

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06694

研究課題名(和文) 歯髄myofibroblast様細胞の動態解明と新規歯髄保存療法への展開

研究課題名(英文) Characterization of dental pulp myofibroblasts and new approaches in vital pulp therapy

研究代表者

枝並 直樹 (EDANAMI, NAOKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80804567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： 深在性のう蝕治療における覆髄処置は、歯髄を保存するための最終手段であるが、これまでに修復象牙質形成(歯髄の治癒)を直接的に促進するような、生物学的治療法は開発されていない。本研究では、歯髄治癒過程で一過性に出現する  $\alpha$ -SMA陽性myofibroblast様細胞の誘導が治癒を促進するのではないかと仮説のもと、新規歯髄保存療法の可能性を模索した。

具体的には、歯髄細胞に各種生理活性物質を作用させ、 $\alpha$ -SMAの発現変化を比較した。その結果、TGF- $\beta$ 1が最も効果的に  $\alpha$ -SMAの発現を上昇させた。また  $\alpha$ -SMAを高発現している細胞は、容易に象牙芽細胞様に分化し、高い石灰化能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- $\beta$ 1が歯髄細胞からmyofibroblast様細胞への形質転換を誘導し、さらに象牙芽細胞様細胞への分化を早めたことは、TGF- $\beta$ 1の適応で歯髄治癒を促進できる可能性を示している。今後、適切な担体が開発できれば、現状の無機的な覆髄剤に代わり、新たな生物学的覆髄剤として、迅速な修復象牙質形成を可能とするだろう。また、象牙芽細胞様細胞の、前駆細胞とも言えるmyofibroblast様細胞の特性が明らかになったことは、今後の歯髄生物学の発展に貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)： Vital pulp therapy is an important tool to preserve the dental pulp when dental caries progress deeply. However, there has been no biological treatment that directly promotes reparative dentinogenesis (healing of dental pulp). In our previous study, we found  $\alpha$ -SMA positive myofibroblast-like cells appeared transiently during dental pulp healing. Thus, we speculated that induction of myofibroblast-like cells can promote healing of dental pulp. In this study, we tried to activate the  $\alpha$ -SMA expression of dental pulp cells by the application of various bioactive molecules. As a result, TGF- $\beta$ 1 increased the  $\alpha$ -SMA expression most effectively. Additionally, cells expressing  $\alpha$ -SMA easily differentiated to odontoblast like cells with ability to form calcified nodules.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：象牙芽細胞 歯髄myofibroblast様細胞 TGF- $\beta$ 1

## 1. 研究開始当初の背景

歯を長期間機能させるために歯髄の保存が重要であることは、失活歯の生存率が低いことから明白である (Tang W et al. J Endod. 2010)。象牙質/歯髄複合体が深在性のう蝕や外傷により傷害を受けた際には、覆髄処置により修復象牙質形成を促進し、その構造及び機能を回復させることができる。この過程では、新たに歯髄(幹)細胞が新生象牙芽細胞に分化することが欠かせないが、その分化機序は、現在でも断片的にしか解明されていない。そのため既存の覆髄材料は、その機械的・化学的性質が新生象牙芽細胞の分化に間接的に作用するとどまっており、修復象牙質の形成までに長期間を要する。より短期間に修復象牙質を形成させるには、新生象牙芽細胞の分化機序について、さらなる解明を行い、直接的に分化を促進する生物学的治療法を開発することが必要不可欠である。

近年、歯髄治癒過程で、紡錘形の  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)陽性細胞が一過性に出現し、この細胞が新生象牙芽細胞に分化することが報告された (Yoshida N et al. Histochem Cell Biol. 2012, Vidovic I et al. J Dent Res. 2017)。また申請者は、歯髄治癒過程で出現する紡錘形  $\alpha$ -SMA 陽性細胞が、正常歯髄で  $\alpha$ -SMA 陽性を呈する血管周皮細胞とは異なり、myofibroblast 様の特徴を持つ細胞であることを明らかにした (Edanami N et al. J Endod. 2018)。すなわち、歯髄 myofibroblast 様細胞は、新生象牙芽細胞の前駆細胞であると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記のように、歯髄 myofibroblast 様細胞は、新生象牙芽細胞の前駆細胞であると考えられるため、歯髄(幹)細胞から、歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換を誘導することができれば、新生象牙芽細胞の分化を促進できる可能性が高い。

しかし、これまでに歯髄 myofibroblast 様細胞の動態は、ほとんど明らかにされておらず、形質転換を誘導する方法は確立されていない。我々は、歯髄 myofibroblast 様細胞の形質転換機序の少なくとも一部は、他臓器の myofibroblast と共通しているという推察し、transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), platelet-derived growth factor (PDGF), basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) 等が形質転換誘導因子として働くのではないかと考えた。すなわち本研究では、どの生理活性物質が歯髄 myofibroblast 様細胞の形質転換を効果的に誘導するかを明らかにし、さらに、その生理活性物質が歯髄 myofibroblast 様細胞の形質転換誘導を介して、新生象牙芽細胞の分化や修復象牙質形成を促進するかについて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄細胞を $\alpha$ -SMA 陽性化する因子の解明

