

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09976

研究課題名（和文）BDNFによる歯髄細胞とマクロファージの細胞連携を基盤とした歯髄保存療法の開発

研究課題名（英文）Development of pulp-preservation therapy based on cellular cooperation between pulp cells and macrophages by BDNF

研究代表者

武田 克浩（Takeda, Katsuhiko）

広島大学・病院（歯）・講師

研究者番号：10452591

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳由来神経栄養因子（BDNF）はマクロファージの貪食能を亢進させることで創傷治癒の初期に起炎物質の排除を促進し、さらに過度の炎症性サイトカイン発現を抑制することで歯髄炎を鎮静化し、修復象牙質形成促進に寄与する可能性が伺えた。また、その炎症制御・修復象牙質形成には歯髄細胞-マクロファージの細胞連携が関与していることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、露出した歯髄に対し、水酸化カルシウム製剤を用いて修復象牙質を誘導させる覆髄処置が一般的に行われているが、選択毒性が低く歯髄組織そのものを傷害する問題点が指摘されている。歯髄・象牙質複合体の再生に関連する研究では、より効果的な水酸化カルシウム製剤の検討が主流であり、細胞機能制御による歯髄象牙質複合体の再生に関する研究は黎明期にある。本研究は歯髄における炎症制御と修復象牙質形成の誘導を両立する分子としてBDNFに着目する唯一の研究である。本研究結果から、BDNFが歯髄細胞-マクロファージの細胞連携の制御因子である可能性が示され、より効率的かつ生体安全性の高い新規歯髄覆髄材の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate whether brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates inflammation and also regulates pulp cell-macrophage cell cooperation to promote reparative dentin formation. This study suggested that BDNF may promote the elimination of inflammatory substances in the early phase of wound healing by enhancing the phagocytosis of macrophages, and may also calm pulpitis and promote reparative dentin formation by suppressing the excessive expression of proinflammatory cytokines. The results also suggest that pulp cell-macrophage cell cooperation is involved in the regulation of inflammation and reparative dentin formation.

研究分野：歯内療法学、歯周病学

キーワード：脳由来神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は、細菌感染による生物学的要因、外傷・歯ぎしりなどの物理的要因、歯科材料による化学的要因などによって生じる歯髄の炎症である。細菌感染においては、歯髄細胞やマクロファージ、好中球、リンパ球などの免疫担当細胞が炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインを産生し、I型コラーゲンなどの細胞外基質の分解が亢進する。したがって、歯髄の保存のためには、過剰な炎症を速やかに鎮静化し、歯髄細胞の増殖や分化を誘導し、修復象牙質形成を促進することは非常に有用であると考えられる。現在、露出した歯髄に対し、水酸化カルシウム製剤を用いて修復象牙質を誘導させる覆髄処置が一般的に行われているが、選択毒性が低く歯髄組織そのものを傷害する問題点が指摘されている。歯髄・象牙質複合体の再生に関連する研究では、より効果的な水酸化カルシウム製剤の検討が主流であり、積極的な細胞機能制御による歯髄象牙質複合体の再生に関する研究は黎明期にある。

2. 研究の目的

本研究では、BDNFを用いた歯髄・象牙質複合体再生療法の基礎研究として、歯髄細胞-マクロファージの細胞連携という観点から、BDNFの炎症制御能、修復象牙質形成誘導能を解析することとした。マクロファージは周囲の細胞と相互作用しながら恒常性の維持を担うことから、マクロファージ-歯髄細胞の細胞連携の破綻による過剰な炎症応答が歯髄炎の病態の一因となり、この相互作用を制御することが歯髄再生と修復象牙質形成の双方に有用であると仮説を立てた。本研究は、研究課題の核心をなす学術的な「問い」として「BDNFが炎症を制御するとともに、歯髄細胞-マクロファージの細胞連携を制御し修復象牙質形成を促進するか？」を設定し、この課題に取り組む。歯髄細胞-マクロファージの細胞連携が炎症制御だけでなく、歯髄細胞を介した修復象牙質形成促進に関与することが明らかになれば、今後の歯内療法の研究に大きな波及効果をもたらすと期待され、より効率的かつ生体安全性の高い新規歯髄覆髄材の開発につながる。

3. 研究の方法

(1) BDNFのマクロファージにおける炎症制御能の検討

マクロファージに刺激因子としてペプチドグリカン(PGN)を作用させ炎症性サイトカイン発現を誘導する。BDNF(50 ng/ml)を同時に作用することで、炎症性サイトカイン発現が抑制されるか検討する。

