

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16995

研究課題名（和文）象牙芽細胞分化に関与する因子を標的とした新規直接覆髄材料の開発

研究課題名（英文）development of a new direct pulp capping material targeted the factor that is involved in the odontoblastic differentiation

研究代表者

藤野 翔香 (Fujino, Shoko)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60883832

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）：従来の直接覆髄材料は、骨様象牙質を誘導することがある。したがって、象牙細管構造をもつ緻密な修復象牙質を誘導することが可能な、材料の開発が必要である。私たちは最近、ドーパミン（DA）が象牙質形成に関与していることを報告した。ゆえに、DAが歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化および修復象牙質形成能について調べた。DA刺激はDPSCの象牙芽細胞分化を促進し、象牙細管構造を有する修復象牙質を誘導した。これらの結果は、THによって産生されるDAがDPSCの象牙芽細胞分化に関与し、本来の象牙質と同様の修復象牙質の形成を誘導することを示唆している。この研究は、歯髄組織を保存する治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄組織の保存は、将来的な歯の保存につながると考えられる。現在の歯科治療において、偶発的露髄が生じた際、歯髄を保存するために直接覆髄処置が行われる。現在臨床で頻用されている水酸化カルシウム製剤およびMTAセメントは、多孔性の骨様象牙質を形成する機会が多いため、十分な封鎖ができず、感染を起こして抜髄となるケースは少なくない。そこで、本来の象牙細管構造を有した修復象牙質の形成を促進する直接覆髄材料の開発が求められている。本研究結果で着目した低分子であるドーパミンは、安全かつ安価で、象牙細管構造を有する緻密な修復象牙質形成を誘導する、新規直接覆髄材料の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Conventional direct pulp-capping materials sometimes induce bone-like dentin with poor sealing properties. Therefore, exploration of biomolecules that allow tight sealing by tubular reparative dentin is required. We recently reported that dopamine (DA) is involved in dentinogenesis. Hence, we investigated the effect of DA on odontoblastic differentiation of DPSCs and reparative dentin formation. DA stimulation promoted the odontoblastic differentiation of DPSC and induced tubular reparative dentin. These results suggest that DA produced by TH is involved in odontoblastic differentiation of DPSCs and has an inductive capacity for reparative dentin formation similar to primary dentin. This study may lead to the development of therapy to preserve vital pulp tissues.

研究分野：歯科保存

キーワード：直接覆髄 歯髄幹細胞 象牙芽細胞分化 ドーパミン

## 1. 研究開始当初の背景

2018年度の永久歯の抜歯原因調査において、抜歯となった歯は62.7%が失活歯であり、歯髄組織の保存は、将来的な歯の保存につながると考えられる。そのため、現在の歯科治療において、齲蝕除去時や歯冠破折による偶発的露髄が生じた際、歯髄を保存するために直接覆髄処置が推奨されている。現在臨床で頻用されている水酸化カルシウム製剤およびMTAセメントは、多孔性の骨様象牙質を形成する機会が多いため、十分な封鎖ができず、感染を起こして抜髄となるケースは少なくない(Al-Hezaimi et al., 2011)。そこで、本来の象牙細管構造を有した修復象牙質の形成を促進する新規直接覆髄材料の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化におけるTHの役割について解明し、その下流産物であるDAが象牙細管構造を有した修復象牙質形成を促す直接覆髄材料になりうる可能性について明らかにする、ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ヒト歯髄幹細胞の単離

プライマリーのヒト歯髄細胞から、歯髄幹細胞のマーカーとして報告のあるCD146 (Ma Let et al., 2021)を発現する細胞を磁気細胞分離装置にて単離する。単離した細胞の幹細胞特性について確認するために、幹細胞の表面抗原マーカー(CD29、CD90、CD105およびCD146)の発現をFlow cytometry法にて解析する。さらに、脂肪細胞や骨芽細胞などへの多分化能について、Oil Red O染色法、Alizarin Red S染色法およびそれぞれのマーカーとなる遺伝子発現解析を行う。これらの条件を満たした細胞をヒト歯髄幹細胞とする(DPSC細胞)。

