

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16967

研究課題名（和文）マクロファージ極性変化により誘導される可逆性歯髄炎の特異的創傷治癒メカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the reversible pulpitis specific pulpal wound healing mechanisms induced by macrophage polarization

研究代表者

小道 俊吾（Komichi, Shungo）

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：40804456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットにう蝕を誘発し、浅在性う蝕由来可逆性歯髄炎と深在性う蝕由来不可逆性歯髄炎の動物実験モデルの作製に成功した。

浅在性う蝕では、歯髄組織にてM2型マクロファージ等の発現が上昇することが明らかとなり、深在性う蝕の場合はM1型マクロファージの強い発現増強が認められた。また、浅在性う蝕を対象とした直接覆髄実験では、第三象牙質の形成が認められ、M2マクロファージが創傷治癒に役割を果たしていることが明らかとなったのに対し、深在性う蝕の場合には、露髄部の閉鎖は認められず、歯髄の炎症が残存した。

本モデルを用いることで、歯髄保存療法の適応拡大、歯髄炎治療薬開発へ発展することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の歯科臨床において、不可逆性歯髄炎に罹患した歯は、歯髄除去療法をおこなうしか選択肢が存在せず、抜髄された歯は寿命が短くなることが明らかとなっていた。歯髄保存療法の適応を歯髄炎まで拡大できれば、歯の寿命延長を達成できる可能性は高いが、これまで歯髄炎についての研究が不十分であった。

本研究では、ラットを用いた動物実験モデルで、う蝕に由来する可逆性・不可逆性歯髄炎を誘発することに成功した世界初の研究成果である。本研究により、歯髄炎を再現性高く誘発することができるようになり、歯髄保存療法の適応が歯髄炎にまで拡大すれば、根管治療フリーの歯科臨床の実現への展開が期待される意義深い研究である。

研究成果の概要（英文）：This research project successfully established rat reversible/irreversible pulpitis model derived from dental caries.M2 macrophages were strongly expressed in the pulp tissue of shallow to moderate caries, whereas M1 macrophages were widely expressed in the pulp of deep caries.

Direct pulp capping experiment against shallow or moderate caries induced complete tertiary dentin formation, but incomplete tertiary dentin and strong inflammation was observed in deep caries model. These results indicated the reversible/irreversible pulpitis model could facilitate the development of new vital pulp therapies in clinical dentistry.

研究分野：歯科保存学

キーワード：可逆性歯髄炎 不可逆性歯髄炎 う蝕 マクロファージ ラット 歯髄炎モデル

1. 研究開始当初の背景

直接覆髄法の目的は、「歯髄が本来持つ創傷治癒プロセスを促進することにより、露髄部において連続性が破綻した象牙質-歯髄複合体を再構築 (= 第三象牙質形成) すること」であり、その過程の中心となる歯髄創傷治癒機序の解明を目指し、これまで様々な研究が世界中で展開されてきた。実際、動物の歯に窩洞形成および覆髄をおこなう実験モデルは、歯髄創傷治癒過程の評価に適した実験系であり、これまでの研究でも多く用いられている。

現在の臨床において覆髄剤のゴールドスタンダードとして用いられる Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、これまでに実施されてきた覆髄動物実験においても良好な第三象牙質形成を促進するという結果が得られており、当該分野の研究のポジティブコントロールとしてみなされている。しかしながら、実際の臨床における直接覆髄の成功率は、MTA を用いた場合でも 60~70% 程度 (Caliskan et al. 2016) であり、動物実験の結果と臨床成績に明らかな乖離が認められる。この乖離の最も大きな要因の一つとして、これまで実施されてきた覆髄動物実験モデルは健全な歯に窩洞形成をおこない、健全な歯髄を覆髄後に評価するものであることが挙げられる。つまり、従来の覆髄実験モデルでは実際の臨床において覆髄処置の対象となる深いう蝕罹患歯に特有の歯髄充血状態や可逆性歯髄炎の病態が再現できておらず、創傷治癒過程を包括的に評価できていない。

