

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592863

研究課題名(和文) 組織培養法による歯髄再生モデルの確立と歯髄細胞の動態解析

研究課題名(英文) A study on the mechanisms of tissue wound healing and regeneration of dental pulp

研究代表者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA, KUNIHICO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30220718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、象牙質・歯髄複合体の修復再生過程における歯髄組織幹細胞/前駆細胞の動態と象牙芽細胞への分化機構を解明することである。直接覆髄後早期に、M2マクロファージが集積すること、また非コラーゲン性タンパク(osteopontin, dentin matrix protein 1)が沈着することが示された。一方、 $\alpha$ -smooth muscle actin陽性細胞が露髄部に出現し、その後象牙芽細胞様細胞に分化する可能性が示唆されるとともに、この過程に fibrillin-1の分解を伴うことが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate cellular events during pulp tissue wound healing and reparative dentin formation after direct pulp capping. M2 macrophage-associated molecule-expressing cells transiently accumulated beneath the exposure site. The deposition of osteopontin and dentin matrix protein 1 (DMP1) at exposed pulp sites preceded the appearance of nestin-immunoreactive cells, active cell proliferation and new matrix formation. These suggest that M2 macrophages participate in the initial phases of the healing and that osteopontin and DMP1 act as a trigger of pulp repair. In addition, numerous  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)-positive cells emerged at the wound margin, and the initially formed mineralized barrier was lined with  $\alpha$ -SMA-positive cells similar in appearance to reparative odontoblasts, some of which co-expressed nestin. Fibrillin-1 degradation and down-regulation might be implicated in the differentiation of  $\alpha$ -SMA-positive cells in this process.

研究分野：歯科保存学

キーワード：象牙質・歯髄複合体 歯髄組織幹細胞 直接覆髄 組織培養 象牙芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯髄はう蝕や修復処置などの様々な外来侵襲に対して修復・再生する能力を有しているが、そのメカニズム、特に歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導機構に関しては不明の点が多い。歯髄組織に存在する幹細胞/前駆細胞が様々な刺激に反応して増殖し、硬組織形成細胞へと分化すると考えられているが、このような幹細胞/前駆細胞が歯髄のどこに存在するのか、またどのようなメカニズムで創傷部に移動して硬組織形成細胞へと分化するのか未だ不明である。また一方では、歯髄細胞への遺伝子導入法や歯髄腔への幹細胞移入による歯髄・象牙質再生、さらに組織工学的手法を用いた歯の再生の試みも開始されているが、細胞の供給源や倫理的問題等、実用化には様々な問題が残されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、歯髄組織の有する自己修復・再生能力を賦活化する歯髄・象牙質再生療法開発のための基礎データを得ることを目的として、直接覆髄処置後の歯髄創傷治癒ならびに硬組織形成過程における歯髄細胞、特に歯髄組織幹細胞の動態、分化ならびに硬組織形成機構について免疫組織化学的、分子生物学的に検索する。また組織培養法による歯髄再生モデルを確立し、この系における歯髄組織の変化、特に細胞外マトリックスの変化について検索するものである。

### 3. 研究の方法

直接覆髄後の歯髄の創傷治癒、修復再生過程における組織修復 (M2) マクロファージマーカーならびに各種細胞分化・硬組織形成マーカーの発現、局在の変化について免疫組織化学的、分子生物学的に観察するとともに、組織培養法を確立し、この系における歯髄組織の変化について検討した。

#### (1) 直接覆髄処置後のマクロファージの動態観察

8週齢ラット臼歯にMTAによる直接覆髄処置を施し、一定期間経過後、灌流固定を行った。脱灰後、切片を作成し、HE染色ならびにCD68(汎マクロファージマーカー)、CD163(常在性マクロファージ、M2マクロファージマーカー)、CD204(抗ラットマクロファージスカベンジャー受容体; M2マクロファージマーカー)を用いた酵素抗体染色を行い観察した。

#### (2) 直接覆髄後の非コラーゲン性タンパクの局在

8週齢ラット臼歯に水酸化カルシウムによる直接覆髄処置を施し、同様に切片を作成し、硬組織形成・石灰化に関連する非コラーゲンタンパク、osteopontin (OPN) およびdentin matrix protein 1 (DMP-1) に対する酵素抗体染色を行い観察した。

#### (3) 直接覆髄処置後の $\alpha$ -SMA陽性細胞の動態と細胞外マトリックスの変化

矯正治療により抜去予定のヒト臼歯にMTAあるいは水酸化カルシウムによる直接覆髄処置を施し、一定期間経過後抜歯、浸漬固定・脱灰後、凍結切片を作成した。 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 陽性細胞ならびに細胞外マトリックス (fibrillin-1, fibronectin, decorin, tenascin-C) の局在性の変化について免疫組織化学的観察を行った。

#### (4) 歯髄組織培養法の確立とこの系における歯髄組織変化

抜去されたヒト健全歯から得られた歯髄組織を厚さ約1.5mmにスライスし、フィルター上で培養し、この系における $\alpha$ -SMA陽性細胞、fibrillin-1、およびMMP-3の発現について観察するとともに、MMP阻害剤の影響についても合わせて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 直接覆髄処置後のマクロファージの動態観察

