために、免疫組織化学的手法に加え、様々な条件下でのヒト歯髄組織培養においては、定量 PCR による遺伝子解析を行った。また、マウス切歯を使用し、fibrillin-1, -2, -3 それぞれのタンパク局在を解析することで、形態形成と細胞分化に対する影響を検討した。

4. 研究成果

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

- 1) Fibrillin-1, 2, 3 は健全な歯髄組織内では線維様に存在し、fibrillins と結合する latent TGF- β binding protein-1 (LTBP-1) も、fibrillins と類似の局在を示した。
- 2) 創傷治癒過程初期において創傷治癒部から fibrillin-1 タンパクの局在が消失し、その後その mRNA の発現も消失した。
- 3) その消失部において、 α -SMA 陽性線維芽細

胞が一過性に認められた。この α -SMA陽性線維芽細胞細胞は、分化と共に細胞骨格の1つで歯髄では象牙芽細胞に強く発現が認められるnestinを共発現していた。

4) 一方、fibrillin-2, 3とLTBP-1のタンパクの局在変化は認められなかった。

5) TGF- β と関連深い細胞外基質fibronectin, decorinについても同様に創傷治癒過程における局在を観察したが、fibrillin-1のような局在変化は認められず、常に歯髄組織においては一様に観察された。

6) 歯髄組織片の器官培養において、培養3日には α -SMA陽性線維芽細胞とpSmadの共発現が認められ、fibrillin-1の分解とmRNAの下方制御も認められた。一方、TGF- β 1のmRNA発現は下方制御されたままであった。さらに、培養液にタンパク分解酵素阻害剤を添加し培養すると、fibrillin-1の分解は減少し、同時に α -SMAの発現も減少していた。これらのことより、 α -SMAの発現にはTGF- β のシグナルが関与していることが示唆され、創傷治癒過程初期においては、fibrillin-1の分解がTGF- β の遊離・活性化に寄与している可能性が示唆された。

7) 石灰化との関連について

in vivoにおいてfibrillin-1消失部位においてアルカリフォスファターゼの陽性反応が観察されたことから、in vitroで石灰化との関連を検索した。 β グリセロフォスフェイトを添加し歯髄組織片の器官培養を行うと、fibrillin-1タンパクの消失とアルカリフォスファターゼ陽性反応を伴う石灰化が認められた。Fibrillin-1を欠く基質と石灰化との関連が示唆された。

これらのことより、創傷治癒過程において

は、fibrillin-1の分解がTGF- β の遊離・活性化に寄与し、創傷治癒初期に重要とされている α -SMA陽性線維芽細胞の分化を誘導する1つの要因として考えられた。

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 6件)

- ① Expressional Alterations of Fibrillin-1 during Wound Healing of Human Dental Pulp. N. Yoshiba et al. Journal of Endodontics 38, 177-184, 2012
- ② Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. A Hosoya...N. Yoshiba et al. Histochem Cell Biology 137, 733-742, 2012
- ③ Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. N. Yoshiba et al. Histochemistry and Cell Biology 138, 583-592, 2012
- ④ Gene expression analysis of membrane transport proteins in normal and lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. N Ohkura...N. Yoshiba et al. Journal of Endodontics, 38, 648-652, 2012
- ⑤ ヒト歯髄創傷治癒過程における細胞外基質の局在変化-Fibrillin-1 基質の動的リモデリングに関する検索- 吉羽永子ら 日本歯科保存学雑誌 (印刷中) 2012
- ⑥ Two distinct processes of bone-like tissue formation by dental pulp cells after tooth transplantation. A Hosoya...N. Yoshiba et al. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 60, 861-873, 2012

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 皮下移植歯の歯髄腔内における骨様組織形成. 細矢明宏...吉羽永子ら第 118 回日本解剖学会 2013 年 3 月 29 日
- ② Alpha-SMA and STRO-1 during Wound Healing of Human Dental Pulp. N Yoshiba et al. IADR 2013 年 3 月 23 日
- ③ Ultrastructural and Compositional Changes of MTA Implanted in Connective Tissue. K Yoshiba et al. IADR 2013 年 3 月 21 日
- ④ Origin of bone-like tissues in dental pulp after tooth transplantation. A Hosoya...N Yoshiba et al. JADR 2012 年 12 月 14 日
- ⑤ 象牙芽細胞分化過程における SUMO 化修飾因子と Osterix の局在. 細矢明宏...吉羽永子ら日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 2012 年 6 月 29 日
- ⑥ Expression of α -Smooth Muscle Actin in Dental Pulp Wound Healing. N Yoshiba et al. JADR 2011 年 10 月 9 日
- ⑦ Thy-1陽性subodontoblastic layer細胞の高い硬組織形成能. 細矢明宏...吉羽永子ら第9回日本再生歯科医学会学術大会 2011 年9月10日
- ⑧ Mineral Trioxide Aggregateのラット皮下移植後の組成変化. 吉羽邦彦...吉羽永子ら第32回日本歯内療法学会学術大会 2011 年7月30日
- ⑨ 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. 吉羽永子ら第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 21 日
- ⑩ Expressional alterations of fibrillin-1 during wound healing of dental pulps. N Yoshiba et al. IADR 88th General Session & Exhibition 2010 年 7 月 16 日
- ⑪ Tissue Alteration of Rat Dental Pulp in

Whole Tooth Culture. K Yoshiba et al. IADR 88th General Session & Exhibition 2010 年 7 月 16 日

- ⑫ 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. 吉羽永子ら日本歯科保存学会 2010 年度春季 2010 年 6 月 4 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNHIKO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30220718