

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11546

研究課題名(和文) -SMA陽性に転化した細胞の動態から歯髄組織修復・再生メカニズムの解明に挑む

研究課題名(英文) Role of alpha-SMA expressing cells in dental pulp wound 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕あるいは外傷などによって歯髄が傷害された際の治療の第一選択は、歯髄組織を保存する治療である。象牙質様の硬組織を継続的に形成する修復象牙芽細胞を早期に誘導することで外部刺激を遮断し、歯髄組織の恒常性を維持することが必要となる。そのためには、その修復機構を知ることが重要であるが、未だに多くの部分が謎である。本研究において -SMA陽性を呈する細胞が、その鍵となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄幹細胞の存在する場所の1つとして、pulp coreと呼ばれる歯髄組織の中心部にある太い血管があげられている。本研究において、このpulp coreに存在するある種の -SMA陽性壁細胞が増殖し、創傷部位に移動し、修復象牙芽細胞に分化する可能性が示唆された。その際、骨髄由来のfibrocyteと称される細胞も歯髄組織に入り込み、治癒の促進をしていることも示唆された。これらのことは、歯髄組織が少しでも残っていれば、その組織を再生に導くことができる可能性を示唆するものであり、学術的、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp is a soft connective tissue encased in mineralized dentine. When dentine continuity is disrupted by caries or traumatic injury, the resident odontoblasts are also destroyed at that site. Pulp capping agents can help to cover the site through the production of a mineralized matrix through the activation of newly differentiated odontoblast-like cells, however, the exact mechanisms of the process have not been fully revealed. The present study has demonstrated that -SMA expressing cells play a crucial role in the wound healing.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄保存治療 創傷治癒 -SMA fibrocyte

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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。歯髄が傷害された際の治療の第一選択は、歯髄組織を保存する治療である。象牙質様の硬組織を継続的に形成する修復象牙芽細胞を早期に誘導することで外部刺激を遮断し、歯髄組織の恒常性を維持することが必要となる。一方で、どの細胞が修復象牙芽細胞に分化できるのかは、未だに謎であり、その細胞を同定することは歯髄組織の保存治療のために不可欠であると考えられる。一方で、その細胞を分化・誘導させるための環境についての理解も同時に重要である。

2. 研究の目的

修復象牙芽細胞になり得る候補として、 α -SMA 陽性を呈す細胞すなわち筋線維芽細胞と称される細胞が示唆された (Yoshida et al., 2012)。筋線維芽細胞は、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、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」とも言われる。さらに近年、循環血液中には骨髄由来の線維芽細胞の前駆細胞 fibrocyte が存在し、それらが創傷部位に遊走集積し、 α -SMA 陽性筋線維芽細胞に分化し創傷治癒に関わることが、他の組織で報告されている (Nat Rev Immunol, 2011)。よって本研究では、 α -SMA 陽性に転化する細胞動態を解析することで、より有効な歯髄保存・再生治療の創生を目的としている。

3. 研究の方法

本研究の実施計画は、新潟大学歯学部倫理委員会において承認を受けている。

本研究の趣旨を説明し了解の得られた患者様の、矯正治療上要抜去と診断された智歯を用いた。通常の臨床で覆髄剤として用いられる MTA を使用し、歯髄直接覆髄後の組織反応の解析を行った。動物実験 (ラット) も同様に計画した。

1) ヒト歯髄組織の in vivo における fibrocyte の検索

Fibrocyte を同定するためのシングルマーカーは無く、組織中の fibrocyte の識別には、造血系細胞の指標である CD45 と 間葉細胞の指標である I 型コラーゲンの共発現が必要とされる (Nat Rev Immunol, 2011)。観察期間を、7、14、35 日とし、抜歯後凍結切片を作成し、fibrocyte の局在を免疫組織化学的に検索した。同時に、 α -SMA 発現との関連も検索した。

