

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15699

研究課題名(和文)象牙質/歯髄複合体の修復機構解明のための新規モデルの開発と分化決定因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of determining factors for the reparative process of the dentin/pulp complex using a new experimental model

研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80204098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット臼歯へのGaAlAsレーザー照射は修復象牙質形成を非感染性に誘導するため、その形成機序の追究に有用と面われる。本研究は、同モデルにおけるdentin matrix protein 1 (DMP1), osteopontinの免疫組織化学的局在とmRNA発現を解析し、修復象牙質形成への関与を追究することを目的とした。その結果、修復象牙質形成に先立ちosteopontinとDMP1のmRNA発現が亢進し、続いてこれらの共発現が修復象牙質形成の起点(原生・修復象牙質境界部)で観察された。osteopontinとDMP1の、新生象牙芽細胞様細胞の分化や修復象牙質形成誘導への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：GaAlAs laser irradiation to the rat molar is known to induce reparative dentin formation under noninfectious condition, and seems a useful experimental model for the investigation of the mechanisms of reparative dentinogenesis. Thus, this study aimed to analyze immunolocalization and mRNA expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) and osteopontin in this model, in order to examine the involvement of these proteins in the process of reparative dentinogenesis. Results demonstrated that osteopontin and DMP1 mRNA expression levels were upregulated prior to the formation of reparative dentin, and that colocalization of these molecules was detected at the site at which this tissue first appeared (the border between primary and reparative dentin). These findings suggest that osteopontin and DMP1 are involved in the differentiation of newly-generated odontoblast-like cells and subsequent induction of reparative dentinogenesis.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 歯内治療学 歯髄 修復象牙質 GaAlAsレーザー osteopontin dentin matrix protein 1

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄は外来侵襲に対して、組織幹細胞/前駆細胞の硬組織形成細胞への分化を伴う修復能を備えているが、幹細胞/前駆細胞の局在や分化誘導機構には未解明の部分が多い。とりわけ、修復過程で形成される新生硬組織は明瞭な細管を有する象牙質様のものから骨様のものまで多彩であるが、いかなる機序でその種類が規定されるかについては全く解明されていない。

我々は、直接覆髄、窩洞形成等の条件下で象牙質/歯髄複合体の修復過程における細胞外基質の局在と細胞分化・新生硬組織形成との関連を多面的に解析してきた。その結果、osteopontin, dentin matrix protein 1 (DMP1)の集積<sup>1, 2)</sup>や fibrillin-1の分解<sup>3)</sup>が細胞分化や硬組織形成に関わることを示唆する知見を得ている。さらに組織幹細胞/前駆細胞の解析も試み、歯髄でのMAP1-B, CD146 (組織幹細胞マーカー)共陽性細胞の局在<sup>4)</sup>、nestin (象牙芽細胞分化マーカー)陽性細胞の歯髄修復過程における挙動<sup>1, 2)</sup>等を報告している。

一方、GaAlAs レーザーは象牙質知覚過敏症抑制効果を有する低出力半導体レーザーである。我々は同レーザーに対する歯髄反応の解析過程で、ラット臼歯へのGaAlAs レーザー照射により、修復象牙質、反応象牙質、骨様象牙質の三種に大別される新生硬組織が形成されることを見いだした<sup>5)</sup>。この方法では比較的簡便に硬組織形成過程を観察でき、しかも同レーザーが歯質を蒸散させないため細菌感染の影響を排除可能である。従って、再現性の向上により象牙質/歯髄複合体の修復機序を追究するためのモデルとして有用となると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、以上の背景に基づき、GaAlAs レーザー照射後のラット臼歯での新生硬組織形成過程で、「ある種の分化決定因子の発現挙動の相違が、形成される新生硬組織の種類を規定する」との新規仮説の検証を行うことを究極の目的とする。本報告ではその端緒として、実験モデルとして適切な再現性が得られるためのGaAlAs レーザー照射条件の検討を行うとともに、候補因子探索の第一段階として、硬組織関連非コラーゲンタンパク (dentin matrix protein 1 (DMP1)、osteopontin) や象牙芽細胞分化マーカー (heat-shock protein (HSP) 25) などの免疫組織化学的局在や mRNA 発現レベルを解析し、これらと新生硬組織の形態的特徴との関連を経時的に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) GaAlAs レーザー照射条件の検討

