

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861811

研究課題名(和文) Tenascin-Cによる歯髄幹細胞の活性を期待する機能性マトリックスの開発

研究課題名(英文) Experiment on new material composed of Tenascin-C coated collagen sponge for direct pulp capping

研究代表者

松岡 海地 (Matsuoka, Kaichi)

東京歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：10637797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は(Tenascin-C)TN-C添加をしたCollagen spongeを作製した細胞外マトリックスからなる機能性マトリックスをラット大白歯の露髄部に填入封鎖した後に断髄面下で第三象牙質形成を誘導するかを分析し、覆罩材として有効かを検討することである。In Vivoの結果より5日後では機能性マトリックスと歯髄が結合し、1週間後では象牙芽細胞様細胞の配列が見られた。1か月後では第三象牙質の形成が認められた。このことからTN-C添加したCollagen spongeは生体親和性の高い覆罩材になりうると思われた。今後、さらに硬組織形成能の評価を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：It is important that dental pulp tissue preserved for direct pulp capping. We research that new material composed mainly of extracellular matrix has a biocompatibility for direct pulp capping. This experiment aimed at analysis that rat dental pulp cells promote to produce tertiary dentin used Tenascin-C (TN-C) coated collagen sponge implanted at defect dentin area for direct pulp capping. Present results showed that dental pulp tissue around TN-C coated collagen sponge increased calcification after 1month in vivo. These finding suggest that TN-C coated sponge may be useful for new material of direct pulp capping.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄 直接覆罩法 細胞外マトリックス Tenascin-C 第三象牙質

### 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において齲蝕に罹患した歯を長期的に保存するためには齲蝕部を的確に削除しかつ歯髄を残すことが重要である。なぜならば歯髄を失った歯は第三象牙質の形成がなく歯質が脆くなりやすいためであり、また根管治療が必要となり根尖病巣を起こすリスクを増やすからである。このことから歯科治療では歯髄を出来る限り残すことが望まれ、成功率の高い歯髄覆罩法が求められている。現在の臨床の場で多く使用される覆罩材は水酸化カルシウム系の薬剤であり、歯髄および残存象牙質に塗布した直下歯髄の感染を抑制するのみでなく表層の壊死を誘発させて、その周囲の歯髄細胞が硬組織形成細胞へ分化することにより第三象牙質を促している。水酸化カルシウム剤を用いた覆罩法は歯髄の壊死部を介した後の治癒を転帰としており、直接的に硬組織形成能を誘導する新しい歯髄覆罩材が望まれる。

従来から歯髄組織に関する研究がされており、歯髄細胞には潜在的に硬組織を形成する能力を有していることが多く報告され、条件が揃えば歯髄細胞は象牙芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞へ分化することが知られている。細胞の分化に関与する環境因子として細胞外マトリックスがある。細胞外マトリックスは細胞の間質を構成する基質で、細胞の増殖や分化、遊走性に関与する。また成長因子のように遠隔的に他臓器への影響を及ぼすことが少ない蛋白質である。我々は生体親和性が高く効率的に第三象牙質を誘導する覆罩材として細胞外マトリックスを用いることを考えた。細胞外マトリックスである tenascin-C(TN-C)とコラーゲンスポンジを覆罩材として用いて断髄面下の歯髄細胞を効率的に硬組織形成細胞へと分化を誘導できるかを検索したく実験計画を立てた。

### 2. 研究の目的

我々は In vitro 実験にて TN-C を塗布した培養皿を作製した後に、その上に播種した培養歯髄細胞の動態を解析し、TN-C が歯髄細胞の硬組織形成能を高めることを示し報告した。本研究の目的は TN-C 添加をした Collagen sponge を作製した細胞外マトリックスからなる機能性マトリックスをラット大白歯の露髄部に填入封鎖した後に断髄面下で第三象牙質形成を誘導するかを分析し、覆罩材として有効かを検討することである。

