

令和元年5月27日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17136

研究課題名(和文) 広範囲の欠損修復を可能とする生体親和性良好な新規直接覆髄剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel pulp capping material which can cover the extensive dentin defect.

研究代表者

吉田 晋一郎 (Yoshida, Shinichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30778866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Sema3Aは歯髄幹細胞において多能性幹細胞に強く発現する因子の発現を上昇した。そこでSema3Aを象牙芽細胞分化誘導初期においてのみ添加した場合でも、Sema3Aは歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進した。これらの結果から、Sema3Aは歯髄幹細胞をより未分化な状態にして分化能を亢進する作用を有することが示唆された。また、Sema3AはSonic hedgehogシグナルのターゲット因子であるGli1の発現を上昇し、さらに、Sema3Aを直接覆髄材として応用した場合に露髄面直下歯髄組織においてGli1陽性細胞数が増加することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sema3Aを新規直接覆髄材として応用するために、修復象牙質形成を行う歯髄幹細胞に対して及ぼす影響について検討した。その結果、Sema3Aは歯髄幹細胞の未分化性を亢進し、分化能を亢進する可能性が示唆された。そのメカニズムの一端を担うものとして、 $\beta$ -catenin依存的経路に加えてSonic hedgehogシグナルの関与を新たに提唱した。歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化および修復象牙質形成の詳細な細胞内シグナル経路は明らかとなっていないため、その解明に大きく寄与するとともに、今後解析を進めていくことで生物学的意義のある情報を提供しうるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Sema3A upregulated the expression of stem cell markers in dental pulp stem cells (DPSCs), and DPSCs treated with Sema3A only at the initiation of culture stimulated odontogenesis. These results suggested that Sema3A might possess the function to increase the multipotency of DPSCs. In addition, Sema3A upregulated the expression of Gli1, a specific transcriptional factor of sonic hedgehog signal, in DPSCs. Furthermore, after direct pulp capping using Sema3A, the number of Gli1-positive cells was upregulated in dental pulp tissue.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄幹細胞 象牙芽細胞 修復象牙質 Semaphorin 3A

## 1. 研究開始当初の背景

う蝕や外傷、また歯科治療における修復処置や補綴処置を行う際に、偶発的に露出した歯髄組織を保存することは、歯牙を長期維持していくうえで重要な課題である。現状では、直接覆髄剤を露髄面に作用させることで修復象牙質形成を促し、露髄面を封鎖させる直接覆髄法が確立されている。最も頻用されている水酸化カルシウム製剤は、その強アルカリ作用により露髄面直下の歯髄組織を変性壊死させ、その治癒機転で多孔性の骨様象牙質の形成を促している。しかしながら、形成される修復象牙質は易分解性であり(Prosser et al., J Dent Res, 1982)、また露髄面の不完全な封鎖により口腔内細菌の侵入を許してしまうことが報告されており (Cox et al., Oper Dent, 1996)、その臨床成績は良好とはいえず、抜髄に至る症例も少なくない。2007年に直接覆髄剤として薬事認可された MTA セメントは、水酸化カルシウム製剤よりも良好な臨床成績が報告されているが (Farsi et al., J Clin Pediatr Dent, 2006; Bogen et al., J Am Dent Assoc, 2008)、水酸化カルシウム製剤と同様に歯髄組織に壊死層を生じるため、後に細菌感染が生じた場合の温床となり安定した予後を得ることは困難である。また MTA セメントの操作性は悪く、局所における混水比のわずかな違いが不十分な水和物形成を招き漏洩の原因となるといわれている (小林千尋 著: MTA の臨床, 医歯薬出版株式会社, 2013)。

このため、良質で十分量の修復象牙質形成を促すことができ、壊死層を形成しない操作性の良好な新規の直接覆髄剤の開発が期待されている。

一方、炎症刺激により象牙芽細胞が損傷を受けた場合には、歯髄組織に内在する歯髄幹細胞が象牙芽細胞へと分化し、修復象牙質形成が行われることが報告されている (Gronthos et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2000)。したがって、歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進し、効果的に修復象牙質形成を促すことができる因子を覆髄剤として用いることによって、これまでの覆髄剤にない理想的な治癒を導く治療薬を開発することができると考えている。

