

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462890

研究課題名(和文) 覆髄剤貼付による壊死層形成の役割 - 3D培養によるアラミンの硬組織誘導の解析 -

研究課題名(英文) Role of formation of necrotic layer by the pulp capping agents pasting

研究代表者

宮下 桂子 (Miyashita, Keiko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50636264

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)：本研究において、マウス象牙芽細胞にアラミンの一つである HMGB-1 を直接投与したところ、象牙芽細胞の石灰化は確認されなかった。そこでラットの歯髄細胞を培養し、この培地に HMGB-1 を投与してsi培養上清を回収し、この培養上清を象牙芽細胞系統の株細胞の培地に添加したところ、象牙芽細胞の増殖と石灰化がみられた。以上の結果より、歯髄の中にアラミンに反応して象牙芽細胞の石灰化誘導因子を出す細胞が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, when HMGB-1 which is one of Alarmin was directly administered to mouse odontoblast cells, mineralization of odontoblasts was not confirmed. Then, dental pulp cells of rats were primarily cultured, HMGB-1 was administered to this medium, the culture supernatant was collected, and the culture supernatant was added to the culture medium of the strain cells of the odontoblast lineage. However, proliferation and mineralization of odontoblasts was observed.

From the above results, it was suggested that there exist cells in the pulp in response to alarmin to give calcification factor of odontoblasts.

研究分野：歯科保存学

キーワード：アラミン 象牙芽細胞 石灰化

1. 研究開始当初の背景

水酸化カルシウムを歯髄組織に直接貼付すると、水酸化カルシウム直下に壊死層が認められるが、後に壊死層直下に「デンティンブリッジ」と呼ばれる硬組織が形成される。この硬組織は、歯髄組織中に存在する未分化間葉細胞から分化した象牙芽細胞により形成されると考えられているが、処置によって施された水酸化カルシウム、それによって生じた歯髄壊死層、周辺で生じた炎症などのどれが重要な働きをしているのか、具体的にどのような分子が働いて象牙芽細胞を分化誘導し、石灰化を開始させるのかは、不明の点が多い。

ところで、生体細胞は、侵襲に対して様々な応答をするが、侵襲が強く諸応答のプログラムまで障害されると、核までが障害されて壊死に至る。近年、この壊死細胞からも細胞生理活性をもったメディエータ「アラミン」が放出されて、侵襲に対し応答することが判明してきた。この因子は、壊死細胞から放出され、周囲の細胞に「非常事態宣言」をすることで、自然免疫や炎症を誘導し、生体防御、さらには修復を促す機能を果たす。また、アラミンは、小胞体 - ゴルジ体の経路を介さずに細胞外に放出されることから、壊死細胞の細胞構造の崩壊によって放出されると考えられる炎症因子の総称であり、核タンパクである HMGB-1 がよく知られている。申請者の研究室では、炎症歯髄組織において HMGB-1、さらには HMGB-1 の受容体である RAGE の発現が上昇することをいち早く明らかにしてきた(徳田ら、炎症歯髄組織における RAGE および HMGB-1 の発現, 日本歯科保存学会, 2008)。すなわち、歯髄細胞は、HMGB-1

が蓄積されており、かつ受容体を持っていることから、水酸化カルシウム貼付により壊死に陥った際には、HMGB-1 が放出される可能性が強く示唆された。

一方、共同研究者の田畑らは、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の初代培養、エナメル上皮などの組織培養、歯胚の器官培養などを中心にさまざまな機能研究を行っており(Matsumura et al., *Intn. J. Develop. Biol.*, 1998; Tabata et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 2003; Tabata et al., *Development* 1996; Liu et al., *Mech. Devel.*, 2000; Tabata et al., *Eur. J. Oral Sci.* 2002)、TDL 培養という上皮・間葉の共培養法(再構築実験法)を確立している(Notani et al., *Arch. Histol. Cytol.* 2009)。3D 培養下では個々の細胞が生体内に存在するときのような形態、反応をすることが知られている。

2. 研究の目的

水酸化カルシウム直接覆髄後の硬組織形成にアラミンが関与しているかどうか、具体的には、水酸化カルシウム貼付により生じる歯髄の壊死層からは、アラミンの一種である HMGB-1 が放出されており、これが周囲の歯髄細胞に働いて、象牙芽細胞を分化誘導し、石灰化の開始を促すことを検証する。

3. 研究の方法

(1)3D 培養

歯胚間葉細胞をコラーゲンゲルに分散・固化させて 3D 培養(立体培養)し、この 3D 層の上に上皮を重層する TDL 培養法(Notani et al., *Arch. Histol. Cytol.* 2009)を用いる。本研究では露髄状態の歯髄を再現する

ために、象牙芽細胞をコラーゲンゲルに分散・固化させて 3D 層のみの培養とする。

(2) マウス象牙芽細胞への HMGB-1 投与

マウス象牙芽細胞にアラミンの一つである HMGB-1 を直接投与し石灰化の有無をアリザリンレッド染色にて解析した。

(3) ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞への HMGB-1 投与

象牙芽細胞に分化することが報告されているヒト骨髄由来間葉系幹細胞に HMGB-1 を直接投与し石灰化の有無をアリザリンレッド染色にて解析した。

(4) ラットの歯髄細胞を初代培養し、この培地に HMGB-1 を投与し、培養上清を回収し、この、培養上清を象牙芽細胞系統の株細胞の培地に添加し、石灰化の有無をアリザリンレッド染色にて解析した。

4. 研究成果

マウス象牙芽細胞にアラミンの一つである HMGB-1 を直接投与したところ、アリザリンレッド染色にて石灰化は確認されなかったことから、象牙芽細胞に分化することが報告されているヒト骨髄由来の間葉系幹細胞に HMGB-1 を投与し、アリザリンレッド染色を行ったが、石灰化は確認されなかった。

そこで、歯髄の中にアラミンに反応して象牙芽細胞の石灰化誘導因子を放出する細胞が存在する可能性を考え、ラットの歯髄細胞を初代培養し、この培地に HMGB-1 を投与して3日後に培養上清を回収した。この培養上清を象牙芽細胞系統の株細胞の培地に添加したところ、象牙芽細胞の増殖と、石灰化が確認された。

また 3D 培養については、マウス象牙芽細胞をもちいた実験で、コラーゲンゲル中にて

象牙芽細胞に特徴的な突起様形態とマーカー遺伝子の発現を確認した。

以上の結果より、アラミンの一つである HMGB-1 は象牙芽細胞に対して石灰化を直接的に誘導することはできないものの、歯髄の中にアラミンに反応して、象牙芽細胞の石灰化誘導因子を出す細胞が存在す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 1 件)

Tokuda M, Fujisawa M, Miyashita K, Kawakami Y, Morimoto-Yamashita Y, Torii M: Involvement of TRPV1 and AQP2 in hypertonic stress by xylitol in odontoblast cells. Connect Tissue Res, 56, 1, 44-9, 2015,

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

宮下 桂子 (Miyahsita Keiko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50636264

(2) 研究分担者

徳田 雅行 (Tokuda Masayuki)

鹿児島大学・歯学部・准教授

研究者番号：20253891

田畑 純 (Tabata Makoto)

東京医科歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20243248

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()