

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462952

研究課題名(和文) 歯髄創傷治癒・再生のための  $\alpha$ -SMA陽性線維芽細胞を軸とした多角的アプローチ

研究課題名(英文) Contribution of Myofibroblasts in Dental Pulp Healing and Regeneration

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)を発現する線維芽細胞は「活性化された線維芽細胞」とも言われ組織創傷治癒再生時に重要な役割をしている。人歯髄組織における  $\alpha$ -SMA陽性細胞の動態を器官培養系を用いて調べたところ、線維芽細胞のみならずシュワン細胞、象牙芽細胞も  $\alpha$ -SMA陽性を呈してた。この現象は細胞外基質fibrillin-1の発現変化を伴っており、 $\alpha$ -SMA陽性細胞への変化はfibrillin-1の改変を伴うことがin vitroで明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) is a marker of myofibroblasts, which play a central role in wound healing. Fibrillin-1 is a major constituent of microfibrils and an extracellular-regulator of TGF- $\beta$ 1, an important cytokine for myofibroblasts differentiation. We examined alterations of  $\alpha$ -SMA and fibrillin-1 expression in organotypic culture of dental pulp. After 7 days of culture, most fibroblasts and odontoblasts were immunoreactive for  $\alpha$ -SMA with a significant increase of  $\alpha$ -SMA mRNA expression. Furthermore, immunostaining of fibrillin-1 became faint with mRNA downregulation. Administration of inhibitors for extracellular matrix proteases resulted in the recovery of fibrillin-1 immunostaining, and fibroblasts lost their immunoreactivity for  $\alpha$ -SMA with mRNA downregulation. These findings suggest that fibrillin-1 degradation and downregulation might be implicated in the myofibroblasts differentiation in dental pulp wound healing.

研究分野：歯科保存学

キーワード： $\alpha$ -SMA fibrillin-1 dental pulp organ culture

## 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。傷害された歯髄組織においては、既存の歯髄組織から歯髄象牙質複合体を確実に再生し、象牙質あるいは象牙質様の硬組織を継続的に添加する細胞を誘導することが、その歯牙の延命にとり重要である。この観点から、私達は歯髄組織における象牙芽細胞様細胞への分化と、その細胞分化の制御に関わる細胞外基質に注目し研究してきた。その過程の中で、今回 -SMA 陽性を示す線維芽細胞に注目するに至った。

-smooth muscle actin (SMA)を発現する線維芽細胞は、その強い収縮能で傷口を小さくし治癒を促進する他に、様々なサイトカイン、成長因子をはじめ、細胞外基質およびそれらの分解因子を分泌し、さらには盛んな免疫応答もかね備えていることから「活性化された線維芽細胞」とも言われている。

## 2. 研究の目的

歯髄組織創傷治癒及び再生過程において、-SMA 陽性線維芽細胞は重要な機能を果たしていることが知られている一方で、それらの細胞の起源、機能については不明な点も多い。-SMA 陽性線維芽細胞の由来については1)歯髄組織の線維芽細胞、2)血管壁細胞であるペリサイトあるいは平滑筋細胞、そして3)血中由来の fibrocyte が示唆されている。本研究では、(1)Tooth slice culture を応用した組織再生モデルを創り、-SMA 陽性細胞の形態や挙動の変化を調べ、象牙芽細胞への分化の可能性を含む歯髄組織再生にかかわる機能を

明らかにし、さらに(2) -SMA 陽性細胞の挙動との関わりが示唆される細胞外基質 fibrillin-1 の発現変化の関連性を検索する。

## 3. 研究の方法

本研究の実施計画については、既に新潟大学歯学部倫理委員会において承認を受けている。

本研究では、矯正治療上抜歯が必要と診断された抜去歯を用いた。患者さんとの十分なインフォームドコンセントの後、抜歯後の歯を提供いただいた。抜歯直後、マイクロスライサーで厚さ1mmに横断し、培養を行った。様々な条件下で培養を行い、免疫組織化学的にタンパク局在の変化を、また定量PCRによる遺伝子解析を行った。