健全な歯髄組織においては窩洞形成および覆髄剤により機械的または化学的な傷害を受けた細胞が放出する傷害関連分子パターン (DAMPs) により一過性の炎症が惹起され、そこを起点とした組織再生が開始する。一方、う蝕罹患歯においては、細菌が象牙質に到達すると象牙細管を經由してリポ多糖 (LPS) を始めとした病原体関連分子パターン (PAMPs) が歯髄組織に影響を与え始める。その PAMPs を駆除すべくマクロファージを始めとした免疫細胞が集積し炎症が生じ、さらには組織破壊による DAMPs の放出も生じることで炎症は増悪していく。したがって、う蝕罹患歯では覆髄処置を開始する時点で歯髄の炎症状態や細胞の構成などの環境が健全歯髄とは大きく異なることから、上述した覆髄における研究と臨床の乖離を埋めるためには、可逆性歯髄炎特有の環境を実験動物において再現した上で覆髄実験をおこない歯髄の反応を評価する必要がある。

申請者は、すでにカリオロジーの分野で確立されているラットう蝕モデル (Nomura et al. 2014, Ooshima et al. 1998) を応用し、う蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルの確立に成功し、このモデルを用いた覆髄実験をおこなうことで、健全歯を対象とした従来の覆髄実験モデルとは異なる様相の第三象牙質形成過程が確認された。従来の覆髄実験では覆髄後数日経過してから炎症性細胞の浸潤が生じ、炎症の消退に引き続き第三象牙質形成が開始していた。一方、可逆性歯髄炎覆髄モデルにおいては、覆髄時すでにマクロファージを始めとした炎症性細胞浸潤が認められ、その消退を待つことなく比較的早期に第三象牙質形成の開始が認められた。

マクロファージはその役割によって M1 型と M2 型に大別される。一般的に、M1 マクロファージは炎症性単球が TNF- α や IFN- γ などを受けて分化し、病原体や寄生虫感染防御に働く一方、M2 マクロファージは組織常在性単球が IL-4 や IL-13 など Th2 型サイトカインを受けて分化し、組織修復などに関わると言われている。組織の修復および再生においては M2 マクロファージの産生する IL-10, Transforming growth factor- β を始めとした免疫調整因子の関与が報告されており (Atri et al. 2018)、また、M2 マクロファージが骨芽細胞の石灰化を誘導することが知られている (Gong et al. 2016)。歯髄組織においても、M2 マクロファージが歯髄幹細胞の石灰化を誘導すること (Parc et al. 2017) や、健全歯を覆髄後数日で M1 マクロファージが集積し、その後 M1 マクロファージの減少に伴い M2 マクロファージが増加し、炎症の消退および第三象牙質形成が生じると報告されている (Gu et al. 2019)。

以上より、本研究では可逆性炎症歯髄においてう蝕窩洞直下の歯髄にはすでにマクロファージが集積しており、う蝕除去および覆髄をおこなうことで M2 マクロファージ由来の免疫調整因子が早期に作用することで歯髄幹細胞の分化そして石灰化が早期に生じるのではないかとという仮説のもと、「可逆性歯髄炎覆髄モデルにおける M2 マクロファージはどのような時間・空間的な局在および免疫調整因子を産生を示すのか。そしてそれらが歯髄幹細胞にどのような影響を与えるのか」という問いを究明することで、可逆性歯髄炎に特有の歯髄創傷治癒機序の解明およびそのメカニズムに立脚した覆髄剤の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「可逆性炎症歯髄の創傷治癒における M2 マクロファージの役割を明らかにすることで、可逆性歯髄炎に特有の歯髄創傷治癒機序の解明すること」である。

申請者が確立したう蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルを応用し覆髄実験をおこなうことで、これまで独立して研究がおこなわれていたう蝕に対する免疫反応による可逆性歯髄炎の発症、う蝕除去及び覆髄処置を起点とした炎症消退、象牙質-歯髄複合体の再構築 (= 第三象牙質形成) という複雑なプロセスから成る創傷治癒過程を包括的に評価可能となった結果、従来の報告とは異なり炎症とオーバーラップした創傷治癒過程が明らかとなりつつある。この

