

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09588

研究課題名(和文) 歯髄治癒過程におけるマクロファージ・歯髄幹細胞・再生神経のクロストークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of crosstalk between macrophage and regenerative nerve in the process of dental pulp healing

研究代表者

武藤 徳子 (Muto, Noriko)

神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40510433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯の損傷後の歯髄修復過程におけるマクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の分化能促進への影響とM1M2マクロファージの動態、神経再生の過程を明らかにすることを目的とした。MTA覆髄時の感染歯髄は、水酸化カルシウム製剤群、対照群と比較し、消炎傾向および硬組織形成傾向が認められた。MTA群は抗PGP9.5抗体による免疫染色において術後1週間後は、歯根全体に陽性所見が認められるが、術後2週間後は髄床底部付近に陽性所見が認められた。MTA群においては歯髄の治癒が認められ、さらに神経線維の局在と、歯髄組織の治癒過程が同部位に関連して認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代は、急速な超高齢化の進行により全身疾患を伴う患者が多くなっているが、歯科医療に求める質の向上や歯科医療機関の増加などの要因により高頻度治療における重要性は多様性を呈している。有病者に対する歯科治療の在り方について、疼痛に起因する発作的全身の偶発事例を防ぐため、歯髄保存治療を推奨しており、現在歯髄覆髄剤として保険算定可能なMineral Trioxide Aggregate (MTA)を用いた治療の感染歯髄に対する根拠を示すことで、治療可能な範囲を広げ、結果的に超高齢化社会における多様化した歯科疾患に対する貢献が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of macrophage activation in the process of dental pulp repair after tooth damage, promotion of differentiation potential of dental pulp stem cells / progenitor cells, dynamics of M1M2 macrophages, and the process of nerve regeneration. The infected dental pulp during MTA pulp capping showed an anti-inflammatory tendency and a hard tissue formation tendency as compared with the calcium hydroxide preparation group and the control group. In the MTA group, immunostaining with anti-PGP9.5 antibody showed positive findings in the entire tooth root 1 week after the operation, but positive findings near the base of the medullary bed 2 weeks after the operation. In the MTA group, healing of the pulp was observed, and localization of nerve fibers and healing process of pulp tissue were observed in relation to the same site.

研究分野：歯内療法

キーワード：歯髄

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の損傷後の歯髄修復過程では、神経の再生が歯髄修復過程に重要な役割を担っていると考えられている。そして歯の損傷後に、迅速に神経を再生させることは、歯髄の治癒を促進すると考えられる。活性化マクロファージには炎症性 M1 と抗炎症性 M2 という 2 つの表現型が存在する。M1 は炎症に関与し、炎症促進性サイトカイン・酸化窒素(NO)を放出することによって組織破壊を促進する。M2 は細胞破片を捕捉・抗炎症性サイトカインを分泌することにより炎症反応を緩和し、線維瘢痕の形成を抑制する。一般的な創傷治癒では、M1 と M2 がそれぞれ炎症の惹起と消退に関わると報告されている。歯髄幹細胞由来無血清培養上清が炎症性 M1 マクロファージから抗炎症性 M2 マクロファージへ変換させるシグナル分子 (sSiglec-9/MCP-1) を含んでおり、抗炎症性 M2 環境を誘導することで、炎症を抑制し、末梢神経の神経再生能力を促進したことが示された。(Stem Cells. Mar;35(3):641-653. 2017) これは、ヒト歯髄幹細胞を用いた研究 (J Endod. Apr;43(4):596-601. 2017) においても M2 マクロファージの培養上清が HPDCs に対し、象牙質、骨形成に影響があることが示されている。In vivo でのラット大白歯の MTA を用いた直接覆髄の研究(J Endod. Dec;40(12):1983-8. 2014.)では、M2 マクロファージ関連分子発現細胞が後に MTA 直下に初期に一時的に集積することが確認されている。さらに、M1 マクロファージを M2 マクロファージ主導に変換するシグナルとして、Histone3 Lys27 の脱メチル化酵素である Jmjd3-Irf4 が M2 マクロファージへの必須シグナルであることが明らかになっている。(Nat Immunol. Oct;11(10):936-44. 2010)。歯髄幹細胞由来無血清培養上清が M1 マクロファージから M2 マクロファージへ変換させるシグナル分子 (sSiglec-9 と MCP-1) を含んでおり、神経再生を促進することが明らかになっている (Stem Cells 35: 641-653, 2017)。マクロファージの極性を調節することで、末梢神経損傷に対しても治療効果が期待できると考えられることから、これを局所的効率的に行うことで、末梢神経の再生能力を促進し、結果、歯髄炎の回復及び歯髄界面の硬組織形成を効率的に誘導することが可能になると推測されたため、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