### 象牙芽細胞様細胞におけるTHとDAの発現

当研究室で確立しているラット直接覆髄モデル(Yoshida et al., 2016)を用いてMTAセメントにて覆髄後、7、14、21日後に切片を作製した。その切片を用いて、抗TH抗体、抗DA抗体、抗Nestin抗体にて免疫組織化学染色を行う。

### THが歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化に及ぼす影響

DPSCを象牙芽細胞誘導培地にて培養し、THおよびTHによって合成されるDAの発現量をRT-PCR、Western Blotting法(WB法)、ELISA法にて調べる。THが高発現するDPSC細胞(DPSC-TH細胞)を作製する。THの遺伝子を導入したlentiviral vectorの作製し、HEK293T細胞を用いて産生したレンチウイルス粒子をDPSC細胞に感染させる。DPSC-TH細胞に発現させたTHが機能することを確認するため、THによって合成されるドーパミンの産生量をELISA法にて解析する。次に、DPSC-TH細胞またはempty vectorを導入した細胞(DPSC-Mock細胞)を象牙芽細胞誘導培地にて培養し、象牙芽細胞分化マーカー(DMP-1, DSPP, NESTIN)の発現について、RT-PCR法、WB法ならびに免疫細胞化学的染色法を用いて比較検討する。さらに、石灰化能についてAlizarin Red S染色法を用いて解析する。また、DPSCにおけるTHをノックダウンし、同様の解析を行う。

### ドーパミンがDPSCの象牙芽細胞分化および象牙質形成能に及ぼす影響

当研究室で確立しているラット直接覆髄モデル(Yoshida et al., 2016)に、ドーパミンを直接覆髄材料として応用する。まず、ラット上顎第一臼歯近心隅角部をラウンドバーにて点状露髄させる。次に、露髄させた部分にドーパミンを足場材であるnano-TCPと共に充填し、術後28日目に灌流固定を行う。CBCTを撮影し、硬組織形成能を確認する。その後切片を作製し、HE染色ならびに免疫組織化学染色(DMP-1, DSPP, NESTINおよびTH)を行い、象牙細管構造をもつ象牙質の形成について評価を行う。

## 4. 研究成果

### ヒト歯髄幹細胞の単離

歯髄幹細胞(DPSC)マーカーである CD146 陽性歯髄細胞における間葉系幹細胞 (MSC) マーカーの発現とその多能性を調べ、幹細胞としての特性を評価した。フローサイトメトリーにより、DPSC は MSC マーカーである CD29、CD90、CD105 を発現していた (図 1A、G)。しかし、CD34 や CD45 などの造血幹細胞マーカーは発現していなかった (Sup. 1B, H)。次に、DPSC の骨形成能と脂肪形成能の分化能を検討した。各分化培地で 4 週間培養したところ、Alizarin Red S (Sup. 1C, I) と Oil Red O (Sup. 1E, K) 染色の陽性領域が観察された。また、各分化培地で培養した DPSC では、骨形成および脂肪形成の分化マーカーの遺伝子発現が増加していた (Sup. 1D, F, J, L)。そこで、本研究では、CD146 陽性歯髄細胞を DPSC として使用した。