2) ラット臼歯創傷治癒における α -SMA 発現細胞の動態検索

ラット臼歯を用い MTA での覆髄処置を行った。観察期間を 1、3、5、7、14 日とし、抜歯後凍結切片を作成し、 α -SMA とその発現に関わる因子について免疫組織化学的に、さらにその遺伝子の発現について検索した。

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) ヒト歯髄組織創傷治癒過程において、fibrocyte の出現は時間的空間的に制御されその治癒に関与している事を示唆するデータが得られた。Myofibroblast の前駆細胞として、幾つかの種類が列挙されているが、そのうちの1つに、骨髄由来の fibrocyte がある。骨髄由来を示す CD45 のマーカーと、間葉系細胞であることを示す I 型コラーゲンの共陽性を示すこの細胞は、近年報告された細胞であり、歯髄組織における fibrocytes に関するデータはこれが最初であると思われる。

健全歯髄組織においては、CD45/I 型コラーゲン共陽性を示す fibrocytes は認められなかった。一

方、CD45-/I型コラーゲン+の細胞は、血管壁細胞において観察された(図1)。血管壁細胞は -SMAとNG2を発現することがすでに知られている。このNG2陽性細胞の一部は、I型コラーゲンを産生することが確認された(図1)。歯髄では、象牙芽細胞がI型コラーゲンを産生する細胞としてよく知られている一方で、歯髄固有組織では他の組織の

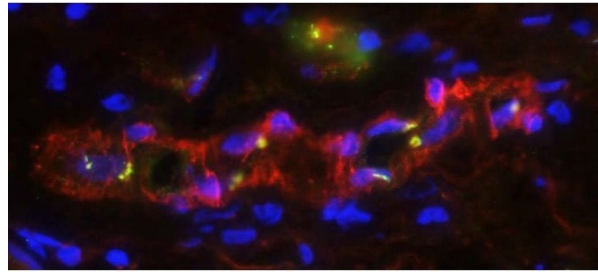


図1 健全歯髄では血管の壁細胞にI型コラーゲン陽性細胞が局在する。緑: I型コラーゲン; 赤: NG2; 青: 核

ように、線維芽細胞がI型コラーゲンを産生すると考えられてきた。しかしながら、本研究ではそのような所見は見られず、歯髄線維芽細胞と称される細胞は、他の組織とは全く異なるものであることが示唆された。CD45は細胞分化とともに発現が消失することを考えると、血管壁細胞に局在するI型コラーゲン陽性細胞は、骨髄由来のfibrocyteであった可能性が示唆される。今後、様々な病態で、この血管壁に存在するI型コラーゲン陽性細胞の動態を検索することが必要だと思われる。

歯髄創傷治癒過程において、fibrocyteの存在が確認されたのは、術後7日目においてであった。創面直下ではなく、その下層に多くのfibrocytesの浸潤が観察された。これらの一部は、血管壁に沿って局在していた。術後14

日目においては、覆髄剤下に線維性基質の形成が認められ、活発な血管新生と紡錘形細胞の集積が認められ、同部位にfibrocyteの遊走が観察された(図2)。これらの細胞は、vascular endothelial growth factor (VEGF)を発現していたことから、血管新生に関与してい

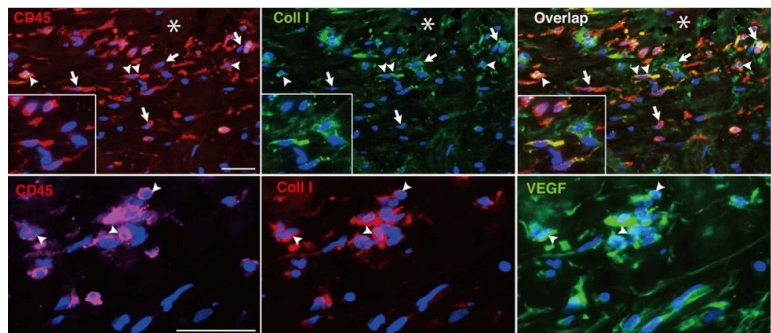


図2 術後14日目において、覆髄剤下に線維性基質の形成が認められた(*)。その基質直下には活発な血管新生と紡錘形細胞が集積し、同部位にfibrocyteが遊走していた(上段)。それらのfibrocyteはVEGFを発現していた(下段)。

