

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670808

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞からの活性化マクロファージ分化誘導と歯髄組織再生への応用

研究課題名(英文) Application of activated macrophages derived from dental pulp stem cells to dental pulp tissue engineering

研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80204098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、活性化マクロファージが歯髄組織再生に果たす役割を検索することを目的とした。すなわち、歯髄から分離したED2陽性マクロファージを幹細胞とともにラット臼歯歯冠歯髄腔に移植し、再生組織中におけるマクロファージマーカー発現を解析した。その結果、あらかじめED2陽性細胞にIL-4を作用させたのち移植した場合に、再生歯髄組織中のED2陽性細胞の有意な増加とCD34、CD163 mRNA発現の亢進が確認された。幹細胞とマクロファージを混合して移植すると、M2マクロファージが再生歯髄組織で増殖し、組織修復マクロファージとして機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the role of macrophages in the regeneration of dental pulp tissues. After co-implantation of ED2-positive macrophages isolated from rat dental pulp with stem cells into the coronal pulp chamber of pulpotomized rat molars, expression of macrophage markers in the engineered pulp tissue was analyzed. When IL-4 treated ED2-positive macrophages were co-implanted with stem cells, the engineered tissues showed a significant increase in the number of ED2-positive cells and the expression of CD34 and CD163 mRNAs. These findings suggest that M2 macrophages show proliferation and act as wound healing macrophages after co-implantation of macrophages with stem cells.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯内治療学 歯髄組織再生 歯髄幹細胞 マクロファージ スキャホールド

1. 研究開始当初の背景

歯髄に細菌感染が生じた場合、現在なお多数の症例で抜髄を施さざるを得ない。しかし、除去された歯髄組織の再生が可能となれば、歯の生来の機能が回復するとともに物性が向上し、歯の残存期間の飛躍的延長が期待される。

このような観点から幹細胞移植による歯髄組織再生療法の可能性が探索されており、歯髄や歯乳頭由来の幹細胞をスキャホールドとともに埋植することにより歯髄様組織が形成されることを示した報告がなされつつある。

申請者らも上述の点に着目して検索を重ねており、米国ミシガン大学との共同研究において、ヒト乳歯由来幹細胞およびヒト血管内皮細胞を poly-L-lactic acid (PLLA) スキャホールドとともにヒト抜去歯スライスに歯髄腔内に移植、再生組織を免疫不全マウス背皮下において増殖させることにより、象牙芽細胞様細胞の配列を含め、正常歯髄組織に形態学的・組織学的・分子生物学的に類似する歯髄様組織を再生させることに成功している。

一方、近年、活性化マクロファージに数種の亜群が存在し、機能に応じて生体防御修復機構に関与することが注目されている。すなわち、IFN や TNF などの刺激で活性化された古典的活性化マクロファージのみならず、IL-4 などの刺激で形成され組織修復等に関与する創傷治癒マクロファージ、あるいは IL-10 刺激で形成される制御性マクロファージの存在が知られている。創傷治癒マクロファージや制御性マクロファージについては、組織再生を促進させるとの報告がみられる。

他方、申請者らは上述のように、幹細胞と血管内皮細胞を用い、ヒト抜去歯の歯髄腔内に、正常歯髄組織に形態学的・組織学的に類似する歯髄様組織の再生を確認したが、さらにこの再生組織中でマクロファージが分布することから、これらが幹細胞より分化し、足場の吸収のみならず、血管新生や組織再生促進に関与することを示唆する知見を報告した。

2. 研究の目的

本研究は、歯髄幹細胞から分化したマクロファージを単離・培養後、これらを古典的活性化マクロファージあるいは創傷治癒マクロファージの方向に分化させたのち、幹細胞とともに移植して歯髄組織を再生させることで、幹細胞から分化させた活性化マクロファージが歯髄組織再生に果たす役割を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット切歯歯髄幹細胞の分離

実験動物として雄性 Wistar ラットを用い、スクレーパーにより歯根膜組織、歯肉組織を除去後、歯質表面を消毒したのち、切歯を横断して歯髄組織を摘出した。摘出した切歯組織群に対して、コラゲナーゼ/ディスパーゼを用いて細胞を分離後、培養を行った。培養 2 週間後、歯髄細胞を CD146 抗体で標識後、DynaMag と Dynabeads を用いて標識し、CD146 陽性細胞の分離を行った。さらに、MAP1-B 抗体で標識後、DynaMag と Dynabeads を用いて標識し、CD146+MAP1-B+ラット切歯歯髄幹細胞の分離を行った。