手法により可逆性歯髄炎に特有の歯髄創傷治癒機転の解明を目指すことは過去に例をみない独自の取り組みであり、実際の臨床において覆髄処置の対象となる深いう蝕罹患歯に特有の可逆性炎症歯髄に対してより効果的な生物学的覆髄剤の開発につながると期待され、歯の寿命、ひいては健康寿命の延長につながると考えられるため、社会的な意義も大きい。

近年、全身における炎症性疾患について M1/M2 マクロファージの役割が解明されつつあり、特に M2 マクロファージの抗炎症能および間葉系幹細胞に与える影響が組織再生の観点から注目されているが、その全貌は明らかではない。歯髄組織における M2 マクロファージの報告も少数あるが、可逆性炎症歯髄における報告はなく、本研究によって M2 マクロファージの新たな知見が得られることで、歯科分野のみならず全身における炎症性疾患のメカニズム解明および再生医療分野の発展に寄与すると考える。

3. 研究の方法

(1) う蝕由来ラット歯髄炎モデルの作製および解析

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認のもとに実施された（承認番号：No.R-01-017-0）。14日齢 Sprague-Dawley ラットに *Streptococcus mutans* MT8148 株を経口接種し、高スクロース含有飼料（Diet 2000、日本クレア）を不断給餌することでう蝕を誘発した。誘発されたう蝕の進行について、マイクロ CT（R-mCT2、リガク）にて評価を行い、歯髄において誘発される炎症について、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、Brown & Brenn（BB）染色および Toll like receptor 2（TLR2）、Proliferating cell nuclear antigen（PCNA）の局在について病理組織学的、感染免疫組織化学的に評価を行うとともに、マクロファージマーカーである CD68 および M2 マクロファージマーカーである CD206 について蛍光免疫染色にてその局在を評価した。

(2) 可逆性・不可逆性歯髄炎ラットモデルの確立

前項のう蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルを応用し、MTA を用いた直接覆髄実験をおこなった。得られた試料をマイクロ CT および HE 染色にて評価をおこない、可逆性歯髄炎ならびに不可逆性歯髄炎ラットモデルの作製をおこなった。

(3) 可逆性歯髄炎ラット直接覆髄モデルの創傷治癒過程における M1/M2 マクロファージ局在解析

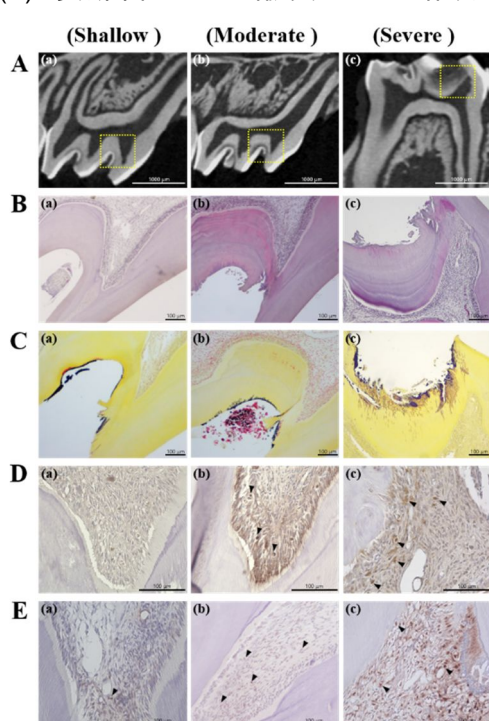
前項で得られたラット可逆性歯髄炎モデルに直接覆髄を実施し、HE 染色および CD68、CD206 の局在について蛍光免疫染色にてその局在ならびに経時的変化について検討をおこなった。コントロールとして健全ラットを用いた。

