

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04400

研究課題名(和文) 組織マクロファージによる歯髄微小環境調節機構の解明と歯髄組織再生法の開発

研究課題名(英文) Tissue-resident macrophages in dental pulp regulate the microenvironment for reparative dentine formation

研究代表者

中村 浩彰 (Nakamura, Hiroaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50227930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの上顎第一臼歯にMTAセメントにて直接覆髄し、修復象牙質形成過程におけるWnt関連分子とマクロファージ分布について検討した。マイクロCT解析により直接覆髄後14日には修復象牙質形成が確認できた。組織学的解析により修復象牙質の表面に配列した修復象牙芽細胞はWnt3a、Wnt10a陽性反応を示し、その核にはb-catenin局在が認められた。また、歯髄内にはF4/80陽性マクロファージがWnt10aを発現し、その周囲の歯髄細胞の核にはb-catenin局在がみられた。以上のことから、直接覆髄後の修復象牙芽細胞分化には、象牙芽細胞とマクロファージ由来のWntが関与してい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

本研究は、MTAセメントを取り込んだマクロファージがWnt10aを発現することにより、修復象牙芽細胞分化に深く関わっていることを明らかにしたものである。この現象はこれまでに報告されておらず、今後の歯髄保存療法に多くの示唆を与えるものである。また、Wnt/b-カテニンシグナル以外のマクロファージ由来成長因子が明らかになれば、歯髄保存療法への応用でき、歯科医療の発展に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the localization of Wnt-related molecules and F4/80-positive macrophages in the process of reparative dentin formation. After directly pulp-capping with MTA cement in the upper first molars of mice, reparative dentin formation was confirmed 14 days after direct pulp capping by micro-CT analysis. Histological analysis revealed that odontoblasts arrayed on the surface of reparative dentin were positive for Wnt3a and Wnt10a. b-catenin was localized in their nucleus. Additionally, F4/80-positive macrophages in the pulp expressed Wnt10a. The localization of b-catenin was found in the nucleus of pulp cells surrounding macrophages. These results suggest that odontoblast- and macrophage-derived Wnt were involved in the reparative odontoblast differentiation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：修復象牙質 マクロファージ 歯髄組織 Wntシグナル 歯髄再生療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Quality of Life (QOL)の向上には咬合機能を生涯にわたって維持することが不可欠である。歯髄疾患により歯内療法を受けた失活歯は、生活歯にくらべて脆く歯を喪失する原因となることから、歯髄組織は極力保存されることが求められ、歯髄細胞の組織修復力を利用した直接覆髄法として、MTA セメントが広く用いられている。これまでの研究では、水酸化カルシウム製剤よりも封鎖性に優れ、修復象牙質形成能が高いとされている。直接覆髄による修復象牙質形成過程では2つの現象が生じている。第一段階は、MTA セメントによるアルカリ環境が細胞死を惹起し、マクロファージが壊死細胞を処理する過程である。第二段階は、歯髄の組織幹細胞が硬組織形成細胞に分化して Dentin Bridge を形成する過程である。しかしながら、これらの2つの過程は別々にとらえられており、マクロファージと組織幹細胞の関連性は解明されていない。近年の免疫学の進歩により、マクロファージは機能的に M1 と M2 の2種類が存在することが報告され、M1 マクロファージは炎症時に働き、バクテリアやウイルスなどの病原体の排除に関わっている。一方、M2 マクロファージは組織常在型で免疫反応を抑制し、創傷治癒に重要な役割を担っている。歯髄組織には間葉系細胞に加えて樹状細胞やマクロファージが存在するが、その機能は死細胞や異物の処理と考えられており、歯髄領域での M2 マクロファージの概念は、いまだ報告されていない。

2. 研究の目的

歯髄組織には象牙質様硬組織と骨様硬組織を形成する能力をもつ組織幹細胞が存在し、修復象牙質形成において重要な役割を担っている。一方、歯髄組織には組織細胞に加えて樹状細胞やマクロファージなども存在するが、それらの細胞の役割については不明のままである。近年、組織常在型マクロファージがさまざまな生理活性物質を産生して、組織修復治癒において重要であることが報告されている。これらのことから、歯髄組織においても、組織修復に積極的に寄与する組織常在型 M2 様マクロファージが、直接覆髄後の修復象牙質形成過程において生理活性物質を産生して、歯髄幹細胞ニッチに作用し、修復象牙質形成細胞への分化を誘導するという仮説をたてた。本研究は、直接覆髄後の M2 様マクロファージの局在変化を明らかにする、M2 様マクロファージが産生する生理活性物質について解析する、生理活性物質が歯髄の組織幹細胞から修復象牙質細胞への分化を誘導する機構を解明し、新しい歯髄組織治癒・修復法開発への糸口を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 直接覆髄後の修復象牙質形成過程の組織学的解析

