

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462893

研究課題名(和文) Enamel matrix proteinによる歯髄創傷治癒のメカニズムを探る

研究課題名(英文) Exploring mechanism of pulp healing by Enamel matrix protein

研究代表者

中村 裕子 (Nakamura, Yuko)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：50265360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯髄保存と歯髄再生に有効なEnamel matrix proteinの機能を解析することが目的であった。そのためエムゲイン・ゲル(ピオラ社製)を用い、ラット臼歯の直接覆髄や脛骨穿孔後の治癒過程を検討した。また血管新生・組織誘導について検討した。

結果：ラット歯髄や脛骨穿孔後の創傷治癒に対して促進効果があることが認められた。組織誘導効果を検討した結果、多くの血管を含んだ結合組織の誘導が観察された。血管内皮細胞の管腔形成を促進した。これらの結果から新生血管・結合組織の誘導能を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the function of Enamel matrix protein effective of dental pulp preservation and regeneration. Therefore, we examined the healing process after direct pulp of rat molars and promoting effect of bone regeneration in the tibia using Emdogain gel (Strauman US). In addition, the effect of angiogenesis and tissue induction was examined.

Results: It was found that there was a promoting effect on wound healing of rat pulp and tibia. Induction of connective tissue containing many blood vessels was observed by EMD. EMD promoted tube formation of the vascular endothelial cells. These results suggest that it was ability to induce neo vasculature and connective tissue.

研究分野：歯内療法学

キーワード：エナメルマトリックス 血管新生 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) 再生医療分野の進歩により、骨髄幹細胞は、象牙芽細胞へ分化することや硬組織形成能を有することが報告されていた。歯の幹細胞としての歯髄細胞、歯小囊細胞においても検討が行われ、組織工学での応用が期待され始めていた。

根管形成後の根管腔に歯髄幹細胞や他の幹細胞を三次元培養ゲル(マトリゲル)とともに移植し、歯髄の再生と歯髄細胞から分化した象牙芽細胞による修復象牙質の形成を誘導し、歯質の強化と根管の閉鎖を期待する、歯髄再生療法が検討されていた。しかし、三次元培養ゲルだけでは、移植後の栄養源の追加となる血管組織の侵入や細胞の定着力が低く、課題も多く挙げられていた。さらに歯根膜細胞や歯周組織細胞の侵入、根管自体の無菌化など、課題は山積されていた。

(2) 露出した生活歯髄の創傷面では、歯髄組織に対する歯髄覆髄剤の影響が歯髄細胞の分化と増殖に高い影響を与えていることが認められていた。歯髄細胞により誘導された象牙芽細胞による修復象牙質形成が歯髄保存の重要な機構であり、加えて高い封鎖性のある材料での仮充填が求められていた。これまで、広く用いられている覆髄材である水酸化カルシウム製剤は、硬組織誘導能をもつ抗菌性材料であるが、歯髄組織に対する炎症反応や壊死層が形成されることが報告されており、さらに、形成後の硬組織が多孔性であることなどが挙げられていた。これらのことから、組織障害性が低く、象牙芽細胞による硬組織形成を迅速に誘導できる覆髄材が望まれていた。

2. 研究の目的

(1) 直接覆髄材として、これまでのような水酸化カルシウム製剤などの材料を用いるだけでなく、生物学的な活性作用を有する治療剤を応用する。そこで、すでに市販され、臨床で広く応用されている Emdgain® Gel (EMD) (Straumann 社製) を用い、創面の細胞を積極的に働きかけ、生物学的に望ましい治療を誘導させる。さらに確実な歯根部の封鎖材を併用することにより、象牙芽細胞の配列と緊密で機能的にも優れた修復象牙質の形成を期待できる直接覆髄法を検討する。