(4) 可逆性歯髄炎ラット直接覆髄モデルの創傷治癒過程における PCNA 局在解析

ラット可逆性歯髄炎モデルに直接覆髄を実施し、PCNA の経時的な局在変化について蛍光免疫染色にて検討をおこなった。コントロールとして健全ラットを用いた。

4. 研究成果

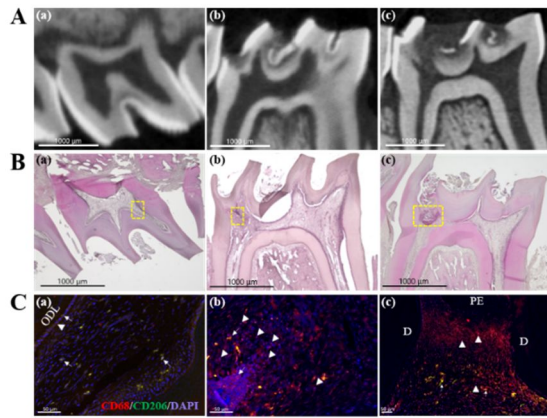
(1) う蝕由来ラット歯髄炎モデルの作製および解析



ラットに誘発したう蝕を Shallow(う蝕の進行は象牙質の 1/3 まで)、Moderate (象牙質の 1/3 ~ 2/3 まで)、Severe (象牙質の 2/3 よりも深い) の 3 段階に分類し (図 1A)、HE 染色 (B)、BB 染色 (C)、TLR 免疫染色 (D)、PCNA 免疫染色 (E) した結果を示す。

う蝕の進行に伴い、歯髄組織において炎症性細胞の浸潤が観察されるとともに、TLR や PCNA の発現が増強していることが観察された。

図 1 う蝕の進行による歯髄の状態の評価

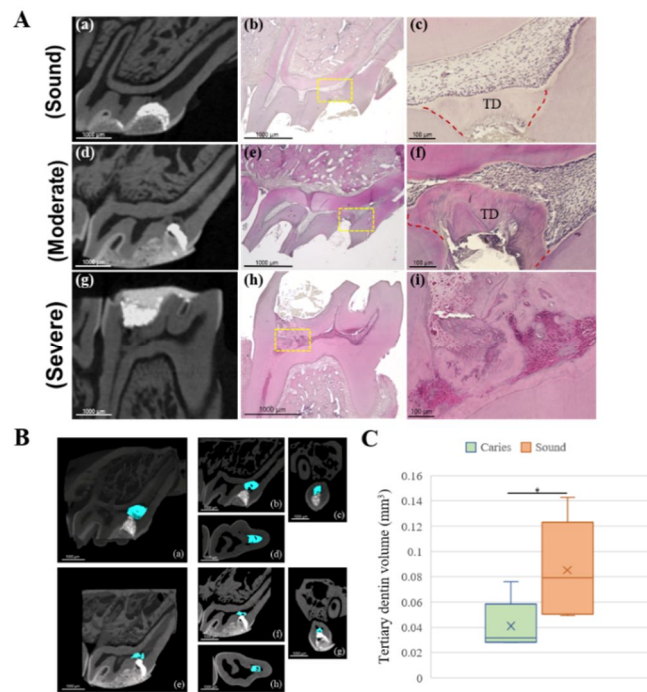


続いて、Moderate、Severe および Exposure (マイクロ CT にて露髄が認められる深さのう蝕)について、CD68/CD206 蛍光免疫染色にて評価した結果を図 2 に示す。

Shallow 群では主に M2 マクロファージの発現が認められたのに対し(図 2C(a)) Severe 群では M1 と M2 マクロファージの双方が発現しており(図 2C(b)) Exposure 群では M1 マクロファージが多く発現しているのが観察された(図 2C(c))