歯列矯正等の理由により抜歯された智歯より歯髄を摘出し、初代細胞培養を行った。Passage3~7の細胞を sub-confluent の状態まで培養し、各種成長因子のリコンビナントタンパク質を培地に添加した。一定期間経過した後に RNA を抽出し、リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 7900HT) を用いて  $\alpha$ -SMA-mRNA の発現量を計測、比較した。また成長因子適用後、一定期間経過した細胞に対し、抗  $\alpha$ -SMA 抗体を用いて免疫蛍光細胞染色を行った。

### (2) 歯髄細胞の $\alpha$ -SMA 陽性化が象牙芽細胞分化に及ぼす影響の解明

TGF- $\beta$ 1 を添加した培地、および添加していない培地を用意し、それぞれを用いて歯髄細胞が confluent となるまで培養した。その後、石灰化誘導培地 (デキサメタゾン、グリセロホスフェート、カルシトリオール含有; TGF- $\beta$ 1 非含有) に交換し、21日間培養した。培養終了後、石灰化結節の形成量について、アリザリンレッド染色により評価した。

### (3) 歯髄創傷治癒過程における TGF- $\beta$ 1 産生細胞の特定

ラット上顎第一臼歯を露髄させ、mineral trioxide aggregate (MTA) で覆髄後、コンボジットレジンで窩洞を封鎖した。経時的にラットを灌流固定し、上顎骨ごと処置歯の組織切片を作成した。抗 TGF- $\beta$ 1 抗体と、各種特異抗体を用いて、免疫化学・蛍光染色を行った。

### (4) TGF- $\beta$ 1 の直接覆髄剤への応用

実体顕微鏡視野下において、ラット上顎第一臼歯を露髄させ、TGF- $\beta$ 1 または溶媒を含有させたマトリックスを窩洞に充填し、MTA およびコンボジットレジンで窩洞を封鎖した。マトリックスは、アテロコラーゲンスポンジ (テルプラグ)、アテロコラーゲンゲル (KOKEN, 新田ゼラチン) を用いた。またマイクロインジェクターにより、直接歯髄中に TGF- $\beta$ 1 溶液を注入することも試みた。

#### 4. 研究成果

本研究では、TGF- $\beta$ 1, b-FGF, PDGF を歯髄細胞に作用させた結果、TGF- $\beta$ 1 作用群のみで有意に  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現が上昇した (図 1)。また、抗  $\alpha$ -SMA 抗体を用いた蛍光免疫細胞染色においても、TGF- $\beta$ 1 作用群のみで蛍光強度の上昇が認められた。このため TGF- $\beta$ 1 は、歯髄 myofibroblast 様細胞の誘導に効果的であることがわかった。さらに、TGF- $\beta$ 1 を初期に作用させた後に、石灰化誘導を行った場合、TGF- $\beta$ 1 を作用させなかった場合と比較して、早期に石灰化結節が形成された (図 2)。このことから、歯髄 myofibroblast 様細胞へ形質転換した細胞は、容易に新生象牙芽細胞へ分化することが示唆された。

また我々は、TGF- $\beta$ 1 が歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換に効果的であるとの結果を受けて、ラット臼歯の歯髄創傷治癒過程における TGF- $\beta$ 1 産生細胞の動態を検索した。その結果、TGF- $\beta$ 1 を産生するマクロファージ (CD68, CD163 陽性) の創面への集結が覆髄後 3 日をピークに認められた。これは、歯髄 myofibroblast 様細胞が出現する時期と一致している。このことは、歯髄創傷治癒過程において、マクロファージが産生した TGF- $\beta$ 1 により歯髄 myofibroblast 様細胞が誘導されることを示唆している。現在はセルカルチャー・インサートを用いて、マクロファージと歯髄細胞の共培養を行い、これら細胞の相互作用について、さらなる検証を行っている。