(2) 組織再生誘導剤である EMD は、歯周疾患に罹患した患者に対する外科的手術に用いることで、垂直性骨欠陥部の骨組織再生において良好な治療成績をあげている。この詳細について、セメント質形成と歯根膜再生のための間葉系細胞の分化誘導の促進を有することが知られている。さらに、上皮組織の成長に対しては、抑制的に働くこと、歯根表面への歯根膜細胞の付着や定着を誘導することなどが挙げられている。しかし、臨床的な観察による報告が多く、機能の詳細は明らかにされていない。実際、セメント質や歯根膜細胞のみを誘導すること以外に EMD によって誘導され、増殖促進作用を得られるのは、どのような組織なのかについて検討し、さらに、EMD の機能に関わる因子を明らかにする。これにより、歯髄保存療法における覆髄材としての可能性に科学的根拠を見出す。EMD の生物学的活性の機能を明らかにすることによって、歯髄再生誘導法 (= 歯髄再生療法) のための補助的な効果の有無を検討する。EMD により、歯髄再生療法の際の細胞が定着する足場の確保、細胞が生存するための血管の侵入促進と新生血管の形成促進、組織の誘導や細胞の遊走能の強化が得られるとすれば、EMD の応用による効果は大きいと考えられる。これらの機能の有無と、それに関わる因子を検討することを目的とした。

細胞のみを誘導すること以外に EMD によって誘導され、増殖促進作用を得られるのは、どのような組織なのかについて検討し、さらに、EMD の機能に関わる因子を明らかにする。これにより、歯髄保存療法における覆髄材としての可能性に科学的根拠を見出す。EMD の生物学的活性の機能を明らかにすることによって、歯髄再生誘導法 (= 歯髄再生療法) のための補助的な効果の有無を検討する。EMD により、歯髄再生療法の際の細胞が定着する足場の確保、細胞が生存するための血管の侵入促進と新生血管の形成促進、組織の誘導や細胞の遊走能の強化が得られるとすれば、EMD の応用による効果は大きいと考えられる。これらの機能の有無と、それに関わる因子を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 硬組織創傷治療への EMD の検討。

実験には、20 匹の 6 週齢、体重約 250g の雌 Sprague-Dawley rat 系 (SD ラット) を用いた (株式会社日本クレア: 東京)。ラットに対し、イソフルラン (エスカイン、ファイザー: 東京) を吸引させて前麻酔し、次に、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬: 東京) の腹腔内投与 (5.0×10^{-2} mg/体重 g) による全身麻酔を施した。

直接覆髄: 麻酔発現後、滅菌生理食塩水の注水下にて MI ダイヤモンドバーを 5 倍速マイクロモーターハンドピース (S7 200MI, ヨシダ: 東京) に接続し、16000 rpm の回転数で上顎第一臼歯の咬合面に直径 1mm の露髄面を作成した。その後滅菌生理食塩水により洗浄し、滅菌ペーパーポイントにて圧迫止血を行った。止血を確認後、1) 左側臼歯に対して EMD を用いて覆髄した。EMD 上部の窩洞は、1 ステップボンディング材 (G-BOND PLUS, GC: 東京) を用いて、指示通りに歯面処理を行い、光重合型コンポジットレジン (UNIFIL FLOW, GC) にて窩洞を充填した。2) 右側臼歯の露髄面と窩洞に対しては、直接的に上記と同様のボンディング処置を行い、コンポジットレジンにて充填を行い、対照群とした。術後、実験動物は、5、7、10 日および 21 日間の恒温恒湿 (室温 23 ± 3 , 湿度 $50 \pm 10\%$) に保たれた飼育室にて飼育した (照明条件は 8:00 点灯, 20:00 消灯)。

脛骨への穿孔: 上記同様に麻酔発現後、左右の脛骨前面部皮膚に対してアルコールにて消毒し、フェザー外科用ディスポーサブル No11 を用いて切開を行った。露出された脛骨に対して、0.8mm のダイヤモンドバーを 5 倍速マイクロモーターハンドピースに装着し、16000 rpm の回転数で直径 1mm の骨髄まで達する穿孔を行った。得られた創面に対し EMD を塗布し、直ちに皮膚の縫合を行った。1, 2, 4, 7, 14 日間上記同様に飼育環境にて飼育した。

組織学的観察: それぞれの観察期間が終了

したラットは、イソフルラン吸引によって安楽死させ、それぞれの試料を摘出した。その後標本は、10%中性緩衝ホルマリン液(pH7.4, 和光純薬：大阪)に24時間浸漬し、固定を行った。その後、アルコールによる脱脂を行い、続いて10%EDTA(和光純薬：大阪)によるキレート液を使用し4週間の低温室中でローター(Intelli-Mixer RM-2M, ELMI)にて搅拌を行いながら、24時間毎に脱灰液を交換し、4週間脱灰した。通法に従い脱水およびパラフィン包埋を行い、近遠心方向に厚さ4 μ mの連続切片を作製した。その後ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を行い、光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