### 3. 研究の方法

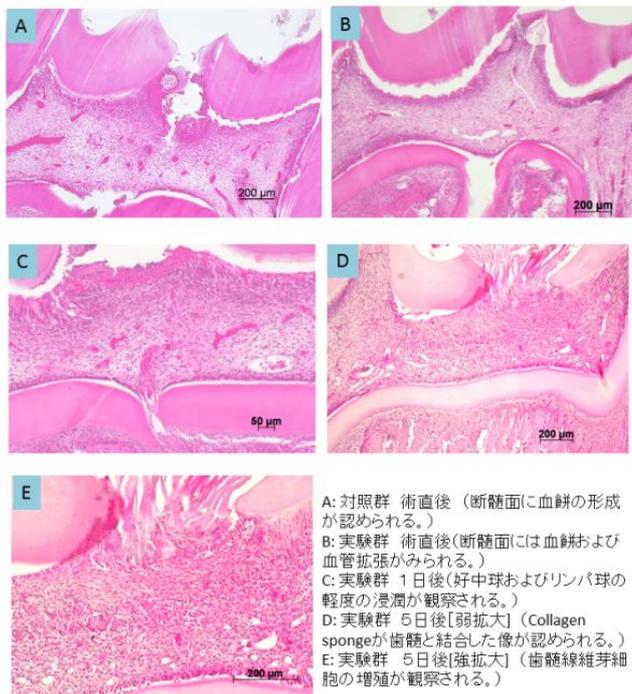
In vivo 実験では、ラットの第一臼歯部に直接覆罩法にて露髄させ、同部に生体親和性と血液・滲出液の吸収を有した機能性マトリックスとなる TN-C をコートした Collagen sponge を作製後に充填・填入し、組織標本作製し検討した。機能性マトリックスの作製には Recombinant human TN-C (R&D system) を PBS で 10  $\mu$ g/ml に希釈した溶液に Collagen sponge (Atelo Cell<sup>®</sup>) を浸漬し 2 時間 37  $^{\circ}$ C インキュベートし自然乾燥させた。SD 系雄性ラット (約 100-150g) を用いて実験群として左側第一大臼歯部に窩洞を形成し、歯髄を露出し 10% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液と 2.5-3.5% 過酸化水素水で表面を洗浄後に TN-C をコートした Collagen Sponge を填入封鎖し、対照群として右側第一大臼歯部に同法にて窩洞形成部に Collagen Sponge のみを填入封鎖した。術後のラット、直後、1 日後、5 日後、1 週後、1 か月後に屠殺後、上顎両側の第一大臼歯を含んだ上顎骨を摘出し、ホルマリンにて固定後に脱灰処置をした。また屠殺直前に  $\mu$ CT で上顎両側の第一大臼歯を撮影した。標本作製は通法に従い、採取したサンプルをパラフィン浸透し、そのブロックを薄切し標本作製した。作製した切片標本は HE 染色法を行い、免疫組織化学染色法では一次抗体に硬組織形成能の評価として抗 Osteocalcin 抗体、象牙芽細胞の評価

として抗 Nestin 抗体を用いて検索した。

In vitro 実験では collagen sponge を含む 35mm dish (KOKEN) を用い Recombinant TN-C (15  $\mu\text{g/ml}$ ) をコートした Collagen sponge を実験群とし、非コートした Collagen sponge を対照群として、それぞれに培養歯髄細胞 ( $5 \times 10^4/\text{ml}$ ) を播種し 1 週間後の細胞形態と分化を定量的 RT-PCR 法 ( $n=4$ , student t-test)、HE 染色法、免疫組織化学染色法、およびアリザリンレッド染色にて評価した。

#### 4. 研究成果

In vivo 実験における HE 染色にて観察した結果は、対照群および実験群では術後直後で窩洞直下に血餅の形成が認められ (図 1A、B)、1 日後では血餅周囲にリンパ球の浸潤や毛細血管の増生拡張が対照群と実験群で観察された (図 1C)。5 日後では実験群の血餅は肉芽組織となり窩洞内の collagen sponge と結合し、その周囲に歯髄線維芽細胞の増生が観察された (図 1D、E)。対照群では白血球の著明な浸潤がみられた。



(図 1)

1 週間後では対照群において窩洞直下に肉芽組織とリンパ球および好中球の著明な浸潤がみられるのに対し実験群では窩洞下の歯髄線維芽細胞及び象牙芽細胞様細胞の配列と線維の増生が認められ (図 2a、b、c)、1 か月後では対照群で窩洞周囲に第三象牙質の形成がみられ、実験群では窩洞周囲の第三象牙質の形成と髓壁内の石灰化の亢進が観察された (図 2d、e)。

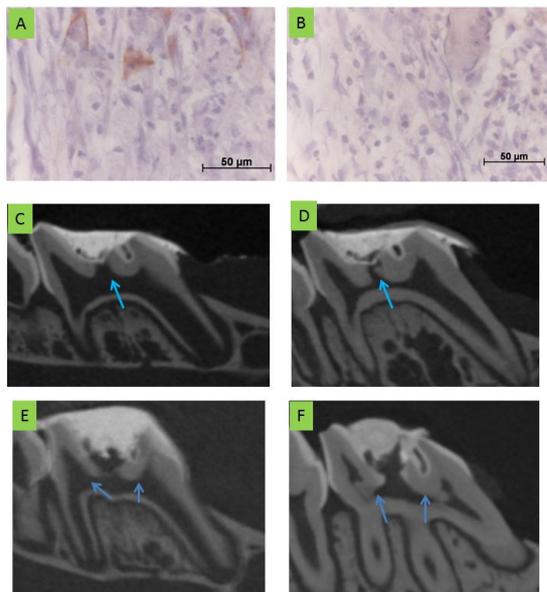


(図 2)