図 2 う蝕の進行による M1/M2 マクロファージの局在

(2) 可逆性・不可逆性歯髄炎ラットモデルの確立

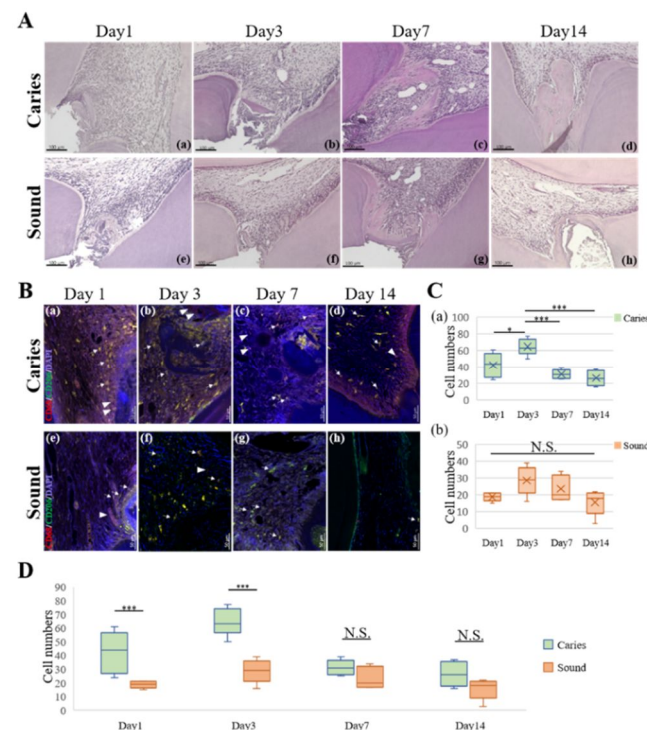


Moderate もしくは Severe レベルのう蝕を誘発したラットを対象に直接覆髄実験をおこなった結果を示す(図 3)。

Moderate 群では直接覆髄 4 週間において露髄部における硬組織形成が認められた(図 3A(f)) のにたいし、Severe 群では硬組織形成は散在性に認められたものの、歯髄に明らかな炎症が残存していた(図 3A(i))。一方で Moderate 群で形成された硬組織の体積は健全群に比べると有意に少なかった(図 3C)。

図 3 う蝕ラット直接覆髄実験後の硬組織形成評価

(3) 可逆性歯髄炎ラット直接覆髄モデルの創傷治癒過程における M1/M2 マクロファージ局在解析

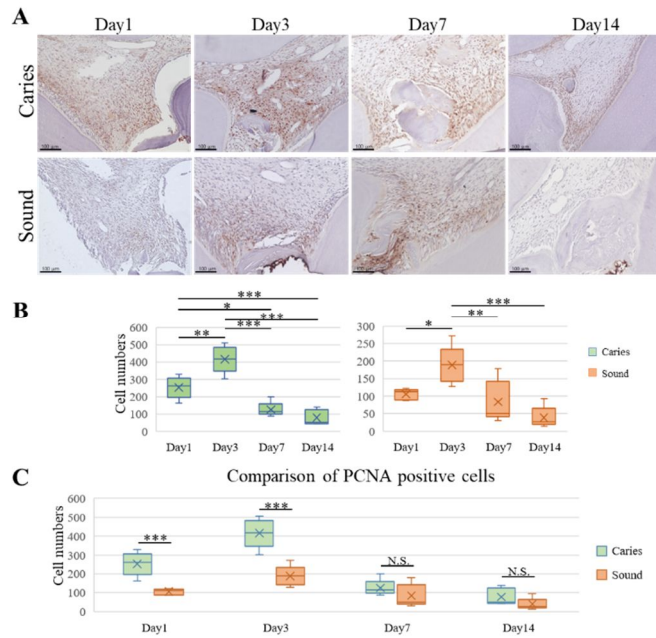


Moderate レベルのう蝕を誘発したラットに直接覆髄後、形成される硬組織とマクロファージの経時的変化を示す(図 4)。

Moderate 群では覆髄後 1-3 日の間に多くの M2 マクロファージが観察され、健全群では観察期間を通じて M2 マクロファージの数に有意な変化は認められなかった(図 4B,C)。また、健全群と比較して Moderate 群では、覆髄後 1-3 日において有意に多くの M2 マクロファージが観察された(図 4D)。