細胞外シグナル(組織微小環境)にตอบสนองしてマクロファージが機能や形態を可逆的に変化させることを極性化と呼び、組織の恒常性維持や炎症・免疫反応に寄与することが知られている。マクロファージには M1 (炎症性) と M2 (抗炎症性) の二つの表現型(極性)があり、創傷治癒過程において、それぞれが炎症の惹起と消退に関わる。申請者らの研究グループは、歯の損傷後の歯髄修復過程において、マクロファージによる変性細胞の除去に引き続き、歯髄幹細胞/前駆細胞の増殖と神経線維の密度の増加が起こることを明らかにした。このことは、マクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の増殖、再生神経線維間のクロストークが歯髄修復過程に重要な役割を担っていることを示唆している。本研究は、これら細胞間のクロストークを解明することを目的とし、マクロファージの極性を局所的に調節することにより歯髄炎の回復及び歯髄界面の硬組織形成を効率的に誘導する方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験的歯の損傷モデルとして、8 週齢ラット (Wistar) 及び 6 週齢 ICR 系マウスの臼歯近心隣接面にグループ状に窩洞を形成し、経時的 (1 日~2 週) に動物を固定し、通常通りパラフィン切片を作製し、Ki67 免疫染色にて術後歯髄治癒過程における細胞増殖活性を、さらに神経線維、M1・M2 マクロファージの動態は、PGP9.5、ED1、ED2、OX6 抗体を用いて、免疫組織化学的に解析した。

(2) 感染および非感染歯髄における各実験群 (GI 群、MTA 群、CH 群) の術後治癒過程における歯髄-象牙質境界部における nestin 陽性細胞出現比率、および歯髄内の細胞増殖所見を術後 1 週、2 週の歯冠歯髄および歯根歯髄の Ki67 陽性細胞数出現比率の定量分析評価を行った。

4. 研究成果

(1) 水酸化カルシウム製剤群、対照群は、歯髄の炎症は持続傾向であったが、MTA 覆髄時の感染歯髄は消炎傾向を示し、さらに硬組織形成傾向が認められた。MTA 群は PGP9.5 は術後 1 週間後は、歯根全体に陽性所見が認められるが、術後 2 週間後は髄床底部付近に陽性所見が認められた。水酸化カルシウム製剤群は、術後 2 週後に ED1,2 が強く染色され、PGP9.5 の陽性所見は根尖付近にわずかに認められた。対照群は、歯冠部に ED1 の陽性所見が強く、PGP9.5 は根尖部から歯根中央部にかけて陽性所見が認められたが、術後 2 週間後では、ED1 の陽性所見が歯根の歯冠側から歯根中央部にかけて陽性所見が認められ、PGP9.5 は歯冠側に限局されていた。MTA 群においては歯髄の治癒が認められ、水酸化カルシウム製剤群、対照群では歯髄治癒遅延傾向が認められた。可逆性の炎症性環境は浸出液が多く、pH の変化を誘導することで、炎症改善と硬組織形成の促進の両方が期待出来ると考えられる。再生神経の発生と歯髄治癒には相関が認められた。

(2)感染歯冠歯髄における nestin 陽性領域の割合は、2 週目以降の歯髄治癒は、GI 群では MTA 群に比べて有意に悪化していた。非感染歯冠歯髄における nestin 陽性領域の割合は、1 週目以降、MTA 群の方が CH 群および GI 群よりも有意に高かった。

Ki67 陽性細胞増殖所見は、感染歯冠歯髄と歯根歯髄において 1,2 週とも MTA 群が CH 群、GI 群よりも有意に高く、非感染歯髄における歯冠歯髄は、2 週目には MTA 群の方が CH 群よりも有意に高く、歯根歯髄は、1 週目、2 週目ともに MTA 群が CH 群よりも高かった。nestin および Ki67 陽性細胞の発現状況は、歯髄治癒過程の経時変化における組織学的所見と相関していた。nestin 陽性反応は象牙芽細胞分化の指標であり、nestin 陽性所見を示した象牙芽細胞様細胞は、術後 2 週間後の MTA 群では髄床底から根尖まで象牙質面に配列していたが、CH 群では象牙芽細胞様細胞分化は認められなかった。一方、Ki67 免疫組織化学所見では、感染歯髄 MTA 群、非感染歯髄 MTA 群ともに、1 週間後よりも、2 週間後の細胞増殖が GI 群よりも顕微に示された。したがって、MTA 群では、1 週目に活発な細胞増殖が始まり、2 週目には象牙芽細胞様細胞の分化が起こるのに対し、CH 群では、1 週目以降の歯髄内で活発な細胞増殖は認められるが、象牙芽細胞様細胞の分化は起きなかった。感染歯髄に対して MTA を使用した直接覆髄は有効であり、覆髄剤を使用しない GI のみ仮封や水酸化カルシウムによる直接覆髄よりも早期に歯髄治癒を促進することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武藤徳子, 許多, 石井信之
2. 発表標題 歯髄治癒過程におけるマクロファージ・再生神経のクロストークの解明.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriko Mutoh, Nobuyuki Tani-Ishii.
2. 発表標題 Elucidation of crosstalk between macrophage and regenerative nerve in the process of dental pulp healing.
3. 学会等名 日本免疫学会学術大会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤徳子、許多、石井信之
2. 発表標題 感染歯髄へのMTA直接覆髄後の象牙質様硬組織形成機構の解明
3. 学会等名 第39回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武藤徳子
2. 発表標題 感染歯髄組織に対するMTA直接覆髄処置後のデンティンブリッジ形成機序の解明
3. 学会等名 第53回神奈川歯科大学学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikomutoh
2. 発表標題 Innate immune response in dental pulp induce the dentin regeneration
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018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	石井 信之 (Tani-Ishii Nobuyuki) (20163610)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授 (32703)	
研究分担者	大島 勇人 (Ohshima Hayato) (70251824)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------