(2) ED2 陽性細胞の分離

実験動物として雄性 Wistar ラットを用い、切歯を抜歯後、切歯の先端および末端部を横断し、歯髄組織を除去した。実験 1 で得られた幹細胞を、顕微鏡下において、流動的スキャホールド (Matrigel) とともに切歯歯髄腔へ注入し、培養液中において 7 日間、組織培養した。

切歯歯髄腔内に再生した歯髄組織を、コラゲナーゼ/ディスパーゼを用いて細胞分離し、ED2 抗体 (抗組織常在性マクロファージ)、Dynabeads® 用いて標識し、ED2 陽性細胞の分離を行った。

(3) 活性化マクロファージの臼歯歯髄への移植

分離した ED2 陽性細胞を以下の 3 群に分けた。

- ・ ED2 陽性マクロファージの細胞培養液中に、TNF を添加した群。
- ・ ED2 陽性マクロファージの細胞培養液中に IL-4 を添加した群
- ・ ED2 陽性マクロファージの細胞培養液中に生食を添加した群 (コントロール群)

雄性 Wistar ラットの上顎第一臼歯の咬合面を切削し露髄させ、冠部歯髄を除去した。実験 3 で作成した活性化マクロファージとラット骨髄間葉系幹細胞を混合した流動的足場 (Matrigel®) を、PLLA スキャホールドとともに歯髄腔へ移植し、7 日間経過後の再生歯髄組織を顎骨ごと摘出した。

幹細胞のみ移植群をコントロールとした。

採取した試料を固定し、脱灰した後、連続凍結切片を作成した。再生歯髄組織を組織学的あるいは ED1, ED2、およびクラス II MHC 抗体を用い免疫組織学的に検索した。また凍結切片より、冠部歯髄と根部歯髄にわけて顕微鏡下で組織を採取し、それぞれの組織より total RNA を抽出した。そしてリアルタイム PCR を用いて、CD34 mRNA および CD163 mRNA 発現の定量的解析を行った。

4. 研究成果

雌性 Wistar ラット切歯歯髓より歯髓組織を摘出後、CD146 抗体、MAP1-B 抗体および DynaMag と Dynabeads を用いて CD146+MAP1-B+幹細胞を単離した。歯冠部と根尖部を切断後、歯髓組織を除去した管状の切歯に、切歯より単離増殖させた CD146/MAP1-B 幹細胞(または市販の骨髄間葉系幹細胞)を流動性ハイドロゲルとともに注入し、1週間の組織培養を行い、切歯の歯髓腔再生歯髓組織を免疫組織学的に観察し、再生歯髓組織内に ED2 陽性マクロファージ様細胞の存在を確認した。さらに再生歯髓組織中より、酵素試薬を用いて ED2 陽性マクロファージ様細胞を、ED2 抗体および DynaMag と Dynabeads を用いて単離した。この実験系からは、切歯 1 歯あたり約 2×10^2 の ED2 陽性マクロファージが単離可能であった。

マクロファージと幹細胞を混合移植して再生した歯髓組織と、幹細胞のみを移植して再生した歯髓組織の免疫細胞の分布を比較するために、ED2 陽性マクロファージとラット骨髄間葉系幹細胞を混合し、流動的スキャホールドと PLLA スキャホールドとともに、実験的に冠部歯髓を除去したラット上顎臼歯に移植したところ、すべての実験群において歯髓組織の再生が確認された。マクロファージと幹細胞を移植したすべての実験群は、幹細胞のみを移植した実験群と比較して、再生組織における ED2 陽性細胞の有意に高密度な分布を確認した。

また、細胞培養液中に IL-4 を添加した ED2 陽性マクロファージの移植群は、IL-4 を添加しないマクロファージを移植した群および生食を添加したマクロファージを移植した群(コントロール)群と比較して、ED2 マクロファージが冠部歯髓に有意に多数存在していた。一方、細胞培養液中に TNF を添加した ED2 陽性マクロファージの移植群においては、ED1 陽性細胞が、他のマクロファージ移植群と比べて冠部歯髓に有意に多数存在していた。

M2 マクロファージマーカーである CD34 mRNA、CD163 mRNA 発現の亢進は、幹細胞のみ移植群と比較して、すべてのマクロファージ移植群で確認された。とくに IL-4 を添加しマクロファージを移植した群において、最も大きな CD34 mRNA および CD163 mRNA 遺伝子の発現増強が観察された。

以上のことから、再生歯髓組織において、幹細胞とマクロファージを混合して移植すると、M2 マクロファージが再生部位において増殖し、再生組織において組織修復マクロファージとして機能してい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 3 件)

金子友厚. 幹細胞を用いた歯髓組織再生におけるマクロファージ様細胞について. 日本歯内療法学会雑誌 2015, 36(1),13-16 (査読無).