## 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) Tooth slice culture を用いた組織創傷治癒モデルでの -SMA 発現の変化

健全歯髄組織では -SMA は血管平滑筋細胞、ペリサイトにのみ発現が認められた。培養一週間後には、歯髄線維芽細胞だけでなく、神経膠細胞であるシュワン細胞や、高度に分化している象牙芽細胞も -SMA タンパクを発現するようになり、遺伝子の発現も有意に上昇していた。

-SMA の発現には成長因子である TGF- $\beta$ 1 とその転写因子である Smad のシグナリングが必要であることが知られている。そこでこの培養系でリン酸化 Smad2/3 (pSmad2/3) の核内移行を調べると、pSmad2/3 陽性の核は培養3日目でピークとなり5日目には細胞質に移行し7日目では分解されていることが明らかとなった。さらに TGF- $\beta$ 1 レセプターの阻害剤を添加すると -SMA の発現が減少してい

た。これらのことより、本実験系の tooth slice culture においても  $\alpha$ -SMA の発現には、TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 シグナリングが関与していることが明らかとなった。

#### (2) Tooth slice culture を用いた組織創傷治癒モデルでの fibrillin-1 の変化

弾性繊維の主要構成成分である fibrillin-1 は、一方では細胞外基質での TGF- $\beta$ 1 の調整因子であることが知られている。Tooth slice culture 1 週間後には fibrillin-1 タンパクが分解され、さらに遺伝子の発現が顕著に減少していた。

#### (3) Tooth slice culture において myofibroblasts の分化は fibrillin-1 タンパクの分解と mRNA 発現の下方制御を伴う

Fibrillin-1 タンパクの分解がそれ自身に貯蔵してある TGF- $\beta$ 1 の遊離と活性化を誘導することが報告されている。そこで fibrillin-1 分解阻害剤を添加し 1 週間培養すると、fibrillin-1 タンパクの分解が阻止されると同時に、 $\alpha$ -SMA の発現も著しく阻害されることが明らかとなった。一方、fibrillin-1 分解阻害剤は TGF- $\beta$ 1 の発現には影響を及ぼさなかったことから、 $\alpha$ -SMA の発現には fibrillin-1 タンパクの分解が必要であることが示唆された。

#### (4) Tooth slice culture での fibrocyte の変化

Fibrocyte の識別には、骨髄由来を表す CD45 と間葉細胞であることを表す I 型コラーゲンの二重陽性であることが指標とされる。ヒト歯髄組織において CD45 陽性細胞のうち、I 型コラーゲン陽性細胞が数パーセント存在することが明らかとなった。Tooth slice culture では、これらの細胞は  $\alpha$ -SMA 陽性 myofibroblast に分化できることも明らかとなった。今後、歯髄組織における fibrocyte

の解析を進める必要がある。

#### 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 9 件)

Shigetani Y, Ohkura N, Yoshiba K, Ohshima H, Hosoya A, Yoshiba N, Okiji T: GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. Oral Dis: 2016 (in press). (査読有)  
枝並直樹, 重谷佳見, 吉羽邦彦, 日向剛, 吉羽永子, 興地隆史: ラット皮下組織における 4-META 含有レジジン系シーラーの生体親和性. 日歯保存誌 59(1): 65-73, 2016. (査読有)

Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Takei E, Edanami N, Oda Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Correlation Between Fibrillin-1 Degradation and mRNA Downregulation and Myofibroblasts Differentiation in Cultured Human Dental Pulp Tissue. J Histochem & Cytochem 63(6):438-448, 2015. (査読有)

Shigetani Y, Yoshiba K, Takei E, Yoshiba N, Yamanaka Y, Ohshima H, Okiji T: Temporospatial localisation of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. Int Endod J 48(6): 573-81, 2015. (査読有)

Ohkura N, Shigetani Y, Yoshiba N, Yoshiba K, Okiji T: Prostaglandin transporting protein-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> transport in lipopolysaccharide-inflamed rat dental pulp. J Endod 40(8): 1112-1117, 2014. (査読有)

Takei E, Shigetani Y, Yoshiba K, Hinata G, Yoshiba N, Okiji T: Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. J Endod 40(12):1983-1988, 2014. (査読有)

