

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11709

研究課題名（和文）初期の歯髄炎における象牙芽細胞の石灰化と生体防御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of odontoblasts calcification and innate immune response in early pulpitis

研究代表者

武川 大輔 (TAKEGAWA, Daisuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教

研究者番号：10632664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：歯髄の最外層には象牙芽細胞が存在しており、歯髄炎においてこの象牙芽細胞が免疫学的に非常に重要な役割を果たしている可能性が高い。

本研究では、この象牙芽細胞に注目し、石灰化誘導培地を用いた条件下で培養した歯髄細胞を象牙芽細胞様細胞として用いることで、初期の可逆性歯髄炎における象牙芽細胞の自然免疫応答について検討を行い、歯髄炎においてインターフェロンが象牙芽細胞における自然免疫に対して重要な役割を果たしていることを明らかにした。

歯髄炎における象牙芽細胞の役割が明らかにされることで、今後歯髄炎の診断や新たな治療法に対しても応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、可能な限り生活歯髄を保存しようとする機運が高まってきており、歯髄炎発症のメカニズムを解明することが重要な課題となっている。今回の研究で、我々は初期の歯髄炎においてインターフェロンが象牙芽細胞における自然免疫に対して重要な役割を果たしていることを明らかにした。この研究により、歯髄炎の病態解明だけでなく、歯髄炎の診断や新たな歯髄保護材（覆髄材）の開発に対しても一石を投じることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Odontoblasts exist in the outermost layer of the dental pulp, and it is highly possible that these odontoblasts play an important immunological role in pulpitis.

In this study, we investigated the innate immune response of odontoblasts in early reversible pulpitis and revealed that interferon- plays an important role in innate immunity in odontoblasts in early pulpitis.

By clarifying the role of odontoblasts in pulpitis, it is expected to be applied to the diagnosis and new treatment methods for pulpitis in the future.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄炎 象牙芽細胞 自然免疫 インターフェロン

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は、う蝕に继发する疾患であり、その治療には歯髄除去療法(抜髄)を行うことが一般的である。しかし、歯髄を除去した歯牙は根尖性歯周炎や歯根破折のリスクが高まり、歯髄保存療法を行った歯牙に比べて寿命が大きく短縮されてしまう傾向にある。このことから、近年、可能な限り生活歯髄を保存しようとする機運が高まってきており、どのような歯髄の状態なら歯髄保存が可能なのかを正確に知ることは非常に重要な課題である。また、臨床所見に頼らない定量的、定性的な歯髄炎の病態把握が可能になれば、新たな歯髄保存治療の開発にもつながると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、可能な限り生活歯髄を保存しようとする機運が高まってきており、歯髄炎発症のメカニズムを解明することが重要な課題となっている。歯髄の最外層には象牙芽細胞が存在しており、歯髄炎において、この象牙芽細胞が免疫学的に非常に重要な役割を果たしている可能性が高い。

本研究では、歯髄生体防御の最前線に存在する象牙芽細胞に注目し、石灰化誘導培地を用いた条件下で培養した歯髄細胞を象牙芽細胞様細胞として用いることで、初期の可逆性歯髄炎における象牙芽細胞の自然免疫応答について検討を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、象牙芽細胞の石灰化と自然免疫との関連性を調査することを目的としている。まず、ヒト培養歯髄細胞を、石灰化誘導培地を用いた条件下において培養し、象牙芽細胞様細胞へと分化させる。その後、象牙芽細胞様細胞の自然免疫応答に対する IFN- $\gamma$  の影響を検討するため、細胞に対し PRRs リガンドとともに IFN- $\gamma$  を一定時間作用させ、炎症関連メディエーター発現に対する影響を検討する。さらに、象牙芽細胞様細胞における IDO 発現および PRRs リガンド刺激した象牙芽細胞様細胞における IDO 発現の変化と IFN- $\gamma$  の影響について検討を行う。

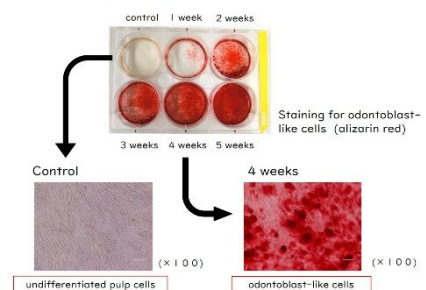
## 4. 研究成果

### (1) 歯髄細胞の培養および細胞の分化

う蝕および歯周炎を有さない健全智歯より歯髄を採取し、歯髄細胞を outgrowth した細胞を歯髄細胞とし、5~10代継代したものを実験に使用した。

この歯髄細胞を  $\beta$  グリセロリン酸およびアスコルビン酸を含有した DMEM にて4週間培養し、アリザリン染色を行うことで石灰化結節を形態学的に観察した。

