

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03117

研究課題名(和文)科学的根拠に基づいた永久歯の歯髄復元療法・”歯の不死化”の確立をめざす包括的研究

研究課題名(英文)Comprehensive study on establishment of pulp regenerative therapy based on the scientific evidences

研究代表者

野杣 由一郎(Noiri, Yuichiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50218286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯根成長過程ごとに再生歯内療法(Regenerative Endodontic Procedure: REP)モデルラットを作製し、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)と治癒に関するM2マクロファージ(M<sub>2</sub>)の局在変化をもとに、治癒初期には数種のMSCが関与することを解明した。さらに、上記の効果修飾因子である、スフィンゴシン1リン酸(S1P)のR1シグナルが基質の石灰化すなわち象牙質の形成に関与することを解明し、歯根の成長に伴い特定のMSC数が根尖部で徐々に減少し、REP後に治癒遅延と再生歯髄組織の減少を生じさせ、治癒形態に影響を与えることを究明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、成熟永久歯の再生歯内療法を成功裡に導くための科学的根拠となるため、同療法を臨床導入する機運が加速する意味では、医学的価値が高い成果である。また、本研究は、日本で年間500万件以上実施されているにも拘らず、根尖病変発症率が50%以上である現行の根管治療を補完し、歯を不死化する再生療法の確立が最終ゴールであるため、学術的にも社会的にも意義深い成果である。

研究成果の概要(英文)：We have developed a rat model of Regenerative Endodontic Procedure (REP) for each root growth process and elucidated the involvement of several MSCs in the early stage of healing based on the localization of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and M2 macrophages (M<sub>2</sub>), which are involved in healing. MSCs are involved in the early stages of healing. The R1 signal of sphingosine 1-phosphate (S1P), an effect modifier of the above, is involved in the calcification of the matrix, i.e., dentin formation, and the number of specific MSCs gradually decreases at the root apex with root growth, causing delayed healing and reduced regenerated pulp tissue after REP, which affects healing morphology. This is the first time that the number of MSCs in the root apex has been investigated.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄復元 動物モデル SCAP S1P 再生歯内療法

## 1. 研究開始当初の背景

根管治療歯は生活歯に比べて脆弱であり、歯の喪失のリスクが高いため(Wan-Chuen Liao *et al.* 2022)、歯の構造を強化することが可能な再生歯内療法(Regenerative Endodontic Procedure: REP)が注視されている。しかし、血餅を用いたREP後の治癒形態は、多くの場合、歯髄様組織ではなく歯根膜様組織であることが知られている。我々は既に、5週齢ラット(根未完成歯)では治癒形態が歯髄様組織になるREP条件を見出した(Edanami N *et al.* Sci Reps, 2020)。他方で、REPは根尖部に存在する歯乳頭由来幹細胞(Stem Cells of the Apical Papilla: SCAP)を根管に導き、血餅を足場とした細胞の賦活化により骨様硬組織形成を期待するものである。他方で、REPにおけるSCAPの象牙芽細胞分化メカニズムは明らかとなっていない。他方で、生体内に存在し、シグナル分子として働く脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、S1P受容体(S1PR1-5)を介して生理機能作用を発揮する。再生歯内療法におけるSCAPの象牙芽細胞分化メカニズムや、S1PR1シグナルがSCAPの象牙芽細胞分化、象牙質形成へ及ぼす影響については不明である。

## 2. 研究の目的

REPの実施後、治癒に向かう際の詳細な分子細胞メカニズムや歯根形成段階による治癒形態に差があるか否かについては不明なままである。根未完成歯の根尖部には特異的な間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)の存在が確認されており、MSCの有無を左右する根尖部の発達状況の違いがREP後の治癒期間と治癒形態に大きく影響すると仮説を立てた。よって、本研究では、3つの歯根成長期(中期、後期、完成期)に着目し、REP後の治癒形態のパターンおよび新生硬組織(dentin-associated mineralized tissue: DAMT)量の比較を行った。また、治癒に重要な役割を演じるMSCとM2マクロファージ(M $\phi$ )に着目し、REP前の根尖部とREP後の根管内新生軟組織における免疫組織学的局在の比較を行った結果、2つの問いが生まれた。根未完成歯ではREP後、根尖部でMSC数が根完成歯と比較して早期に増加し、消炎期間が短縮するのではないかと。根未完成歯と根完成歯ではREP後に展開されるMSCの種類に相違があるのではないかと。根管内の血餅が軟組織に置換されるのはREP7日後であるという報告があり(Komada *et al.* 2022)、組織修復のためのMSCが血餅内に誘導されていることが推察される。そこで、REP7日後に着目し、根尖部と根管内新生軟組織におけるMSCの局在の比べることで、治癒メカニズムの一端が解明できるという仮説を立て実験した。