図 4 う蝕ラット直接覆髄後の硬組織形成とマクロファージ局在の経時的変化

(4) 可逆性歯髄炎ラット直接覆髄モデルの創傷治癒過程における PCNA 局在解析



Moderate レベルのう蝕を発症したラットに直接覆髄後、PCNA の時空間的発現変化を示す (図 5)。

Moderate 群、健全歯ともに覆髄後 3 日において有意に多くの PCNA 発現を認めた (図 5B) が、Moderate 群と健全群を比較すると、覆髄後 1, 3 日において、Moderate 群の方が有意に発現していた PCNA の数は多かった。

図 5 う蝕ラット直接覆髄後の PCNA 局在の経時的変化

以上の結果から、ラットにう蝕を誘発し、象牙質厚さの 1/3 を超える程度の進行を認めると、歯髄組織において免疫反応が観察されることが明らかとなり、象牙質 1/3-2/3 程度の進行であれば、M2 マクロファージを中心とした発現が認められ、象牙質 2/3 を超える進行であれば M1 マクロファージが優勢となることが明らかとなった。また、中程度のう蝕に対して直接覆髄を実施すると、健全歯と類似した治癒機転を示すのに対し、深在性う蝕に対して直接覆髄をおこなっても歯髄の炎症は消退せず、硬組織形成も不十分であった。このことから、炎症作用に関連すると報告のある M1 マクロファージの発現は不可逆性歯髄炎が存在することを示唆するとともに、M2 マクロファージの発現は歯髄がまだ可逆性の炎症状態あることが示唆された。また、健全ラットに直接覆髄する場合とう蝕ラットに直接覆髄する場合で M2 マクロファージの発現が異なることや、PCNA の時空間的な発現が異なることから、覆髄後の創傷治癒についてより臨床的に評価するためには健全ラットよりもう蝕ラットを用いる方が望ましいと考えられる。

本研究から、われわれはラットを用いた動物実験モデルにおいて可逆性・不可逆性歯髄炎を再現性高く誘発できることを明らかとし、歯髄炎におけるマクロファージの役割についても明らかとした。これらの知見を応用して、今後歯髄保存療法が更なる発展へとつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ali Manahil, Okamoto Motoki, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Matsumoto Sayako, Komichi Shungo, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 38
2. 論文標題 Biological properties of lithium-containing surface pre-reacted glass fillers as direct pulp-capping cements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 294 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dental.2021.12.011	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 該当する

1. 著者名 Watanabe M., Okamoto M., Komichi S., Huang H., Matsumoto S., Moriyama K., Ohshima J., Abe S., Morita M., Ali M., Takebe K., Kozaki I., Fujimoto A., Kanie K., Kato R., Uto K., Ebara M., Yamawaki-Ogata A., Narita Y., Takahashi Y., Hayashi M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Novel Functional Peptide for Next-Generation Vital Pulp Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 322 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221135766	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 該当する

1. 著者名 Huang H., Okamoto M., Watanabe M., Matsumoto S., Moriyama K., Komichi S., Ali M., Matayoshi S., Nomura R., Nakano K., Takahashi Y., Hayashi M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Development of Rat Caries-Induced Pulpitis Model for Vital Pulp Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 574 ~ 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221150383	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Huang H, Okamoto M, Watanabe M, Matsumoto S, Moriyama, K, Komichi S, Takahashi Y, Hayashi M
2. 発表標題 Evaluation of inflammatory changes during wound healing process in caries-stimulated dental pulp
3. 学会等名 第69回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 昌克, 岡本 基岐, 小道 俊吾, 黄 海玲, 松本 紗也子, 森山 輝一, 高橋 雄介, 林 美加子
2. 発表標題 歯髄創傷治癒を促進するタンパク質の機能部位の探索
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会2022年度春季学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>むし歯による歯痛の原因「歯髄炎」その動物モデルを世界初作製 https://www.dent.osaka-u.ac.jp/20230315/6081 上記につき、プレスリリースを実施した</p>

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	黄 海玲 (Huang Hailing)	大阪大学・歯学研究科・特任研究員 (14401)	
研究協力者	森山 輝一 (Moriyama Kiichi)	大阪大学・歯学研究科・大学院生 (14401)	

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			
スーダン	ハルツーム大学			