マウスの上顎第一臼歯にラウンドバーにて窩洞形成して露髄させ、MTA セメントを用いた直接覆髄を施し、グラスアイオノマーセメントにて窩洞を充填した。術後 1 日、4 日、7 日、14 日、28 日の上顎骨を採取し、以下の形態学的観察に用いた。

マイクロ CT による解析

マイクロ CT にて歯髄内における硬組織形成の有無を確認し、経時的に形態計測を行った。

組織学的解析

上顎骨を 10%EDTA で 4 週間脱灰し、脱水後、パラフィンに包埋した。厚さ 4 μ m を作製し、HE 染色にて組織学的に観察した。

免疫組織化学的解析

マクロファージのマーカーとして F4/80、CD206、骨芽細胞分化マーカーとして Osterix、古典的 Wnt シグナル経路のマーカーとして Wnt3a、Wnt10a、 β -catenin 局在を免疫組織化学的

に検出した。

2) 直接覆髄後の歯髄組織における遺伝子発現

組織学的に直接覆髄後 14 日に多数の Wnt10a 陽性マクロファージがみられたことから、直接覆髄後 14 日の歯髄組織から mRNA を抽出し、real-time PCR 法にて Wnt10a 発現を解析した。

3) クロドロネート投与によるマクロファージ枯渇実験

修復象牙質形成におけるマクロファージの役割を明らかにするため、予備実験としてマウスにクロドロネート リポソームを投与し、歯髄組織におけるマクロファージ分布について解析した。また、クロドロネートが作用しているかについては脾臓を採取して、F4/80 陽性マクロファージを PBS リポソーム投与群と比較した。

4) 歯髄細胞の象牙芽細胞分化についての in vitro 系による解析

マウス切歯から歯髄細胞を採取し、石灰化誘導培地にて培養し、アルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色にて、象牙芽細胞様細胞への分化を確認した。また、培養過程において mRNA を抽出し、DSPP、Wnt3a、Wnt10a 発現を real-time PCR にて解析した。

5) Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスを用いた細胞系譜解析

Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し、投与 0、3、14、28 日後に試料を採取し、非脱灰凍結切片を作製して Tomato 陽性細胞の分布を検索した。また、歯根膜細胞を分離し、骨芽細胞誘導培地、軟骨細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地で分化誘導して Gli2 陽性細胞の多分化能について解析した。

4. 研究成果

1) 直接覆髄後の修復象牙質形成過程の組織学的解析

マイクロ CT による解析

修復象牙質が形成されているかを確認するため、マイクロ CT にて歯髄内における硬組織形成の有無を経時的に観察し、画像解析を行った。直接覆髄後 14 日目には覆髄部直下の近心壁に不透過像がみられ、28 日目では露髄部全体を覆う不透過像が認められ、修復象牙質形成が生じていることが示唆された。また、形態計測による定量結果から 14 日目、28 日目で修復象牙質が増加していることがわかった(図 1)。

組織学的解析

H-E 染色による組織学的観察により、4 日目、7 日目では修復象牙質の形成は認められず、14 日目になると覆髄部直下の近心壁に修復象牙質の形成が認められた。28 日目に至ると露髄部全体を覆うデンティンブリッジが形成されており、マイクロ CT 所見を裏付ける結果が得られた(図 2)。また、デンティンブリッジは既存の象牙芽細胞により形成された reactionary dentin