免疫組織化学染色法では 1 週間後で実験群の窩洞直下も Nestin 陽性細胞の出現および髓壁周囲の歯髄に Osteocalcin 陽性が観察された (図 3A、B)。 $\mu\text{CT}$  画像では 1 か月後に対照群と実験群において窩洞周囲に石灰化像が観察された (図 3C、D、E、F)。

In vitro 実験における RT-PCR の結果では ALP は実験群と対照群で同等に発現し (図 4a)、Notch1 は実験群と対照群を比べ同等で僅かに高く (図 4b)、VEGF は実験群が対照群と比較し低い発現を示した (図 4c)。HE 染色法では実験群と対照群ともにアテロコラーゲンの空隙内に培養歯髄細胞が接着し増殖している像が認められた (図 4d)。免疫組織化学

染色では抗Osteocalcin抗体において実験群が対照群に比べ陽性細胞が多く観察された。アリザリンレッド染色では実験群および対照群で陽性が観察された。



(図 3)  
 A: 実験群 1週間後 免疫組織化学染色法(抗Nestin抗体)  
 B: 実験群 1週間後 免疫組織化学染色法(抗Osteocalcin抗体)  
 C: 対照群 術直後 μCT画像  
 D: 対照群 一か月後 μCT画像 \* CとDは同一ラット  
 E: 実験群 術直後 μCT画像  
 F: 実験群 一か月後 μCT画像 \* EとFは同一ラット

In Vivo の結果より対照群と実験群で1か月後に第三象牙質の形成が認められたため機能性マトリックスは親和性が高い材料であり、実験群の5日後では機能性マトリックスと歯髄が結合し1週間後では細胞の配列が見られたため TN-C が断髄面の治癒を促進したと考えられる。また In Vitro の結果より機能性マトリックスの培養歯髄細胞は硬組織形成マーカーの発現が認められた。これらの結果から TN-C は歯髄の硬組織能を促進し、TN-C コートした Collagen sponge は生体親和性の高い覆層材になりうると考えられた。今後、さらに硬組織形成能の評価を検討する予定である。

### 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1件)

Hypoxic condition promotes differentiation and mineralization of dental pulp cells in vivo. Ito K, Matsuoka K, Matsuzaka K, Morinaga K, Inoue T. Int Endod J.12 May 2014.DOI: 10.1111/iej.12288

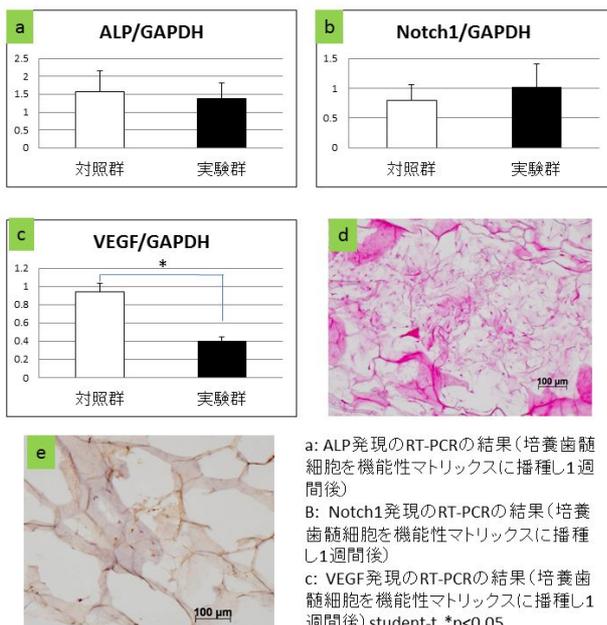
### 6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡海地 (MATSUOKA Kaichi)

東京歯科大学 臨床検査病理学講座 非常勤講師

研究者番号：10637797



(図 4)

a: ALP発現のRT-PCRの結果(培養歯髄細胞を機能性マトリックスに播種し1週間後)  
 B: Notch1発現のRT-PCRの結果(培養歯髄細胞を機能性マトリックスに播種し1週間後)  
 c: VEGF発現のRT-PCRの結果(培養歯髄細胞を機能性マトリックスに播種し1週間後) student-t \* $p < 0.05$   
 d: TN-C添加Collagen sponge(に培養歯髄細胞播種し1週間後)(HE染色)  
 e: TN-C添加Collagen sponge(に培養歯髄細胞播種し1週間後)(免疫組織化学染色 抗Osteocalcin抗体)