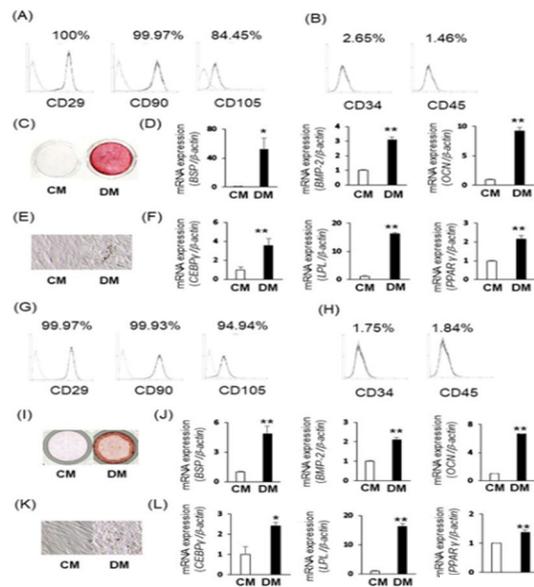


図 1

### 象牙芽細胞様細胞における Th と DA の発現

象牙芽細胞様細胞における Th と DA の発現を調べるため、ラット直接覆髄モデルを用いて、上顎第一大臼歯の Th、DA、Nestin の免疫組織化学染色を実施した。Nestin は象牙芽細胞分化マーカーとして使用した。直接覆髄後 3 日目では、修復象牙は認められず [図 2A (a, f, k)]。抗 Th [図 2A (b, g, l)]、DA [図 2A (c, h, m)]、Nestin [図 2A (d, i, n)] 抗体陽性細胞は覆髄部直下では検出されなかった。直覆後 7 日目には、部分的に修復象牙が生成した [図 2B (a, f, k)]。修復象牙質下の象牙芽細胞様細胞に Th [図 2B (b, g, l)]、DA [図 2B (c, h, m)] および Nestin [図 2B (d, i, n)] の発現が観察された。しかし、修復象牙質から離れた位置では、陽性細胞は認められなかった。さらに、覆髄後 21 日目には、修復象牙質の形成がほぼ完了し [図 2C (a, f, k)]。修復象牙質下の象牙芽細胞様細胞が抗 Th [図 2C (b, g, l)]、DA [図 2C (c, h, m)] および Nestin [図 2C (d, i, n)] 抗体で強陽性反応を示した。

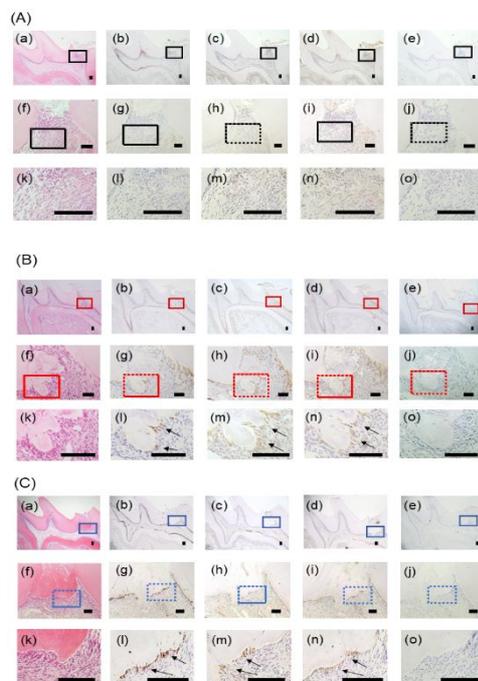


図 2

### TH が歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化に及ぼす影響

象牙芽細胞誘導培地(DM)で培養した DPSC では、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP、DMP-1、NESTIN の遺伝子発現が CM で培養した DPSC と比較して増加した (図 3A)。さらに、TH の発現量は、DM で培養した DPSC ではコントロールに比べて有意に高かった (図 3C)。さらに、CM または DM で 7 日間培養した DPSC の上清中の DA 濃度を ELISA を用いて測定した結果、DM で培養した DPSC の上清の DA 濃度は、CM で培養した DPSC よりも高かった (図 3D)。

TH-DPSC における TH の遺伝子およびタンパク質発現は、Mock-DPSC よりも高かった (図 4A)。また、Mock-DPSC と TH-DPSC の間で増殖能に差はなかった (図 4B)。DM で培養した TH-DPSC の Alizarin Red および von Kossa 染色陽性域は、DM で培養した Mock-DPSC に比べて著しく大きかった (図 4C、D)。さらに、DPSC における TH の過剰発現は、象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を促進した (図 4E)。次に、TH siRNA を TH-DPSC に導入した。WB および RT-PCR 分析により、TH siRNA を導入した TH-DPSC の TH 発現は、controlsRNA を導入した TH-DPSC よりも低いことを確認した (図 4F)。コントロール siRNA または TH-siRNA でトランスフェクトした TH-DPSC の間で、増殖能に差はない (図

4G) TH-DPSC における TH ノックダウンは、石灰化および象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を減少させた (図 4H、I)。