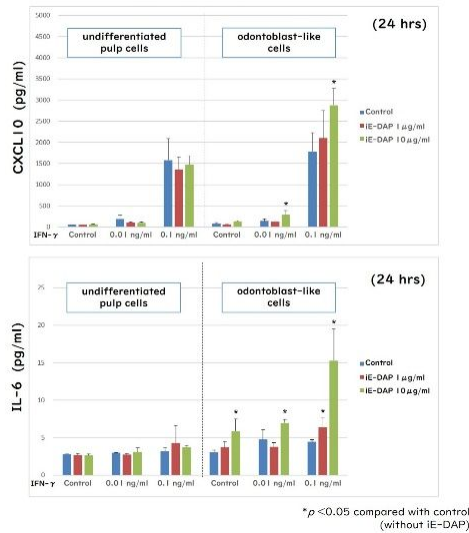
1. Odontoblastic differentiation of pulp cells cultured with  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid



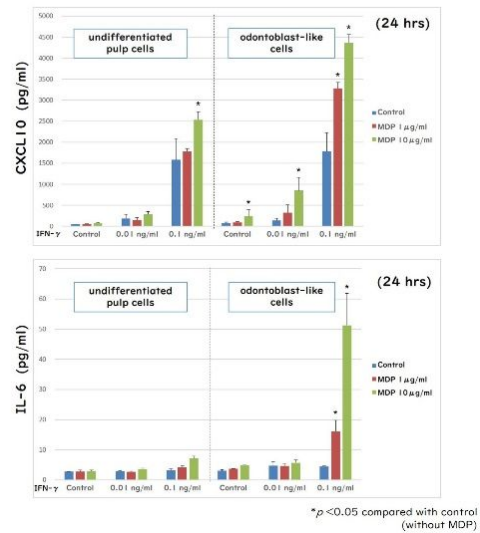
## (2) PRRs リガンド刺激した象牙芽細胞様における IFN- $\gamma$ の影響の解析

$\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP, NOD1 リガンド) または muramyl dipeptide (MDP, NOD2 リガンド) とともに IFN- $\gamma$  にて象牙芽細胞様細胞を一定時間刺激し、培養上清中の IL-6 および CXCL10 濃度を ELISA 法にて測定した。NOD リガンド刺激した象牙芽細胞様細胞に IFN- $\gamma$  を共刺激させることで、IL-6 および CXCL10 の産生は相乗的に増加した。また、その相乗効果は IFN- $\gamma$  濃度依存的に増大した。

1) Co-stimulation with IFN- $\gamma$  and NOD1 ligand



2) Co-stimulation with IFN- $\gamma$  and NOD2 ligand



## (3) 象牙芽細胞様細胞の IDO 発現における IFN- $\gamma$ の影響の解析

象牙芽細胞様細胞に IFN- $\gamma$  を作用させることで、IFN- $\gamma$  と関連の深い因子であるインドールアミン酸素添加酵素 (IDO) の発現が確認された。(今後学会等にて成果発表予定。)

以上の結果より、IFN- $\gamma$  が歯髄生体防御の最前線である象牙芽細胞の自然免疫反応を修飾している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yumoto Hiromichi、Hirao Kouji、Hosokawa Yuki、Kuramoto Hitomi、Takegawa Daisuke、Nakanishi Tadashi、Matsuo Takashi	4. 巻 54
2. 論文標題 The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 105～117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2018.03.001	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 Kuramoto Hitomi、Hirao Kouji、Yumoto Hiromichi、Hosokawa Yuki、Nakanishi Tadashi、Takegawa Daisuke、Washio Ayako、Kitamura Chiaki、Matsuo Takashi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induces VEGF Expression and Production in Rat Odontoblastic Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1～12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/5390720	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔵本瞳、湯本浩通、平尾功治、細川由樹、中西正、武川大輔、松尾敬志
2. 発表標題 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) の象牙芽細胞と骨芽細胞におけるVEGF産生誘導機序の解析
3. 学会等名 歯科保存学会2018年度春季学術大会（148回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔵本瞳、湯本浩通、平尾功治、細川由樹、中西正、武川大輔、松尾敬志
2. 発表標題 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) のラット象牙芽細胞 (KN-3) におけるVEGF産生に与える影響
3. 学会等名 歯科保存学会2017年度春季学術大会(146回)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武川大輔、中西 正、平尾功治、湯本浩通、細川由樹、蔵本瞳、松尾敬志
2. 発表標題 NODリガンド刺激したヒト象牙芽細胞様細胞におけるインターフェロン の影響
3. 学会等名 歯科保存学会2019年度春季学術大会 (150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵本瞳、平尾功治、細川由樹、中西正、武川大輔、湯本浩通、松尾敬志
2. 発表標題 ラット象牙芽細胞 (KN-3) におけるVEGFの石灰化誘導作用
3. 学会等名 歯科保存学会2019年度秋季学術大会 (151回)
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	中西 正  (NAKANISHI Tadashi)  (00217770)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域) ・准教授   (16101)	
研究 分担者	平尾 功治  (HIRAO Kouji)  (00581399)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域) ・助教   (16101)	