近年、修復象牙質形成には  $\beta$ -catenin 依存的経路が関与していることが報告されている (Hunter et al., J Bone Miner Res, 2015)。一方、Sema3A は、発生過程における中枢神経系の軸索ガイダンス因子として同定され (Wright et al., J Comp Neurol, 1995)、血管や末梢神経の構築に関与するほか、 $\beta$ -catenin 依存的経路を介して骨代謝を制御することが報告されている (Hayashi et al., Nature, 2012)。最近、申請者は、Sema3A が歯根膜幹細胞の骨芽細胞様分化を促進する働きを有することを明らかにしている (Wada et al., Stem Cells Dev, 2014)。そこで、Sema3A の修復象牙質形成能について検討を進めた結果、Sema3A は  $\beta$ -catenin 依存的経路を介してヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進し、さらにラットを用いた点状露髄部位に直接覆髄剤として Sema3A を応用した場合に、露髄面下に象牙細管構造を伴う修復象牙質形成を促すことに成功した (Yoshida et al., J Dent Res, 2016)。以上の結果から、Sema3A が本研究で開発を目指す新規直接覆髄剤としての有用な候補因子となりうると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、Sema3A による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化の細胞内シグナル経路の解析を進め、これまで抜髄の適応となっていた広範囲露髄部位の組織修復を可能とする新規直接覆髄材の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄幹細胞は、ヒト歯髄細胞から single colony selection により単離したクローンのうち、多分化能を有し (骨芽細胞分化能、脂肪細胞分化能、軟骨細胞分化能) 間葉系幹細胞の表面抗原マーカー (CD73, CD90, CD105, CD146, CD166) を発現する細胞をヒト歯髄幹細胞として本実験に使用した。

(2) 遺伝子発現は、Total RNA から逆転写反応により合成した First-strand cDNA を、Thermal cycler Dice Real Time System を用いて解析した。内部標準遺伝子として human beta-actin ( $\beta$ -actin) を用いて目的遺伝子の発現量解析を行った。

(3) 2 mM  $\beta$ -glycerophosphate、50  $\mu$ g/ml ascorbic acid、0.1 M dexamethasone を 10% FBS/ $\alpha$ -MEM に添加した培地を象牙芽細胞分化誘導培地として使用した。ヒト歯髄幹細胞を象牙芽細胞分化誘導培地にて 4 週間培養し、Alizarin Red S 染色によって形成された石灰化基質を測定した。また、象牙芽細胞関連因子の遺伝子発現について、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。培養期間のうち、最初の 2 週間のみ Sema3A リコンビナントタンパク (0, 10, 50, 100 ng/ml) を添加した群を Sema3A 群とした。

(4) ラット下顎切歯組織切片を用いて、Sema3A および Gli1 の発現を検討した。免疫蛍光染色は、非特異的に反応するタンパクを 2% BSA で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体としてヤギ抗 Sema3A 抗体あるいはウサギ抗 Gli1 抗体を用い、二次抗体として Alexa Fluor® 647 標識抗ヤギ抗体あるいは Alexa Fluor® 488 標識抗ウサギ抗体を用いた。核染色は、DAPI を用いて行った。尚、陰性コントロールには一次抗体として、ヤギのコントロール IgG (cIgG) またはウサギの cIgG を用いた。画像解析には BZ9000 fluorescence microscope を使用した。

(5) 8 週齢の雌性 Wister ラットに三種混合麻酔薬を用いた腹腔内麻酔をした後、#1/2 ラウンドバーを用いて左側上顎第一臼歯咬合面の近心側に半月状の窩洞形成を行い、探針にて歯髄組織を露髄させた。ナノ粒子の beta-tricalcium phosphate を配合したコーラゲンスキャフォールド (Nano  $\beta$ -TCP collagen scaffold; Ibara et al., J Nanomater, 2013) を担体として用い、Sema3A (200 ng)