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. Journal of Endodontics, 2014; 40: 1983-1988 (査読有). doi: 10.1016/j.joen.2014.08.012.

Ito T, Kaneko T, Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba K, Okiji T. M2 macrophages participate in the biological tissue healing reaction to mineral trioxide aggregate. Journal of Endodontics 2014; 40: 379-383 (査読有). doi: 10.1016/j.joen.2013.11.011.

[学会発表](計 10 件)

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immune-LCM analysis of M1/M2 macrophages in engineered dental pulp tissues. 18th International Microscopy Congress, Prague Convention Centre, Prague, チェコ共和国, 2014 年 9 月 7-12 日.

金子 友厚、伊藤 崇史、末山 有希子、山中 裕介、吉羽 邦彦、興地 隆史. 再生歯髓組織におけるマクロファージの活性化と成熟-血管内皮細胞混合移植の影響-. 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 13 日.

伊藤 崇史、金子 友厚、山中 裕介、興地 隆史. ラット実験的歯髓炎における幹細胞関連マーカー発現の経時的検索. 日本歯科保存学会 2014 年度春季学会(第 140 回). びわ湖ホール(滋賀県大津市) 2014 年 6 月 20 日.

金子 友厚、山中 裕介、伊藤 崇史、吉羽 邦彦、興地 隆史. 再生歯髓組織内マクロファージにおける M1/M2 関連遺伝子の発現. 日本歯科保存学会 2014 年度春季学会(第 140 回). びわ湖ホール(滋賀県大津市) 2014 年 6 月 20 日.

Takei E, Shigetani Y, Yoshiba K, Hinata G, Yoshiba N, Okiji T: Transient accumulation of M2 macrophages after direct pulp capping with mineral trioxide aggregate in rat molars. The 15th Joint Scientific Meeting between the Japanese Society of Conservative Dentistry and the Korean Academy of Conservative Dentistry,

Gyeongju, Korea, Nov 23, 2013.

Ito T, Kaneko T, Yamanaka Y, Yoshiba K, Shigetani Y, Okiji T: Accumulation of M2 macrophages in mineral trioxide aggregate-implanted tissue. The 15th Joint Scientific Meeting between the Japanese Society of Conservative Dentistry and the Korean Academy of Conservative Dentistry, Gyeongju, Korea, Nov 23, 2013.

金子 友厚, 山中 裕介, 伊藤 崇史, 吉羽 邦彦, 興地 隆史. 再生歯髄組織内におけるマクロファージの活性化と成熟-免疫レーザーキャプチャーマイクロダイゼクション法を用いた検索-. 第57回日本顕微鏡学会, 愛知県産業労働センター(愛知県名古屋市), 2013年11月16日.

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.

Okiji T. Vital pulp therapy: Biological basis, current concepts and future perspectives. The 9th World Endodontic Congress, 東京国際フォーラム(東京都千代田区), May 26, 2013. (招待講演)

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Yoshiba K, Okiji T. The activation/maturation of macrophages in engineered pulp tissue. The 9th World Endodontic Congress, 東京国際フォーラム(東京都千代田区), May 26, 2013.

〔図書〕(計 3 件)

興地 隆史, 金子 友厚, 山中 祐介, 伊藤 崇史, 吉羽 邦彦他. 今だから押さえておきたい世界の歯内療法の潮流. クインテッセンス出版, 2014, 52-56, 64-66, 140-141.

金子 友厚, 興地 隆史. ライフステージと歯内療法. デンタルダイヤモンド社, 2013, 88-91.

Kaneko T, Yamanaka Y, Okiji T. Handbook of macrophages: Life cycle, functions and diseases. Nova Scientific Publishers, 2013, 413-422.

6. 研究組織

(1)研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 80204098

(2)研究分担者

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

吉羽 邦彦 (YOSHIBA, Kunihiko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 30220718

金子 友厚 (KANEKO, Tomoatsu)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号: 70345297

重谷 佳見 (SHIGETANI, Yoshimi)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号: 70345297

大倉 直人 (OHKURA, Naoto)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号: 00547573