他方で、幼弱永久歯と成熟永久歯では根尖付近のSCAPに大きな相違があるか。血流以外に影響をおよぼす因子は存在するか。という問いに答えるため、以下の3項目を目的とした。目的1)申請者が開発した根管治療モデル上で、種々の週齢のラットを検索し、同部の再生の起源である局所のSCAPの挙動とその再生能を検索する。目的2)上記1)項の効果修飾因子である、S1PR1シグナルがSCAPの象牙芽細胞分化、象牙質形成に関与するが歯髄復元に及ぼす影響を検討する。REP治癒初期には数種のMSCが関与することが明らかとなった。S1PR1シグナルはSCAPの象牙芽細胞分化に加えて、象牙質シアロリンタンパク(dentin sialophosphoprotein: DSPP)遺伝子発現促進により、基質の石灰化すなわち象牙質の形成に関与することを示唆した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯髄再生療法モデルラットを用いた歯根成長段階による治癒形態の比較解析

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認後実施した(承認番号 SA01156)。歯根形成中期、後期、完成期に該当する5週齢、8週齢および11週齢のWistar系ラットの下顎左側第一臼歯に対して、以前の研究(Edanami *et al.* 2020)に従ってREP処置を施した。すなわち、近心部を露髄し、近心根の根尖孔から0.8mm上部までの歯髄を除去後、根管内容を血餅で満たし、MTAを塗布し、フロアブルコンポジットレジンで充填した。28日後に下顎骨ごと摘出し、4週間脱灰後、パラフィン切片を作成し、H-E染色、dentin sialoprotein、NestinおよびPeriostinの免疫組織学的解析による根管内の治癒形態およびDAMT量の評価、MSCマーカーである $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、CD73、CD90およびCD146を免疫組織学的に解析し、MSCの局在解析、さらにCD68とCD206とを免疫蛍光二重染色してM2M $\phi$ の局在解析を行った。

#### (2) 再生歯内療法後の治癒初期における各種間葉系幹細胞マーカー陽性細胞の局在性

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認後実施した(承認番号 SA01156)。歯根未完成から成長終了に応じて5、8ならびに11週齢の雄性Wistar系ラットの下顎左側第一臼歯に対し、以前の研究(Edanami N 同上)に従ってREP処置を施した。すなわち、近心部を露髄し、近心根の根尖孔から0.8mm上部までの歯髄を除去後、根管内容を血餅で満たし、MTAを貼付し、フロアブルコンポジットレジンで封鎖した。7日後に下顎骨ごと摘出し、4週間脱灰後、パラフィン切片を作製し、MSCマーカーである $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)、CD73、CD90ならびにCD146の特異的抗体を用いた免疫蛍光染色後に顕鏡し、MSCマーカー陽性細胞の局在解析を行った。統計解析はKruskal-Wallis検定を行い、 $p < 0.01$ あるいは0.05で有意差を判定した。

#### (3) S1PR1受容体を介したマウス歯乳頭由来幹細胞の象牙芽細胞分化と石灰化

実験にはマウス不死化歯乳頭由来幹細胞株(iSCAP: Abm, Canada)を使用した。細胞にS1P(Sigma-Aldrich, USA)または骨/象牙質様硬組織誘導因子として報告のあるBMP-9(R&D systems, USA)を作用させ、その後石灰化培地または脂肪細胞分化培地で培養した。S1PR1阻害剤W146(Cayman Chemical, USA)を用いてS1PR1の阻害を行い、S1P、BMP-9が象牙質関連遺伝子のmRNA、分泌タンパク質発現および石灰化、脂肪滴形成に及ぼす影響について検討した。mRNA発現はReal-time RT-PCR法、分泌タンパク質発現はELISA法、石灰化はアリザリンレッドS染色、脂肪滴形成はオイルレッドO染色を用いて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯髄再生療法モデルラットを用いた歯根成長段階による治癒形態の比較解析