マクロファージ様細胞の獲得

RIKEN(埼玉)から購入したヒト単球系細胞株(THP-1)を、RPMI1640(Sigma-Aldrich、Steinheim, Germany)に10% fetal bovine serum(FBS)(Thermo Fisher Scientific) 100 Units/mL penicillin(Sigma-Aldrich) 100 µg/mL streptomycin(Sigma-Aldrich)を添加した培地(培地A)で1日培養した。その後、培地Aに100 nMのphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を添加した培地で1日培養し、マクロファージ様細胞に分化させた。

マクロファージ様細胞の炎症性サイトカイン発現に及ぼすBDNFの影響

マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 を RPMI1640 で 3 回洗浄した後、FBS を含まない培地 A (培地 B) に変更し、BDNF (R&D Systems) (最終濃度 50 ng/mL) を 0~24 時間作用させた。培養終了後、PBS で洗浄し、RNA iso plus (タカラバイオ、滋賀) で total RNA を抽出した。RNA 濃度は吸光度 (260 nm、280 nm) を測定し算出した。ReverTra Ace[®] (東洋紡、大阪) を用いて、精製した total RNA 1.0 µg を逆転写した。得られた cDNA をテンプレートとして、PowerUp[™] SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems、Foster City、CA) と StepOnePlus[™] (Applied Biosystems) を用いてリアルタイムでモニタリングし、炎症性サイトカインである TNF α と IL-1 β の mRNA 発現を定量的に解析した。

PGN で誘導されるマクロファージ様細胞の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

マクロファージ様細胞に分化させた THP-1 を RPMI1640 で 3 回洗浄した後、FBS を含まない培地 A (培地 B) に変更し、PGN (最終濃度 1 µg/mL) を添加後 3 時間培養した。PGN 添加 1 時間後に BDNF (最終濃度 50 ng/mL) を添加した群と非添加群で炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR で比較検討した。

(2) BDNF のマクロファージ貪食能に及ぼす影響

細胞はマウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 を RIKEN (埼玉) から購入して使用した。RAW264.7 を BioCoat[™] Collagen-I Coated Culture Slide (Corning) でおよそ 60% コンフルエントになるまで培地 A で培養した。DMEM で 3 回洗浄した後、培地 B に変更し、BDNF (R&D Systems) を 50 ng/mL となるように作用させた。培養終了 30 分前に Latex Beads-Rabbit IgG-FITC Complex (Phagocytosis Assay Kit) (Cayman Chemical、Ann Arbor、MI) を培地中に加えて細胞に貪食させた。培養終了後は PBS (日水製薬) で洗浄し、DAPI solution (同仁化学研究所) (1:250) で細胞核を染色して Fluoromount-G (SouthernBiotech) で封入した。観察は正立蛍光顕微鏡イメージングシステム (ECLIPSE E1000 \times ニコンインテック、東京) で行い、CellInsight[™] CX5 (Thermo Fisher Scientific) で解析した。

(3) リポ多糖 (LPS) 刺激されたマクロファージ様細胞が歯髄細胞に及ぼす影響

ヒト歯髄細胞 (hDPCs) は、Lonza から購入し、培地 A で培養した。5~7 代継代した hDPCs を実験に供した hDPCs を Lower Chamber に 2.0×10^5 cells/well で播種し、36 時間培養した。Upper Chamber には hDPCs (1.0×10^5 cells/well) もしくは PMA 処理した THP-1 (1.0×10^5 cells/well) を播種し、36 時間培養した。36 時間後に Upper Chamber を Lower Chamber にセットし、LPS (1 µg/mL) を作用し、さらに 24 時間培養した。培養終了後、Lower Chamber の歯髄細胞から total RNA を獲得し、炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR で検討した。さらに RNA シークエンス解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析した。

(4) ビーグル犬直接覆髄モデルを用いた BDNF 組織再生能の検討

前処置

実験動物として、ビーグル犬 (メス、12~20 ヶ月齢、体重 10~15 kg) 3 頭を用いた動物実験は広島大学動物実験等規則に基づいて行った (承認番号: A16-140)。

以下の各処置は、酒石酸ブトルファノール (ベトルファール[®] \times Meiji Seika ファルマ、東京) 0.1 mg/kg、ミダゾラム (ミダゾラム注「サンド」) (サンド、山形) 0.3 mg/kg、塩酸メドミジン (ドミツール[®]) (日本全薬工業、福島) 20 µg/kg の 3 種混合麻酔に

よる鎮静下で行った。前処置として超音波スケーラー (Guilin Woodpecker Medical Instrument、桂林、中国) を用いて全顎の歯肉縁上スケーリングを行い、ブラッシングによって良好な口腔衛生状態を保った。

直接覆髄モデルの作製

前述のとおり鎮静を施し、上下顎の第3、第4前臼歯を実験に使用した。ラバーダムを装着し、術野をイソジン洗浄した後、頬側歯頸部にダイヤモンドバー (#330, SHOFU) を用いて直径2mmの円形の窩洞を形成した。窩底が歯髄に近接した後、ダイヤモンドバー (MI-F06RL, SHOFU) を用いて直径0.5mmで露髄した。窩洞を10%次亜塩素酸ナトリウム (ネオクリーナー キセキ、ネオ製薬株式会社) と過酸化水素水 (オキシドール、健栄製薬株式会社) で交互洗浄した。さらに生理食塩水液 (大塚製薬) で洗浄した。