吉羽永子: ミニレビュー 歯の発生および歯髄創傷治癒・再生過程における細胞外マトリックスの多様性. 日歯保存誌 57(5): 385-387, 2014. (査読無)

大倉直人: ラット炎症歯髄に対する薬物輸送担体を介したProstaglandin E2輸送経路解析. 新潟市学会雑誌 44(2): 49-50, 2014. (査読無)

吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 重谷佳見, 武井絵梨花, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史: 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-. 日歯保存誌 56(3): 161-168, 2013. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

大倉直人, 枝並直樹, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 依田浩子, 大島勇人, 興地隆史: ヒト歯髄におけるプロスタグランジン E2 輸送担体および特異的レセプターの免疫組織学的局在解析. 第 57 回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015 年 9 月 11-13 日, プログラム: 367 頁 2015.

大倉直人, 重谷佳見, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 興地隆史: 培養ヒト歯髄の各種遺伝子発現に対する prostaglandin EP4 レセプターアゴニストの影響. 第 36 回日本歯内療法学会学術大会, 鶴見大学記念館(神奈

川県、横浜市), 2015 年 7 月 11-12 日, プログラムおよび抄録集: 71 頁, 2015.

Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Takei E, Edanami N, Oda Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Fibrillin-1 degradation and myofibroblasts induction in cultured human dental pulp. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 13, 2015.

Yoshiba K, Takei E, Edanami N, Hinata G, Yoshiba N, Shigetani Y, Okiji T: Reparative dentinogenesis after pulp-capping with a light-cured calcium silicate-based material. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 13, 2015.

Ohkura N, Ohkura M, Oda Y, Yoshiba N, Yoshiba K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Okiji T: Immunolocalization and gene-expression of multidrug resistance-associated protein-4 in human dental pulp. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 11-14, 2015

Takei E, Yoshiba K, Edanami N, Hinata G, Yoshiba N, Shigetani Y, Okiji T: M2-macrophage accumulation after pulpotomy with a light-cured resin-modified calcium-silicate material. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 12, 2015.

大倉直人, 重谷佳見, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 興地隆史: ヒト歯髄における Prostaglandin レセプターの免疫組織学的局在解析. 第 35 回日本歯内療法学会学術大会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2014 年 7 月 12-13 日, プログラム・抄録集: 19 頁, 2014.

Takei E, Shigetani Y, Yoshiba K, Hinata

G, Yoshida N, Okiji T: Transient accumulation of M2 macrophages after pulpotomy with calcium silicate-based materials in rat molars. 日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会(第 141 回), 山形テレサ(山形県、山形市), 2014 年 10 月 30 日, プログラムおよび講演抄録集: 27 頁, 2014.

細矢明宏, 二宮禎, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中塚美智子, 中村浩彰: 象牙細胞分化における Bmi-1 の機能. 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会, 2014 年 9 月 27 日, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), J. Oral Biosci. Suppl.: 184 頁, 2014.

Hosoya A, Tadashi N, Yoshida K, Yoshida N, Nakatsuka M, Nakamura H: Immunohistochemical Localization of Bmi1 during odontoblast differentiation and regeneration. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市), 3 月 21-23 日, プログラム: 214 項, 2014.

Yoshida K, Yoshida N, Shigetani Y, Okiji T: Immunolocalization of osterix during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with MTA. The 9th world endodontic congress of the International Federation of Endodontic Associations, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区), May 23-26, 2013.

Ohkura N, Shigetani Y, Yoshida N, Yoshida K, Okiji T: Prostaglandin transporter mediated prostaglandin E2 transport in inflamed dental pulp. The 9th world endodontic congress of the International Federation of Endodontic Associations, 東京国際フォーラム(東京都、千代田区), May 23-26, 2013.

吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史: ヒト歯髄組織か

ら outgrowth する細胞による組織構築に関する研究. 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会, 岡山コンベンションセンター(岡山県、岡山市), 2013 年 9 月 20-22 日, J Oral Biosci (Suppl): 193 頁, 2013.

〔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〕  
ホームページ等

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: 1 0 3 2 3 9 7 4

(2) 研究分担者  
吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 3 0 2 2 0 7 1 8

大倉 直人 (OHKURA NAOTO)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号: 0 0 5 4 7 5 7 3