未処置の近心根における根管歯髄および根尖部では、 $\alpha$ -SMAおよびCD73は歯根の発達とともに根尖部での陽性反応が著明に減少した一方で、CD90およびCD146では変化は認められなかった。各週齢におけるMSCの局在性については、図1に示した。REP処置後28日目において、週齢の増加に伴いDAMT・歯髄様組織の治癒形態を示す頻度が減少し、DAMT形成量の減少を認めた。 $\alpha$ -SMAの免疫組織学的解析では、週齢の増加に伴い根尖部の陽性領域が減少する一方で、根管内の新生軟組織においてMSCの細胞形

態を有する  $\alpha$ -SMA 陽性細胞が増加した。また、根尖部および根管内新生軟組織において MSC の細胞形態を有する CD73、CD90 および CD146 の陽性細胞が著明に増加した。さらに、週齢の増加に伴い CD68 と CD206 の二重陽性細胞が根尖部および根管内新生軟組織でも著明に増加した。未処置歯に関して、週齢の増加に伴い根尖部での MSC の細胞形態を有する一部の MSC マーカー陽性細胞が減少していることから、歯根の完成とともに特定の MSC 数が徐々に減少していく可能性がある。このような変化は REP 後の治癒形態に影響を与える可能性を示した。

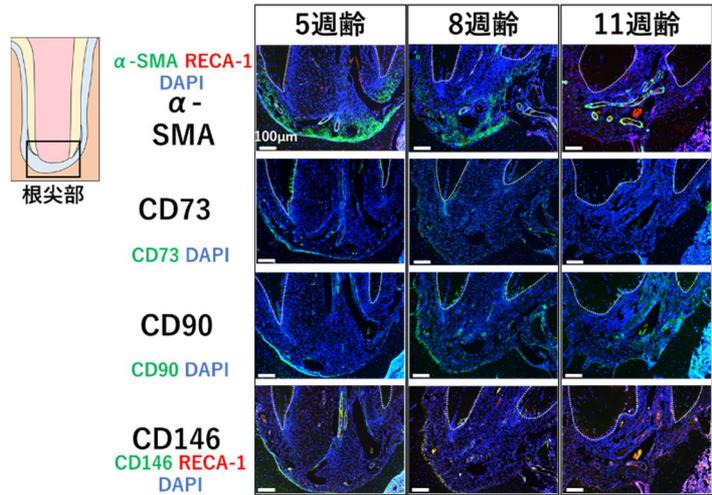


図 1. 正常ラットの各週齢に対するMSCの局在性

### (2) 再生歯内療法後の治癒初期における各種間葉系幹細胞マーカー陽性細胞の局在性

REP 後 7 日目の近心根において、週齢が増すに従い  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は、根尖部と根管内新生軟組織において減少し、CD73 陽性細胞は、根管内で減少するが根尖部では変化せず、CD90 陽性細胞は根尖部で増加したが根管内では変化は無く、CD146 陽性細胞も同様に、根尖部で増加し根管内では変化を認めなかった(図2)。

歯根の成長に伴い、REP 後の根管内新生軟組織において  $\alpha$ -SMA と CD73 陽性細胞が減少したことから、根管内あるいは根尖部軟組織からの  $\alpha$ -SMA 陽性あるいは CD73 陽性 MSC の供給が、歯根の成長に伴い低下したと考察される。他方で、CD90 と CD146 陽性細胞の増加を根尖部で認めた(図2)。

### (3) S1PR1 受容体を介したマウス歯乳頭由来幹細胞の象牙芽細胞分化と石灰化

iSCAP 細胞において、S1P、BMP-9 の添加により、象牙芽細胞分化マーカー遺伝子 DSPP、Dentin matrix protein 1 (DMP1)、Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) の mRNA 発現は増加した。S1PR1 阻害剤