また我々は、実際に TGF- $\beta$ 1 を覆髄処置に適用した場合、歯髄 myofibroblast 様細胞への形質転換と、新生象牙芽細胞の分化を促進するかの検証を目指した。この検証には、TGF- $\beta$ 1 を覆髄材として適用するための実験モデルが必要である。我々は、コラーゲンスポンジやアテロコラーゲンゲルに含有させる方法、マイクロインジェクターにより注入する方法等を検討したが、機械的刺激や異物反応に起因すると思われる炎症反応により、良好な結果は得られなかった。一方で、同実験手法開発過程の副産物として、血餅をスキャホルドとして歯髄の再生を図るパルプ・リバスクラリゼーションのラット実験モデルの開発に成功した。パルプ・リバスクラリゼーションは既に臨床応用可能な再生歯内療法として注目を集めているが、基礎研究は遅れている。同モデルは、再生歯内療法の発展に大きく寄与すると考える。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Yoshiba N, **Edanami N**, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Hosoya A, Noiri Y, Nakamura H, Yoshiba K. Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. Int Endod J 51(11): 1187-1195, 2018. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) **N Edanami**, M Shirakashi, K Yoshiba, Razi Saifullah IB, N Ohkura, N Yoshiba, A Tohma, R Takeuchi, Y Noiri: Development of new rat model for studying regenerative endodontic procedures: International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium 2019 年.
- (2) Razi SIB, **Edanami N**, Yoshiba K, Shirakashi M, Ohkura N, Yoshiba N, Tohma A, Takeuchi R, Hasegawa T, Noiri Y: Evaluation of pH and Calcium ion release in vitro and assessment of biomineralization activities of different calcium silicate sealers after rat subcutaneous implant: International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium 2019 年.
- (3) 白柏 麻里, **枝並 直樹**, 吉羽 邦彦, 大倉 直人, 吉羽 永子, 遠間 愛子, 竹内 亮祐, 野

図 1

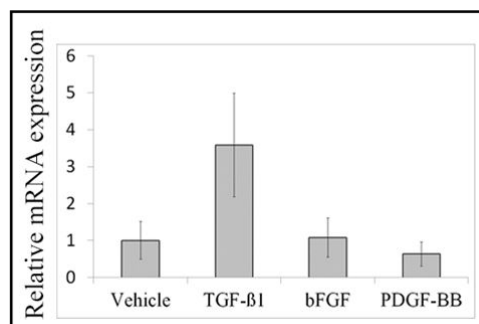


図 2

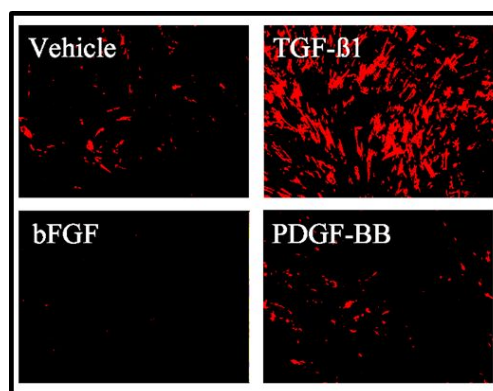
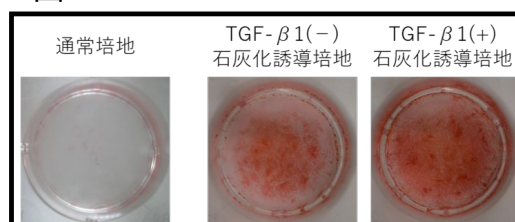


図 3



杵 由一郎：ラットにおけるパルプ・リバスクラリゼーション治療実験モデルの開発：149  
回歯科保存学会学術大会 2018 年。

- (4) 竹内 亮祐, 大倉 直人, 遠間 愛子, 白柏 麻里, **枝並 直樹**, 吉羽 永子, 吉羽 邦彦, 野  
杵 由一郎：創傷治癒モデルラットを用いた Smad ubiquitination regulatory factor  
1(SMURF1)および mammalian target of rapamycin(mTOR)の免疫局在と遺伝子発現解析：149  
回歯科保存学会学術大会 2018 年。
- (5) 遠間 愛子, 大倉 直人, 白柏 麻里, 竹内 亮祐, **枝並 直樹**, 吉羽 永子, 吉羽 邦彦, 野  
杵 由一郎：糖尿病モデルラットを用いた歯髄創傷治癒過程における CD68 および Ki-67 の  
発現解析：149 回歯科保存学会学術大会 2018 年。
- (6) **枝並 直樹**, 吉羽 邦彦, 吉羽 永子, 大倉 直人, 竹内 亮祐, 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：147 回  
歯科保存学会学術大会 2017 年。
- (7) 竹内 亮祐, 大倉 直人, **枝並 直樹**, 遠間 愛子, 吉羽 永子, 吉羽 邦彦, 野杵 由一郎：  
歯髄創傷治癒モデルラットを用いた Glucose Transporter-1 および runt-related  
transcription factor 2 の局在と遺伝子発現解析：147 回歯科保存学会学術大会 2017 年。
- (8) 遠間 愛子, 大倉 直人, **枝並 直樹**, 竹内 亮祐, 吉羽 永子, 吉羽 邦彦, 野杵 由一郎：  
歯髄創傷治癒モデルラットを用いた Glucose Transporter-4 の局在および遺伝子発現の解  
析：147 回歯科保存学会学術大会 2017 年。
- (9) 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, **枝並 直樹**,  
遠間 愛子, 竹内 亮介：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 年。

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。