を浸透させたスキャフォールドで露髄面を封鎖し、ガラスアイオノマーセメントで仮封した。1, 2, 3, 5 および 7 日間飼育後、固定脱灰し、組織切片を作製した。露髄面直下歯髄組織における Gli1 の発現は、一次抗体としてウサギ抗 Gli1 抗体を、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体を使用し、DAB 試薬によって検出しその発現を解析した。

(6) 広範囲露髄モデルは、8 週齢の雌性 Wister ラットに三種混合麻酔薬を用いた腹腔内麻酔をした後、#1/2 ラウンドバーを用いて左側上顎第一臼歯咬合面を切削し天蓋を除去し、Sema3A を Nano  $\beta$ -TCP collagen scaffold を担体として露髄面に作用させ、4 週間飼育後、固定脱灰し、組織切片を作製した。修復象牙質形成を H-E 染色により検討し、核染色はヘマトキシリンを用いて行った。

#### 4. 研究成果

申請者はこれまでに Sema3A がヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進すること(Yoshida et al., J Dent Res, 2016)に加えて、Sema3A がヒト歯根膜細胞の未分化性を亢進することを報告している(Wada et al., Stem Cells Dev, 2014)。そこでヒト歯髄幹細胞を Sema3A で刺激した結果、Sema3A はヒト歯髄幹細胞において *Sox2*, *Nanog*, *E-cadherin* ならびに *Oct3/4* といった多能性幹細胞関連因子の遺伝子発現を上昇することが明らかとなった。次に、Sema3A を歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化誘導培地中に添加し、象牙芽細胞分化に及ぼす影響について検討した。その結果、Sema3A を分化誘導初期の 2 週間においてのみ添加した場合、Sema3A は歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進した。これらの結果から、Sema3A は歯髄幹細胞をより未分化な状態にして分化能を亢進させ、歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進することが示唆された。

次に、象牙芽細胞分化過程が観察可能なラット切歯の組織切片を用いて Sema3A の発現を検討した。その結果、根尖部の歯原性間葉細胞および前象牙芽細胞層に Sema3A の強い陽性反応を認めた。また、これまでに象牙芽細胞分化には Sonic hedgehog (Shh)シグナルが関与していることが報告されている(Zhao et al., Cell Stem Cell, 2014)。そこで、Sema3A がヒト歯髄幹細胞における、Shh シグナルのターゲット因子である Gli1 の発現に及ぼす影響について検討した結果、Sema3A はヒト歯髄幹細胞における Gli1 の発現を有意に上昇することが明らかとなった。更に、Gli1 のラット切歯における発現を検討した結果、Gli1 も Sema3A と同様に、歯原性間葉細胞および前象牙芽細胞層に強い陽性反応を示し、Sema3A との共発現が認められた。加えて、Sema3A を直接覆髄材として応用した場合に、露髄面直下における Gli1 の発現が経時的に上昇することが明らかとなった。これらの結果から、Sema3A は  $\beta$ -catenin 依存的経路(Yoshida et al., J Dent Res, 2016)と Shh シグナルを介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進することが示唆された。両シグナル経路のクロストークについては今後検討していく予定である。

既存の直接覆髄処置の適用を越えて広範囲に露髄させた動物モデルを用いて、Sema3A の修復象牙質形成能について検討した。その結果、コントロール群では、硬組織形成による露髄面の被蓋は認められず、露髄面直下の歯髄組織に多数の炎症性細胞浸潤を認めた。一方、Sema3A 群では、硬組織形成による露髄面の完全な封鎖は認められなかったものの、一部で新生硬組織による被蓋を認めた。また、露髄面直下の歯髄組織において認められる炎症性細胞浸潤は、コントロール群と比較して減少していた。今後、Sema3A の濃度に加えて、飼育期間の延長を行い、検討を重ねていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

「Semaphorin 3A による修復象牙質形成過程における Sonic hedgehog シグナルの関与」第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2018。

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（**8**桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：前田 英史、長谷川 大学、糸山 知宏、和田 尚久

ローマ字氏名：(Hidefumi Maeda, Daigaku Hasegawa, Tomohiro Itoyama, Naohisa Wada)

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。