(2)ディフュージョンチャンバーを用いた組織誘導の検討。

両側を孔径0.22 μ mのメンブレンフィルター(Millipore社製)で閉じた直径9mmのディフュージョンチャンバー(DC)内にEMDを封入した。このDCをペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔した9週齢のSDラットの腹腔内に埋植した。コントロールとして、DC内にプロピレングリコールアグリゲートを挿入したものをを用いコントロールとした。上記実験と同様の飼育環境下で飼育した。また飼育中に半導体レーザー(Lumix2[®])を用いて120JのLLLTレーザーを毎日照射したのも同様に観察した。4週間後にDCを取り出し、周囲に付着した組織ごと10%中性ホルマリン溶液にて24時間固定し、通常のパラフィン包埋後、厚さ4 μ mの連続切片とし、一般形態観察と免疫組織学的染色による観察のために染色を行った。一般染色として、H-E染色と結合組織の観察のためAzan染色を行った。さらに、免疫染色は、VEGF抗体とLectin ECA抗体を用いた。

(3)血管形成促進効果

血管形成に対する促進効果を検討するため、HUVECsの培養を行った。24穴ウィルプレート中で、VEGFを10ng/ml, 5ng/ml, 1ng/mlとなるように調整した培養液を用いて培養した。また、他のウェルには同様にEMDを50 μ g/ml, 25 μ ml, 12.5 μ mlとなるように添加した。さらに、VEGFとEMDの相乗効果を検討するため、50 μ mlのEMDにVEGF5ng/ml, 2.5ng/mlとなるように調整した培養液を用いた。Suramin10ng/ml添加したものをネガティブ群として用いた。各培養液にて11日間培養後、血管新生ソフトウェアを用いて、血管組織構造における管腔長、管腔面積、管腔交差点数、パス本数などの数値化解析を行った。この研究には、再現性を確認するため、同様の実験を繰り返した。

4. 研究成果

(1)ラット歯髄ならびに脛骨の穿孔による硬組織損傷後の治癒形態を観察したところ、EMD使用群の治癒形態のほうが明らかに迅

速かつ良好な状態を示した。特に脛骨損傷部において、損傷初期における汚染した組織の排出がコントロール群に比較して速やかに行われていることが観察された。さらに新たな硬組織形成もコントロール群よりも早い段階から行われていることを認めた(Fig.1)。これらの原因として、損傷後の組織に早期に血管の侵入と血管内皮細胞様細胞の配列が速やかに行われ、新しい骨組織の新生が行われていることが観察された。形成された硬組織は血管に囲まれた緻密な構造を呈していた。この結果から、EMDによる血管誘導が関与したのではないかということが示唆された。

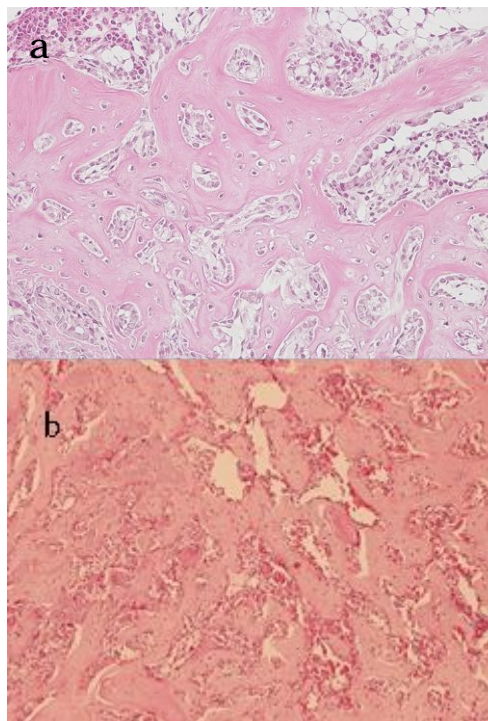


Fig.1: 7日後、脛骨の硬組織形成の様相
a: EMDに誘導された硬組織

b: 同コントロール

EMD群は、緻密な骨形成と血管内皮細胞の配列した血管腔が認められた。コントロール群では、炎症性細胞もまだ残存する中で、管腔用の形態と不均一な硬組織の形成が観察された。