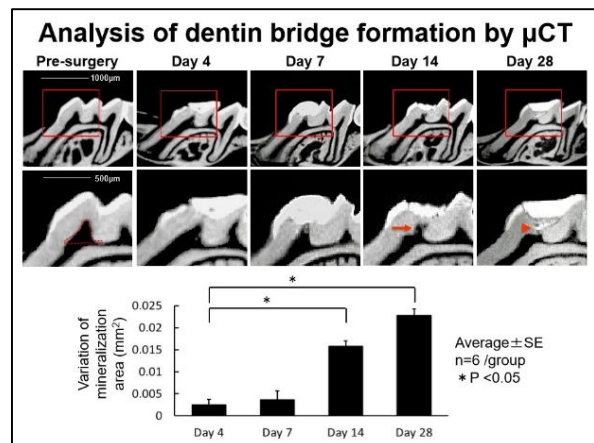


図 1 直接覆髄後のマイクロ CT 解析

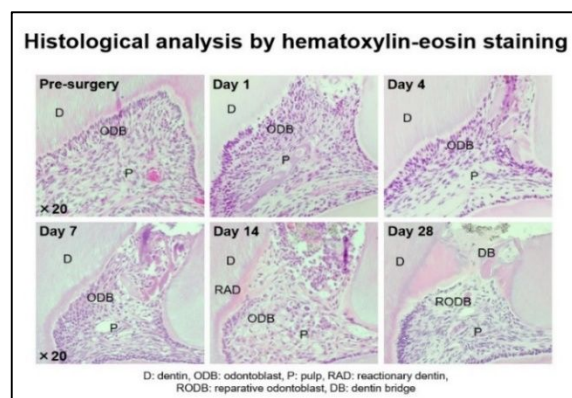


図 2 修復象牙質形成過程の組織像

と reparative dentin から構成され、後者は直接覆髄後に歯髄細胞から分化した修復象牙芽細胞により形成されると考えられた。また、直接覆髄 14 日後の歯髄内には MTA セメントを取り込んだ細胞が多数みられた。

免疫組織化学的解析

正常歯髄においては、Wnt 関連分子の局在はほとんど認められなかった。直接覆髄後 4 および 7 日では、覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞に Wnt3a、Wnt10a の陽性反応が認められ、象牙芽細胞と歯髄細胞の核が β -catenin 陽性反応を示した。これらのことから、直接覆髄後の早期では、象牙芽細胞と歯髄細胞由来の Wnt3a、Wnt10a が象牙芽細胞活性化と修復象牙芽細胞分化に関与していることが示唆された。また、直接覆髄後 28 日目では覆髄部直下のデンティンブリッジの表面に配列した象牙芽細胞と修復象牙芽細胞の核に β -catenin と Osterix 局在が認められた。

デンティンブリッジ形成過程におけるマクロファージの関与を明らかにするために F4/80 陽性マクロファージの分布を検討した。歯髄内には F4/80 陽性マクロファージが存在し、14 日後には MTA セメントを取り込んだ F4/80 陽性マクロファージが多数みられた。また、MTA セメントを取り込んだ細胞の一部は Wnt10a 陽性を示した (図 3)。M2 マクロファージのマーカーである CD206 局在を検討したところ、

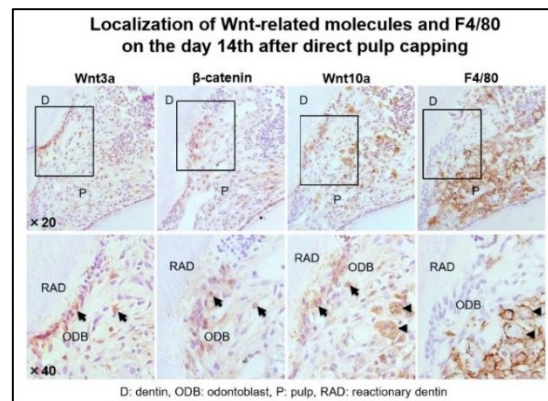


図 3 直接覆髄後の F/80 マクロファージ局在

Wnt10a を発現するマクロファージは CD206 陰性であることから、従来の分類による組織修復型マクロファージとは異なるマクロファージのサブタイプに属するものと考えられた。