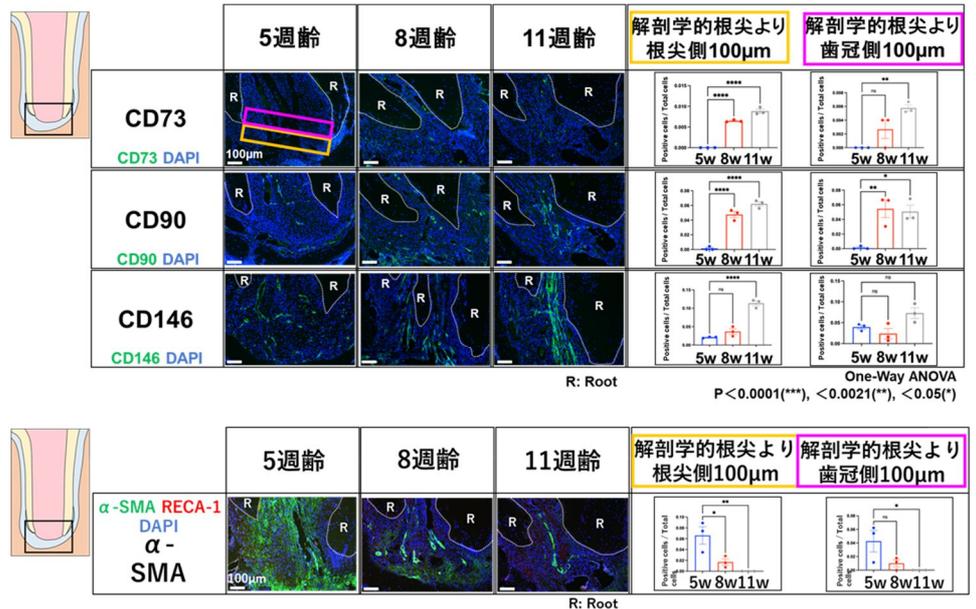


図 2 処置後7日のMSCの根尖部での局在性

による前処理を行うと、S1P による DSPP、DMP1 の mRNA 発現増加は抑制され、MEPE は抑制傾向を認めた。一方、BMP-9 による DSPP、DMP1、MEPE の mRNA 発現増加は、S1PR1 阻害による影響を受けなかった。また、DSPP タンパク質の分泌は、S1P、BMP-

9の添加により増加した。S1PR1阻害を行うと、S1PによるDSPPタンパク質分泌増加は抑制されたが、BMP-9によるDSPPタンパク質分泌増加の影響はなかった。MEPEタンパク質分泌はそれ自体が少量で、S1PおよびBMP-9添加による影響を認めなかった。

S1P、BMP-9の添加により石灰化促進作用を認めた。S1PR1阻害を行うと、S1Pによる石灰化促進作用は有意に抑制されたが、BMP-9による石灰化促進作用は影響を受けなかった。一方、脂肪細胞分化培地では、S1Pの添加により脂肪滴形成抑制作用を認めたが、BMP-9の添加は脂肪滴形成に影響を及ぼさなかった。また、S1PR1阻害により、S1Pの脂肪滴形成抑制作用は緩和され、一部脂肪滴の形成が観察された。一方、S1PR1阻害はBMP-9の脂肪滴形成に影響を及ぼさなかった。