DA は TH を介して、チロシンから合成され、さらに TH の増加によりその産生量は増加する。Mock-DPSC と TH-DPSC における DA 産生を免疫細胞化学と ELISA で調べた結果、TH-DPSC の細胞内および培養上清における DA の産生量が Mock-DPSC に比べて、高かった (図 5)

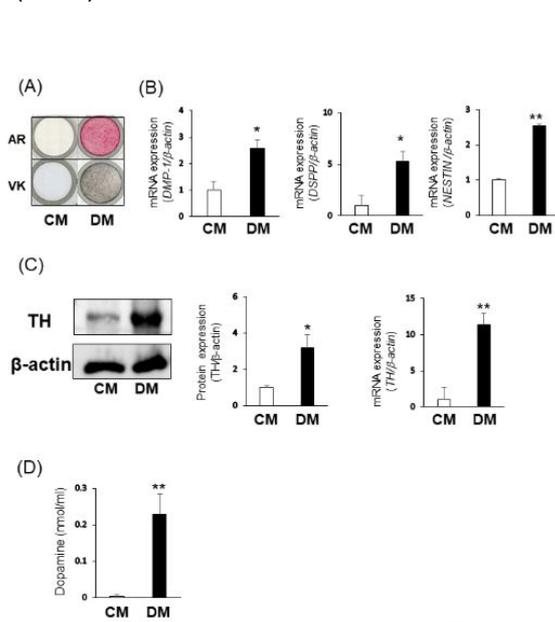


図 3

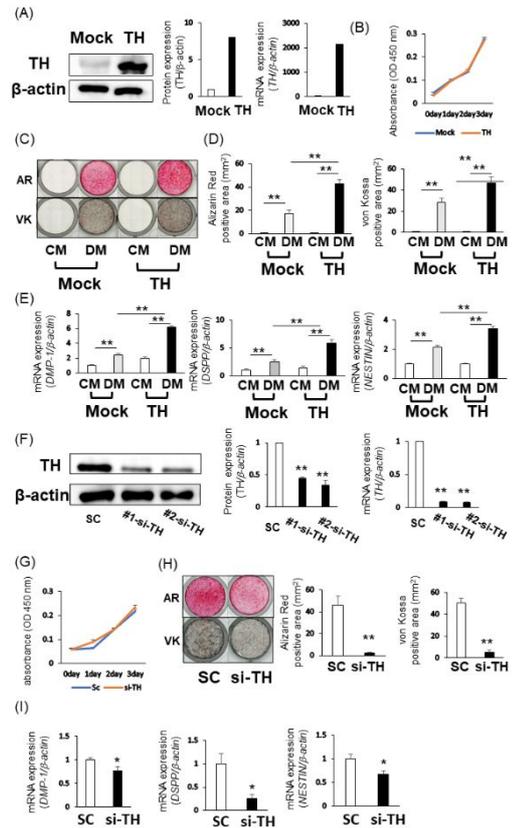


図 4

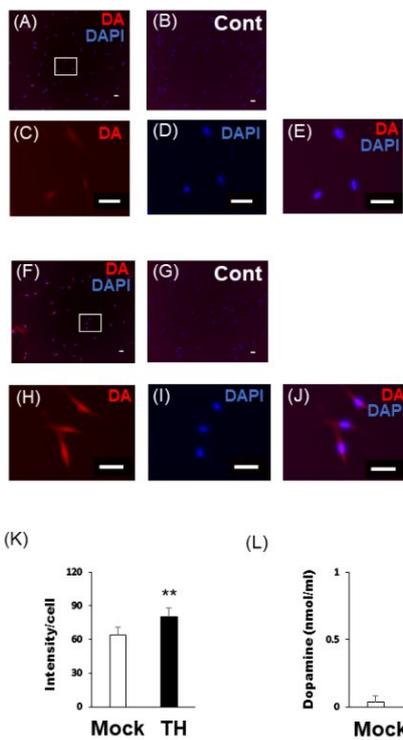


図 5

## ドーパミンが DPSC の象牙芽細胞分化および象牙質形成能に及ぼす影響

DA で刺激した DPSC の Alizarin Red S-および von Kossa- 陽性領域は、DM 群と比較して増加し、さらに 1  $\mu$ M DA 群において有意に増加していた (図 6 A, B)。同様に、象牙芽細胞分化マーカーの発現も、1  $\mu$ M DA 存在下で有意に増加した。