BDNF/HMW-HA 複合体ゲルの投与

前述の方法で作製した直接覆髄モデルを用いて、片側の2歯を1ブロックとして、ブロックごとに異なる実験群を割り当てて処置を行った。処置には、Recombinant human BDNF (R&D Systems) (500 µg/mL) とその担体として高分子ヒアルロン酸 (HMW-HA) (DENKA、東京) を用いた。1つの実験群に対し2ブロック (6歯) を供した。実験群は窩洞形成のみのコントロール群 (Sham 群)、露髄部に HMW-HA ゲルを注入する群 (HMW-HA 群)、露髄部に BDNF/HMW-HA 複合体ゲルを注入する群 (BDNF/HMW-HA 群) の3つを設定した。処置後の窩洞は、MMA系レジンセメント (スーパーボンド、サンメディカル) で封鎖した。処置後の経過観察期間は4週間とした。

灌流固定と組織標本の作製

処置後4週間後の個体をネンプタール® (大日本住友製薬、大阪) の腹腔内注射で全身麻酔下におき、4%パラホルムアルデヒド (PFA) (富士フイルム和光純薬、大阪) で灌流固定を行った。上下顎骨を摘出し、引き続き4%PFAに24時間浸漬した。その後、歯1本ずつに分割し、10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (ナカライテスク、京都) に浸漬して脱灰した。12~16週間浸漬した後、通法に従ってパラフィンに包埋し、頬舌側方向に歯軸と並行に5µmの厚さに薄切した。パラフィン切片はキシレン (富士フイルム和光純薬) で脱パラフィンし、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。

4. 研究成果

(1) BDNF のマクロファージにおける炎症制御能の検討

BDNF は、PMA 処理した THP-1 の TNF α と IL-1 β の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。

BDNF は、PGN 刺激で促進される THP-1 の TNF α 、IL-1 β および IL-6 の遺伝子発現を抑制した。

(2) BDNF のマクロファージ貪食能に及ぼす影響

BDNF で刺激すると RAW264.7 の貪食能が亢進し、BDNF 受容体である TrkB の阻害剤 (K252a) の添加で抑制された。

(3) リポ多糖 (LPS) 刺激されたマクロファージ様細胞が歯髄細胞に及ぼす影響

PMA 処理した THP-1 と共培養した hDPCs は、hDPC 同士の共培養と比較して、LPS によって促進される IL-6 と IL-8 の遺伝子発現が有意に高かった。

RNA シークエンス解析において、PMA 処理した THP-1 と共培養した hDPCs は、hDPC 同士の共培養と比較して、|FC| \geq 2、raw.p<0.05 で発現上昇した遺伝子が 89、発現減少し

た遺伝子が 38 であった。発現が上昇した遺伝子の中には、M1 マクロファージと M2 マクロファージのバランスに関するとの報告がある IL-34 があり、マクロファージの分極化が歯髄細胞との細胞連携に関係している可能性が示唆される。GO functional analysis では immune system process, response to organic substance, response to external stimuli, defense response, immune response などが Top20 terms にみうけられた。

(4) ビーグル犬直接覆髄モデルを用いた BDNF 組織再生能の検討

BDNF/HMW-HA 群は Sham 群、HMW-HA 群と比較して炎症性細胞浸潤が軽度であった。

BDNF/HMW-HA 群において露髄部が内在性細胞の集積と硬組織様組織で閉鎖されていた。

Sham 群、HMW-HA 群では露髄部の閉鎖は認められなかった。

以上の結果から、BDNF はマクロファージの貪食能を亢進させることで創傷治癒の初期に起炎物質の排除を促進し、さらに過度の炎症性サイトカイン発現を抑制することで歯髄炎を鎮静化し、修復象牙質形成促進に寄与する可能性が伺えた。また、その炎症制御・修復象牙質形成には歯髄細胞-マクロファージの細胞連携が関与していることも示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki S, Takeda K*, Ouhara K, Shirawachi S, Kajiya M, Matsuda S, Kono S, Shiba H, Kurihara H and Mizuno N	4. 巻 48
2. 論文標題 Involvement of Rac1 in macrophage activation by brain-derived neurotrophic factor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 5249-5257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白輪地聡美, 武田克浩, 中西 惇, 柴 秀樹
2. 発表標題 マクロファージの機能制御を介した 歯髄における炎症応答制御
3. 学会等名 第42回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	佐々木 慎也 (Sasaki Shinya)		

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
---------	---------