(2)ディフュージョンチャンバーを用いたEMDの組織誘導の検討

EMDを挿入し、両側部をメンブレンフィルターで封鎖したDCをラットの腹腔内に静置することにより、フィルター孔からゆっくりと溶出するEMDにより、メンブレンに付着する組織を検討することで、EMDの組織誘導の効果を検討したものである。同様にプロピレングリコールをDC内に挿入し、ラットの腹腔内に静置したものを比較した。4週間経過後、ラットより摘出した。

観察：DC周囲には豊富な結合組織と血管が付着していた。また、この組織

は、メンブレンに強固に吸着しているものが多く認められた。プロピレングリコールを挿入したコントロール群では、結合組織や血管の付着はほとんど見られなかった(Fig.2)。また、付着はあってもすぐに剥がれてしまい、フィルターに強固に吸着する様子が見られるものは皆無であった。さらにわずかに付着している組織の血管数も少なかった。これらの誘導された組織をメンブレンとともに組織切片そして形態学的に観察した。He および Azan 染色を行った結果、豊富な結合組織と明らかな血管組織が観察された。これらのことから、EMD は、結合組織や新生血管の誘導能を有することが示唆された(Fig.3)。レーザー照射による違いは、認められなかった。

上記同様に作成された試料に対して、VEGF 抗体および Lectin ECA 抗体を用いた免疫組織染色を行った。VEGF 抗体を用いた染色により、誘導された組織は陽性反応を示した。特に血管形成部では、強い反応を示した。一方、Lectin ECA 抗体を用いた染色では、陰性様の反応を示した(Fig.4)。

VEGF は、血管内皮細胞増殖因子受容体に結合し、細胞分裂や遊走、分化を刺激し、微小血管の血管透過性を亢進させる働きを持つとされている。エムドゲインにより形成されたマトリックス層に組織より誘導された二次的な VEGF に対し、VEGF 抗体が反応したためであるか、もしくは EMD 自体が初期に VEGF 様の働きを示し、それに伴い組織誘導が促進されたものであるかについては不明である。一方、Lectin の強い陽性反応がみられなかった。Lectin は、細胞膜表面の糖たんぱく質や糖脂質などの糖複合体に結合し、細胞を活性化するとされている。メンブレン表面に誘導され吸着した組織内の細胞には、糖質系の細胞の活性が働いていたとは言い難い。これらの結果より、EMD により誘導された組織内での細胞は、VEGF による機能更新の関与が示唆された。