ると考えられた。さらにその一部は、-SMAも同時に発現していたが、-SMA陽性細胞全体に対する比率は小さく、歯髄組織においてfibrocyteはmyofibroblastsのメインソースではないものと考えられた。術後35日で、覆髄下に硬組織が形成されると、fibrocyteはほとんど観察されることはなかった。

これらのことより、歯髄組織においてfibrocyteは、創傷治癒過程初期に認められ、特に血管の新生に関与していることが示唆された。

2) ラット歯髄組織創傷治癒過程において、-SMA陽性のmyofibroblastはpulp coreから供給され、その後創傷部に移動し、新たな象牙質様被蓋硬組織(dentin bridge)の形成に関与すると考えられた。Pulp coreと呼ばれる歯髄組織の中心部には太い血管があり、歯髄幹細胞の存在する場所としての報告が幾つかなされている。受傷3日後にmyofibroblastは、pulp coreを中心に出現し、その後受傷部に集積した。-SMAの発現は幹細胞や前駆細胞との関連も示唆されていることから、pulp coreに出現するmyofibroblastと幹細胞や前駆細胞には何らかの関わりがあると考えられた。また、その-SMAの発現にはTGF- β 1やEDA-fibronectinの関与が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

N Yoshiba, N Edanami, A Tohma, R Takeuchi, N Ohkura, A Hosoya, Y Noiri, H Nakamura, K Yoshiba. Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. International Endodontic Journal. 51(11):1187-1195,2018.

N Edanami, N Yoshiba, N Ohkura, R Takeuchi, A Tohma, Y Noiri, K Yoshiba. Characterization of dental pulp myofibroblasts in rat molars after pulpotomy. Journal of Endodontics. 43(7):1116-1121, 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

N Yoshiba, N Edanami, A Tohma, R Takeuchi, N Ohkura, Y Oda, A Hosoya, Y Noiri, H Nakamura, K Yoshiba. Bone marrow-derived fibrocytes are involved in human dental pulp repair. IADR General Session. 2018.

吉羽永子, 大倉直人, 細矢明宏, 中村浩彰, 野杵由一郎, 吉羽邦彦. ヒト歯髄組織創傷治癒過程における骨髄由来間葉系前駆細胞 fibrocyte の動態検索. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017.

枝並直樹, 吉羽永子, 大倉直人, 野杵由一郎, 吉羽邦彦. ラット臼歯断髄後における myofibroblast の動態解析. 第50回新潟歯学会総会. 2017.

枝並直樹, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 大倉直人, 竹内涼介, 遠間愛子, 野杵由一郎. 歯髄創傷治癒過程におけるマクロファージの集積と myofibroblast 様細胞の分化. 日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会. 2017.

N Yoshiba, K Yoshiba, N Ohkura, N Edanami, R Takeuchi, A Tohma, Y Oda, A Hosoya, H Nakamura, T Okiji. Fibrillin-1 microfibrils influence human dental pulp regeneration. IADR Pulp Biology and Regeneration Group Symposium. 2016.

N Edanami, N Yoshiba, N Ohkura, R Takeuchi, A Tohma, K Yoshiba. Myofibroblasts in dental pulp healing after pulpotomy with mineral trioxide aggregate (MTA) in rat molars. IADR Pulp Biology and Regeneration Group Symposium. 2016.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：吉羽 邦彦

ローマ字氏名：Yoshiba Kunihiko

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 30220718

研究分担者氏名：大倉 直人

ローマ字氏名：Ohkura Naoto

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学総合病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00547573

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。