8週齢の雄性Wistarラットの上顎第一臼歯を被験歯とし、全身麻酔下でGaAlAsレーザー (Lightsurge 3000; 長田電気工業、東京) を被験歯近心側より照射出力0.5-1.5 W、照射時間60秒x3回の条件で照射した。非照射の上顎第一臼歯を対照とした。観察期間はレーザー照射後1, 3, 5, 7, 14, 21日とした。試料を経時的に組織学的に解析し、歯髄の反応ならびに反応象牙質、修復象牙質、あるいは骨様象牙質の形成状態を観察した。

### (2) 免疫組織化学的解析

非コラーゲンタンパク (osteopontin, DMP1) および象牙芽細胞分化マーカー (HSP-25, nestin) を解析対象とし、GaAlAs レーザー照射後のこれらの局在変化を特異抗体を用いた酵素抗体法により経時的に解析した。

### (3) 遺伝子発現解析

GaAlAs レーザー照射後、被験歯を抜去して歯冠歯髄より mRNA を抽出後、非コラーゲンタンパク (osteopontin, DMP1, osteonectin, osteocalcin, dentin sialophosphoprotein) の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法により経時的に定量解析した。

## 4. 研究成果

### (1) GaAlAs レーザーの照射条件

上顎第一臼歯にGaAlAs レーザーを照射すると、照射部近傍の歯髄の変性に続いて、出力の増加とともに反応象牙質、修復象牙質、骨様象牙質が形成される傾向があることを認めた。出力1.5W、180秒間照射することで、比較的再現性よく修復象牙質あるいは骨様象牙質の形成を誘導可能であったため、以後の解析はこの条件で行うこととした。

### (2) GaAlAs レーザー照射後の新生硬組織形成と HSP-25 陽性細胞ならびに osteopontin, DMP1 の局在変化

照射1-3日後では象牙芽細胞を含む歯髄細胞の壊死が照射部を中心に拡大し、HSP-25は、壊死層周囲に強陽性反応を示した。

照射5日後では同部に細胞の再分布が観察され、原生象牙質の近傍には少数のHSP-25陽性細胞の配列が観察された。Osteopontin, DMP1 に対する陽性反応は照射野近傍では観察されなかった。

照射7日後にはHSP-25陽性の象牙芽細胞様細胞の配列と少量の修復象牙質の形成が認められた。Osteopontin および DMP1 の免疫陽性反応が原生象牙質と新生硬組織の境界部近傍に認められた。

照射 14 日後では、修復象牙質が歯髄腔内で多量に形成され、その歯髄側には HSP-25 陽性の象牙芽細胞様細胞の明瞭な配列が観察された。21 日後では、これらに加えて骨様象牙質形成が観察された。

免疫組織化学的には osteopontin は主として原生象牙質と新生硬組織の境界部近傍に局在しており、また DMP1 は上記の境界部とともに新生硬組織基質においても陽性反応を示した。

#### (3) GaIAs レーザー照射後の各種非コラーゲンタンパクの mRNA 発現レベルの変動

Osteopontin, DMP1, osteonectin, osteocalcin, dentin sialoprophosphoprotein の mRNA 発現レベルはいずれも照射後上昇し、3 日後にピークを示したのち、その後次第に低下した。14 日後には mRNA 発現レベルは、対照群と同等まで低下した。

#### (4) 考察

本研究では、GaIAs レーザー照射により、概ね良好な再現性のもとで歯髄における修復象牙質形成を誘導することができたことから、osteopontin および DMP1 を解析の対象として、これらのタンパク、mRNA 発現状況と新生硬組織形成状況との関連を解析することが可能であった。