ラット直接覆髄モデルを用いて、1M の DA (DA 群) または PBS (Control 群) を含むナノ -リン酸三カルシウム (TCP)/コラーゲン足場でキャッピングした。術後 21 日目で、1 M DA 群では修復象牙質の形成が促進された。さらに、修復象牙質の形成量は、Control 群に比べ DA 群で有意に大きかった (図 6D-J)。DA 群は、露出した歯髄の表面を完全に封鎖し、象牙細管の構造を示す硬組織を示したが (図 6K-M) Control 群は象牙細管の構造を示さない欠陥のある硬組織を示した (図 7)。

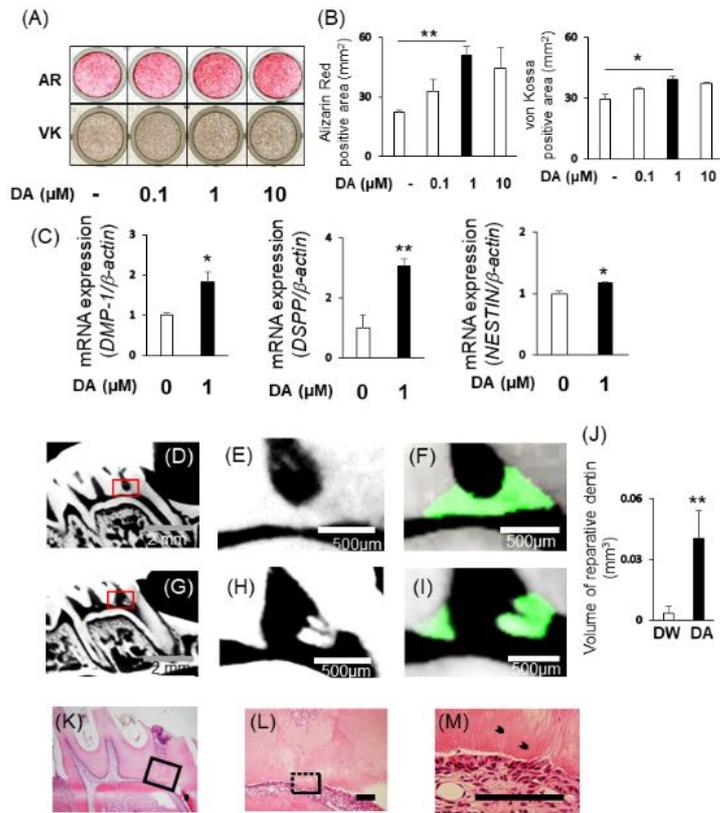


図 6

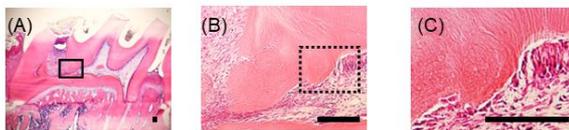


図 7

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 1件）

1. 著者名 Fujino S, Hamano S, Tomokiyo A, Sugiura R, Yamashita D, Hasegawa D, Sugii H, Fujii S, Itoyama T, Miyaji H, Maeda H	4. 巻 13
2. 論文標題 Dopamine is involved in reparative dentin formation through odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32126-1	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤野翔香, 濱野さゆり, 友清淳, 杉井英樹, 吉田晋一郎, 糸山知宏, 杉浦梨紗, 清島保, 前田英史
2. 発表標題 チロシン水酸化酵素は歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を促進する
3. 学会等名 日本歯科保存学会2021年度（秋季）学術大会（第155回）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤野翔香, 杉浦梨紗, 濱野さゆり, 友清淳, 山下大輝, 杉井英樹, 長谷川大学, 糸山知宏, 前田英史
2. 発表標題 ドーパミンは修復象牙質形成を促進する
3. 学会等名 第3回象牙質歯髄治療学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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