#### ・考察

歯根の完成に伴い残存歯髄に存在するMSC数が減少し、その結果、治癒遅延とDAMT形成の減少が生じたと考えられる。治癒に寄与するMSCは数種類存在しており、歯根の成長段階によってその供給経路や供給されるMSCの種類が異なる可能性が示された。本研究結果から、S1PR1受容体を介したiSCAP細胞の象牙芽細胞分化促進作用が示唆された。象牙質は、象牙芽細胞から合成・分泌された有機性基質が石灰化することにより形成されるが、基質を構成する非コラーゲン性タンパク質のうち最も多いのがDSPPである。今回、S1PR1受容体を介したDSPP mRNA発現増加、DSPPタンパク質分泌増加を見出したことから、S1PR1シグナルはSCAPの象牙芽細胞分化に加えて、DSPP遺伝子発現促進により、基質の石灰化すなわち象牙質の形成に関与する可能性も考えられた。一方、BMP-9シグナルによる象牙芽細胞分化、石灰化促進は、S1PR1シグナルとは異なる経路により制御されている可能性が考えられた。また、iSCAP細胞の脂肪細胞への分化については、S1PR1シグナルを介した脂肪細胞分化抑制作用の存在が示唆されたが、BMP-9シグナルは関与しないと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Edanami N, Takahara S, Belal RSI, Yoshida K, Takahara S, Yoshida N, Ohkura N, Noiri Y	4. 巻 14
2. 論文標題 In vivo assessment of the apatite-forming ability of new-generation hydraulic calcium silicate cements using a rat subcutaneous implantation model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Functional Biomaterials	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jfb14040213	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 Edanami N, Belal RSI, Takenaka S, Yoshida K, Gutierrez REB, Takahara S, Yoshida N, Ohkura N, Noiri Y	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo assessment of the calcium salt-forming ability of a new calcium silicate-based intracanal medicament: Bio-C Temp	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 91-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj11040091	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 Matsumoto K, Imai Y, Hirose H, Matsuzaki E.	4. 巻 18
2. 論文標題 A case report of root canal retreatment of a four-rooted maxillary second molar.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 461-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2022.08.033	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 Matsuzaki E, Hirose H, Matsumoto K, Matsumoto N, Fujimasa S, Hatakeyama J, Anan H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of root-end filling materials on vascular endothelial cell proliferation and tube formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1232-1237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2021.12.006	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 Vansana P, Kakura K, Taniguchi Y, Egashira K, Matsuzaki E, Tsutsumi T, Kido H	4. 巻 17
2. 論文標題 The effect of AMP kinase activation on differentiation and maturation of osteoblast cultured on titanium plate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1225-1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2021.12.003	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 4.Matsuzaki E, Hirose H, Fujimasa S, Yoshimoto S, Yanagi T, Matsumoto K, Nikaido M, Minakami M, Matsumoto N, Anan H	4. 巻 17
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate receptor 2 agonist induces bone formation in rat apicoectomy and bone defect model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 787-794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2021.10.004	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高原信太郎、大倉直人、吉羽邦彦、吉羽永子、枝並直樹、竹中彰治、野杵由一郎
2. 発表標題 根尖孔外に漏出したバイオセラミックシーラーと歯周組織の相互作用
3. 学会等名 2022年度日本歯科保存学会秋季学術大会 (157回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本典祥、阿南 壽、廣瀬陽菜、藤政清志朗、金丸慎吾、田中聡一郎、島田将彦、松崎英津子
2. 発表標題 加齢に伴うS1P受容体発現細胞の動態変化～ラット根尖部/歯髓腔における解析～
3. 学会等名 2022年度日本歯科保存学会秋季学術大会 (157回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬陽菜, 松崎英津子, 松本和磨, 松本典祥, 藤政清志朗, 二階堂美咲, 水上正彦, 畠山純子, 阿南 壽
2. 発表標題 逆根管充 ~ 材が血管内皮細胞の増殖と管腔形成に及ぼす影響 ~ 第2報 ~
3. 学会等名 2022年度日本歯科保存学会春季学術大会 (156回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本典祥, 吉本尚平, 廣瀬陽菜, 藤政清志朗, 金丸慎吾, 田中聡一郎, 島田将彦, 片岡美紀, 松本和磨, 二階堂美咲, 水上正彦, 阿南 壽, 松崎英津子
2. 発表標題 ラット根尖部・歯髓腔におけるS1P受容体発現細胞の分布 ~ 加齢による動態変化 ~
3. 学会等名 第49回福岡歯科大学学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高原信太郎, 大倉直人, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 竹中彰治, 枝並直樹, 庭野和明, 野杵由一郎
2. 発表標題 歯髓再生療法モデルラットを用いた歯根成長段階による治癒形態の比較解析
3. 学会等名 2023年度日本歯科保存学会春季学術大会 (158回)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松崎英津子, 広瀬陽菜, 藤政清志郎, 二階堂美咲, 水上正彦, 松本典祥, 阿南壽
2. 発表標題 S1PおよびBMP-9がマウス歯乳頭由来幹細胞の骨芽細胞/象牙芽細胞分化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2021年度秋季学術大会 (155回)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野村由一郎、久保庭雅恵、坂中哲人、竹中彰治、多部田康一、野中由香莉、前園葉月	4. 発行年 2022年
2. 出版社 HYORON	5. 総ページ数 101
3. 書名 よくわかる？口腔バイオフィルムと歯科治療	

〔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	大倉 直人 (Ohkura Naoto)  (00547573)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	
研究分担者	松崎 英津子 (Matsuzaki Etsuko)  (20432924)	福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  (37114)	
研究分担者	竹中 彰治 (Takenaka Shouji)  (50313549)	新潟大学・医歯学系・准教授  (13101)	
研究分担者	朝日 陽子 (Asahi Yoko)  (50456943)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教  (14401)	
研究分担者	枝並 直樹 (Edanami Naoki)  (80804567)	新潟大学・医歯学系・助教  (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
---------	---------