新生象牙芽細胞様細胞の出現に先立ち、歯冠歯髄における各種非コラーゲンタンパク mRNA 発現が上昇したこと、さらには、修復象牙質形成の起点である原生象牙質と修復象牙質との界面に osteopontin と DMP1 がともに局在することが免疫組織化学的には観察されたことから、これらのタンパクの共発現、およびそれに先立ち歯髄で生じる DMP1, OPN mRNA 発現の亢進が、新生象牙芽細胞様細胞の分化過程、もしくはその後の修復象牙質形成の誘導に役割を演じることが示唆された。しかしながら骨様象牙質形成は osteopontin, DMP1 の mRNA レベルが低下してから形成されたため、これらの発現亢進は骨様象牙質形成に必須でないことが示唆された。

#### (5) 結論

ラット臼歯への GaIAs レーザー照射により、歯冠歯髄の変性に続いて修復象牙質形成が誘導された。この際、修復象牙質形成に先立ち osteopontin と DMP1 の mRNA 発現が亢進し、続いて、修復象牙質形成の起点である原生象牙質・修復象牙質境界部で osteopontin と DMP1 の共発現が観察された。以上より、

osteopontin と DMP1 が、新生象牙芽細胞様細胞の分化ならびにその後の修復象牙質形成誘導に役割を演じることが示唆された。

#### <引用文献>

- Kuratate M, Okiji T *et al.* J Endod 34, 970-974, 2008.  
Shigetani Y, Okiji T *et al.* Int Endod J 48, 573-578, 2015.  
Yoshida N, Okiji T *et al.* J Endod 38, 177-184, 2012.  
Kaneko T, Okiji T *et al.* Cell Tissue Res 351, 425-432, 2013.  
Shigetani Y, Okiji T *et al.* J Endod 37, 1086-1091, 2011.

#### 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4件)

- Sugawara S, Shigetani Y, Kenmotsu S, Okiji T, Ohshima H. Evaluation of a new mouse model for studying dental pulpal responses to GaIAs laser irradiation. Journal of Oral Biosciences 2017; 59(1): 38-43 (査読有). DOI: 10.1016/j.job.2016.10.002  
Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Effect of lipopolysaccharide stimulation on stem cell-associated marker-expressing cells. International Endodontic Journal; 印刷中 (査読有). DOI:10.1111/iej.12740.  
Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Kaneko R, Okiji T. Implantation of endothelial cells with mesenchymal stem cells accelerates dental pulp tissue regeneration/healing in pulpotomized rat molars. Journal of Endodontics 2017; 43(6): 943-948 (査読有).  
Shigetani Y, Ohkura N, Yoshida K, Ohshima H, Hosoya A, Yoshida N, Okiji T. GaIAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. Oral Diseases 2016; 22 (5): 399-405 (査読有). DOI: 10.1111/odi.12461.

#### [学会発表](計11件)

- Gu B, Kaneko T, Sueyama Y, Sone PP, Okiji T. Immunohistochemical

characterization of M2 macrophages in a rat experimental model of coronal pulp tissue engineering. The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy. 2016.11.19. 帝京平成大学. 東京都豊島区.

末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. ラット切歯歯髄組織の幹細胞関連因子発現および MAP1B/CD146 発現細胞に対する LPS 刺激の影響. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (第 145 回). 2016.10.27. キッセイ文化ホール, 長野県松本市.

Okiji T. Vital pulp therapy: biological basis and current concepts. The 18th Joint Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry - Japanese Society of Conservative Dentistry. 2016. 10. 23. Seoul, Korea.

興地隆史. 歯髄保存を考えるーバイオロジーと臨床の連携ー. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会. 2016. 7.24. ウィンク愛知, 愛知県名古屋市.

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide induces proliferation and CD146-upregulation of dental pulp stem cell. 94th General Session and Exhibition of the IADR 2016. 6.22. Seoul, Korea.

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide-stimulated dental pulp stem cells show increases of CD146 mRNA expression and cell proliferation. 第 63 回 JADR 学術大会 2015.10.30. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Effects of lipopolysaccharide-stimulation on CD146 and MAP1B mRNA expression in dental pulp stem cells. FDI 2015 Annual World Dental Congress. 2015.9.22. Bangkok, Thailand.

Okiji T. Vital pulp therapy after traumatic tooth injury: biological basis and current concepts. The 7th Congress of Asian International Association of Dental Traumatology. 2015. 7. 11. 北九州国際会議場, 福岡県北九州市.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授