F4/80 陽性マクロファージと Wnt10a 陽性マクロファージの歯髄内における数を定量し、F4/80 陽性マクロファージは術前から覆髄後 28 日にかけて歯髄内に多くの数が存在していることがわかった。一方、Wnt10a 陽性マクロファージは、術前には全く認められず、7 日目にわずかに認められ、14 日目にその数が上昇し、28 日目には減少していた。この定量結果から覆髄後 14 日目に Wnt10a と F4/80 を同時に発現しているマクロファージが多く存在していることが示唆された。二重免疫蛍光染色にて確認したところ、14 日目の歯髄には多くの F4/80 陽性細胞と Wnt10a 陽性細胞が認められ、それらが同一の細胞であることが確認された。さらに、14 日目の歯髄細胞にはその核に β -catenin 局在を示す細胞が認められ、これらは F4/80 陽性細胞の近くに存在していたことから、F4/80 陽性マクロファージ由来の Wnt10a が周辺の歯髄細胞に作用し Wnt シグナル伝達系を活性化している可能性が考えられた (図 4)。

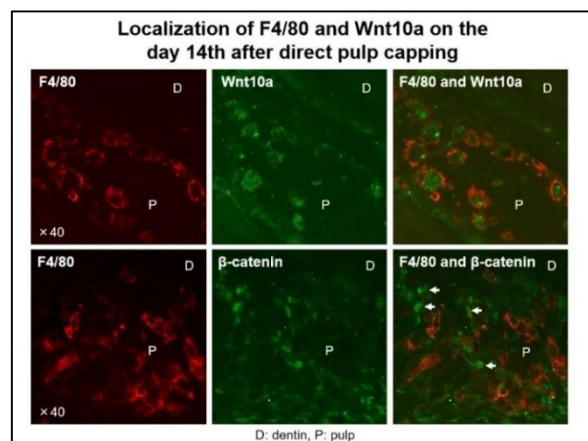


図 4 F4/80 と Wnt10a, β -catenin の二重免疫染色像

以上のことから、直接覆髄後の早期では象牙芽細胞と歯髄細胞由来の Wnt3a、Wnt10a がオートクリンに作用し、象牙芽細胞活性化と修復象牙芽細胞分化に関与していると考えられた。また、直接覆髄後の後期では象牙芽細胞に加えマクロファージ由来の Wnt10a が周辺の歯髄細胞に作用し、修復象牙芽細胞分化に関与していることが示唆された。

2) 直接覆髄後の歯髄組織における遺伝子発現

直接覆髄後14日の歯髄組織から mRNA を回収して Wnt 関連 遺伝子の発現を real-time PCR にて検討し、Wnt10a 発現の上昇傾向がみられた。しかし、mRNA の回収効率が悪く、統計学的に有意差を認めるまでには至っていない。

3) クロドロネート投与によるマクロファージ枯渇実験

修復象牙質形成過程におけるマクロファージの役割をさらに明らかにする目的で、クロドロネート・リポソーム投与によるマクロファージ枯渇モデルの検討を行った。脾臓では PBS・リポソーム投与群と比較し、クロドロネート投与群において F4/80 陽性マクロファージが枯渇していることから、クロドロネート投与の効果を確認できた。しかし、骨組織においてはマクロファージおよび破骨細胞の減少が認められにもかかわらず、歯髄内では F4/80 陽性マクロファージが多数認められた。原因としては、歯髄の血管からリポソームが漏出しにくい可能性、生理的条件下では歯髄マクロファージの貪食能が低いことが考えられる。現時点では、歯髄組織においてマクロファージ枯渇環境を構築することは不可能であり、クロドロネート・リポソームによる実験系は、直接覆髄後の修復象牙質形成過程におけるマクロファージの役割を解析する系には適していないと考えられる。

4) 歯髄細胞の象牙芽細胞分化についての in vitro 系による解析

デンティンブリッジを構成する reactionary dentin 形成には象牙芽細胞由来の Wnt3a と Wnt10a の重要性が示唆されたことから、in vitro 系で歯髄細胞を用いて検討を行った。マウス切歯から歯髄細胞を採取し、石灰化誘導培地にて培養すると7日でアルカリホスファターゼ陽性を示し、アリザリン レッド陽性の石灰化基質が誘導された。この実験系において、象牙芽細胞分化における Wnt リガンドの役割を明らかにするために real-time PCR により解析したところ、DSPP 発現上昇に伴い Wnt3a と Wnt10a 発現を確認し、象牙芽細胞分化における内在性の Wnt リガンドの重要性が示唆された。

5) Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスを用いた細胞系譜解析

Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスを入手し、タモキシフェン投与後の Gli1 発現細胞動態を検索した。歯根膜に多数の Gli1 発現細胞が存在し、その一部は細胞増殖活性を有しており、Osterix 陰性であることがわかった。また、タモキシフェン投与後28日では Gli1 発現細胞由来細胞が、Osterix 陽性の骨芽細胞やセメント芽細胞に分化していることが確認された。さらに、歯根膜組織から Gli1 発現細胞を採取し、in vitro にて解析したところ CFU 形成能が高く、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を有していることが明らかとなった。これらのことから、Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスは歯周組織の再生医療を目指した基礎的研究に有用であると考えられる。

マウスでの直接覆髄の実験系が確立できたことから、直接覆髄後の歯髄細胞から修復象牙芽細胞分化する過程について細胞系譜解析を行う予定であったが、歯髄内での Gli1 陽性細胞が少ないことから、Gli1-Cre-ERT2-Tomato マウスの実験系は中断している。

マウス臼歯を用いた直接覆髄モデルを実体顕微鏡下で行うことにより、その術式を確立し、マイクロ CT と HE 染色による組織学的な検討と Wnt 関連分子の免疫組織学的解析を行った。MTA セメントを取り込んだマクロファージに Wnt10a 局在がみられたことはデンティンブリッジ形成過程において、マクロファージが Wnt10a を発現することにより、修復象牙質形成に深く関わっていることが明らかとなった。この現象についてはこれまで報告がなく、新知見であり今後の歯髄保存療法に多くの示唆を与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Horibe K, Hosoya A, Hiraga T, Nakamura H | 4. 巻 22(7) |
| 2. 論文標題 Expression and localization of CRAMP in rat tooth germ and during reparative dentin formation. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Clin Oral Investig | 6. 最初と最後の頁 2559-2566 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00784-018-2353-x. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida N, Edanami N, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Hosoya A, Noiri Y, Nakamura H, Yoshida K | 4. 巻 51(11) |
| 2. 論文標題 Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Int Endod J | 6. 最初と最後の頁 1187-1195 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/iej.12940 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoshida N, Edanami N, Ohkura N, Maekawa T, Takahashi N, Tohma A, Izumi K, Maeda T, Hosoya A, Nakamura H, Tabeta K, Noiri Y, Yoshida K | 4. 巻 99(3) |
| 2. 論文標題 M2 phenotype macrophages colocalize with Schwann cells in human dental pulp. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Dent Res | 6. 最初と最後の頁 329-338 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1177/0022034519894957 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 原弥革力、堀部寛治、平賀徹、中村浩彰 |
| 2. 発表標題 デンティンブリッジ形成過程における古典的Wntシグナルの役割 |
| 3. 学会等名 歯科基礎医学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 原弥革力、堀部寛治、平賀徹、中村浩彰 |
| 2. 発表標題 修復象牙質形成過程における古典的Wntシグナルの関与 |
| 3. 学会等名 オーラルサイエンス研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 原弥革力、堀部寛治、平賀徹、中村浩彰 |
| 2. 発表標題 古典的Wntシグナルによるデンティンブリッジ形成機構の解析 |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nazmus S、細矢明宏、建部廣明、溝口利英、吉羽永子、吉羽邦彦、中村浩彰、Riasat HM、入江一元 |
| 2. 発表標題 Gli1 陽性歯根膜細胞は幹細胞特性を有し、歯槽骨再生に寄与する |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉羽永子、大倉直人、前川知樹、泉健次、細矢明宏、中村浩彰、前田健康、野杵由一郎、吉羽邦彦 |
| 2. 発表標題 ヒト歯髄においてシュワン細胞はマクロファージをM2型へ転換する |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 二宮 禎 (Ninomiya Tadashi) (00360222) | 日本大学・歯学部・准教授 (32665) | |
| 研究分担者 | 宇田川 信之 (Udagawa Nobuyuki) (70245801) | 松本歯科大学・歯学部・教授 (33602) | |
| 研究分担者 | 細矢 明宏 (Hosoya Akihiro) (70350824) | 北海道医療大学・歯学部・准教授 (30110) | |
| 研究分担者 | 堀部 寛治 (Horibe Kanji) (70733509) | 松本歯科大学・歯学部・助教 (33602) | |
| 研究分担者 | 雪田 聡 (Yukita Akira) (80401214) | 静岡大学・教育学部・准教授 (13801) | |