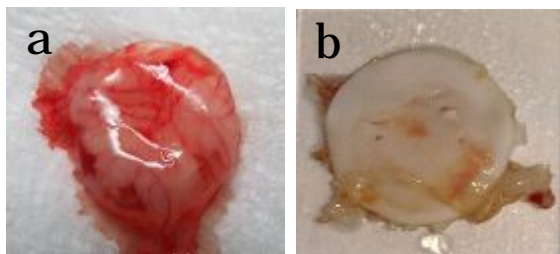


Fig.2: 摘出した DC と付着する組織
a: EMD
b:プロピレングリコール(cont.)
EMD を挿入した DC 周囲には多量の組織が

付着していた。

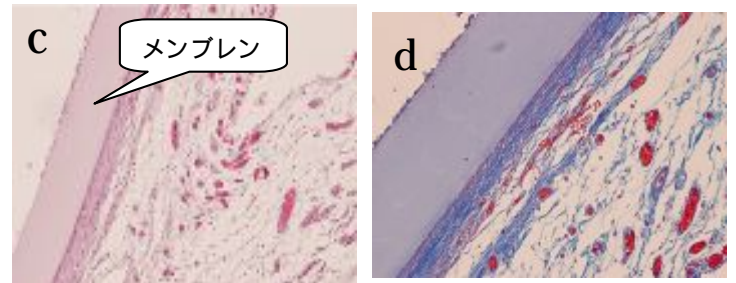


Fig.3:EMD 挿入群のメンブレンに付着した組織の標本

c: He 染色, d.同 Azan 染色

多量の血管様組織を含み、メンブレンと強固に接着した結合組織様の組織が観察された。

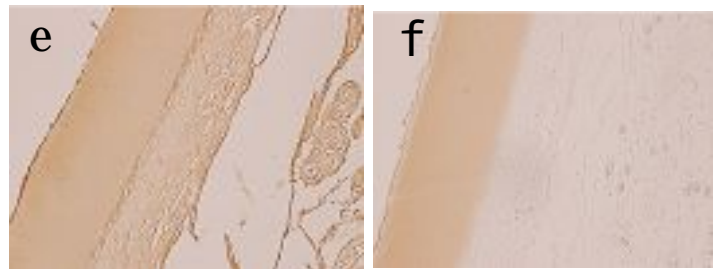


Fig.4 : EMD 挿入群のメンブレンと付着した組織, 免疫染色像

e:免疫染色(抗 VEGF), f:免疫染色(抗 Lectin ECA) VEGF 抗体を用いた免疫染色により、強く染色されていることが認められた。LectinECA 抗体を用いた染色では、強い染色は認められなかった。

(3) 血管形成促進効果

ヒト血管内皮細胞に対する血管様組織の形成能に対する EMD の効果を検討したところ、血管形成を促進することが認められた。最も高い血管形成を示したのはポジティブコントロールとして用いた VEGF であったが、EMD を添加した培養液中で培養した群も多量の管腔形成が認められた。また、EMD と VEGF の相互作用では、相乗的な効果を示した。さらに EMD 添加群は、新生された血管腔の数量のみではなく、管腔の太さや分岐 (path) や吻合(joint)も多く認められた(Fig.5, Fig.6, 7)。

これらの結果から、血管形成効果とともに、細胞の遊走能を促進している可能性が示唆された。

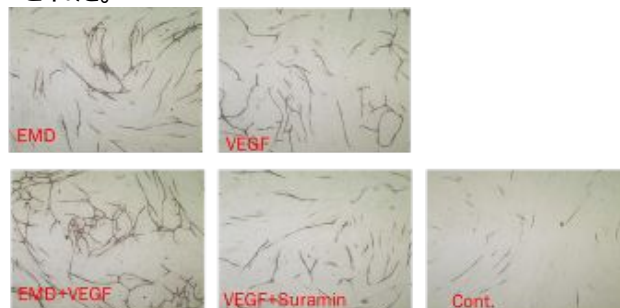


Fig.5: 培養後形成された血管腔

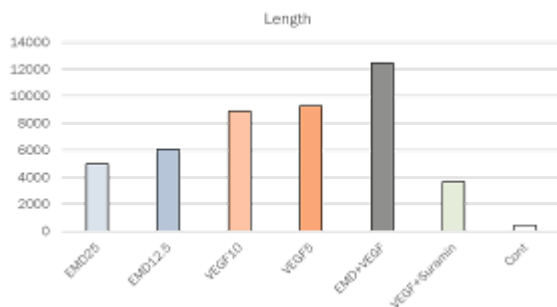


Fig.6: 形成された血管腔の長さ

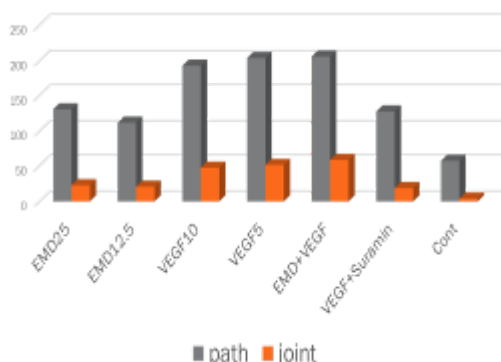


Fig.7: 形成された血管腔の吻合と分岐

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中村 裕子, 市村 葉, 井出 祐樹, 小澤 有美, 高良 芳樹, 横山 博一, 田辺 一成, 横瀬 敏志: エナメルマトリックス蛋白の血管新生への効果, 日本歯科保存学会学術大会 143 回, 2015.11 文京ホール(東京)

中村 裕子, 井出 祐樹, 日下洋平, 高橋 淳哉, 横瀬 敏志, エナメルマトリックス蛋白の結合組織および血管新生誘導効果, 第 34 回 日本顎咬合学会学術大会, 東京国際フォーラム(東京)

〔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

中村 裕子 (NAKAMURA Yuko)
明海大学・歯学部・講師

研究者番号: 50265360

(2)研究分担者

森 一将 (MORI Kazumasa)
明海大学・歯学部・准教授

研究者番号: 80372902

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

横瀬 敏志 (YOKOSE Satoshi)
明海大学・歯学部・教授