CD68陽性細胞、CD163陽性細胞およびCD204陽性細胞は、術後1日より変性層直下に集積し始め、術後2-3日では顕著な集積像を呈した。その後、基質形成に伴い集積像が徐々に不明瞭となった。M2マクロファージは創傷治癒の初期過程で壊死組織の貪食やサイトカイン・成長因子の産生などを行うことにより、組織修復の進行に役割を演じると考えられており、これらの細胞が直接覆髄後早期に出現し、覆髄部直下の壊死層の処理および組織修復などに関与することが示唆された。

#### (2) 直接覆髄後の非コラーゲン性タンパクの局在

OPNおよびDMP-1陽性反応は6時間から歯髄変性層直下に認められ、5日後では線維性基質とほぼ一致して強い反応が確認された。また7日、14日後では被蓋硬組織の表層に陽性反応が認められたが、細管を有する象牙質様基質では反応が観察されなかった。一方、nestin陽性細胞は術後3日から変性層下に出現し、5日後では線維性基質直下に配列するとともに、その下層にも分布していた。7日、14日後では被蓋硬組織直下にnestin陽性の象牙芽細胞様細胞の配列が観察された。OPNおよびDMP-1が象牙芽細胞様細胞の分化および被蓋硬組織形成過程の発動に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

#### (3) 直接覆髄処置後の $\alpha$ -SMA陽性細胞の動態と細胞外マトリックスの変化

覆髄部に $\alpha$ -SMA陽性細胞が集積し、その一部にnestin陽性反応が認められた。線維性基質が形成されると $\alpha$ -SMA陽性細胞は象牙芽細胞様の形態を示すとともに、nestin強陽

性を示した。一方、細管構造を有する象牙質様基質直下の新生象牙芽細胞様細胞は nestin 陽性を示していたが、 $\alpha$ -SMA の発現は認められなかった。

一方、健全歯髄において各細胞外マトリックスは一様に分布していたが、直接覆髄後、fibrillin-1 に対する免疫陽性反応が局所的に消失した。fibronectin, decorin, および tenascin-C の分布に変化は観察されなかった。

(4) 歯髄組織培養系における  $\alpha$ -SMA 陽性細胞, fibrillin-1, MMP-3 の発現

歯髄組織を培養すると  $\alpha$ -SMA 陽性を示す細胞が多数出現する一方、fibrillin-1 の免疫染色性および mRNA の発現が低下することが示された。一方、MMP-3 mRNA の発現が亢進していたが、MMP 阻害剤を添加すると fibrillin-1 の免疫反応性の向上が観察された。

以上の結果から  $\alpha$ -SMA 陽性が象牙芽細胞様細胞に分化する可能性が示唆されるとともに、この過程に fibrillin-1 の分解を伴うことが明らかにされた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Shigetani Y, Yoshihisa K, Takei E, Yoshihisa N, Yamanaka Y, Ohshima H, Okiji T: Temporospacial localisation of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *Int Endod J* 48(6):573-581, 2015. doi: 10.1111/iej.12351 (査読有)

Takei E, Shigetani Y, Yoshihisa K, Hinata G, Yoshihisa N, Okiji T: Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. *J Endod* 40(12):1983-1988, 2014. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.012 (査読有)

吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 重谷佳見, 武井絵梨花, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史: ヒト歯髄創傷治癒過程における細胞外基質の局在変化-Fibrillin-1 基質の動的リモデリングに関する検索-。日歯保存誌 56(3): 161-168, 2013。(査読有)

Hosoya A, Yukita A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Kasahara E, Nakamura H: Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. *Histochem Cell Biol*.

140(2): 201-211, 2013. doi: 10.1007/s00418-013-1076-y (査読有)  
Shigetani Y, Suzuki H, Ohshima H, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Okiji T: Odontoblast response to cavity preparation with Er:YAG laser in rat molars: an immunohistochemical study. *Odontology* 101(2):186-192, 2013. doi: 10.1007/s10266-012-0078-x (査読有)

Hosoya A, Yukita A, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Takahashi M, Nakamura H: Two distinct processes of bone-like tissue formation by dental pulp cells after tooth transplantation. *J Histochem Cytochem* 60(11): 861-873, 2012. doi: 10.1369/0022155412459741 (査読有)

Yoshihisa N, Yoshihisa K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of  $\alpha$ -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol* 138(4): 583-592, 2012. doi: 10.1007/s00418-012-0978-4 (査読有)

Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshihisa K, Yoshihisa N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H: Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137(6): 733-742, 2012. doi: 10.1007/s00418-012-0928-1 (査読有)

[学会発表](計19件)

Yoshihisa K, Takei E, Edanami N, Hinata G, Yoshihisa N, Shigetani Y, Okiji T: Reparative dentinogenesis after pulp-capping with a light-cured calcium silicate-based material. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 13, 2015.

Yoshihisa N, Yoshihisa K, Ohkura N, Takei E, Edanami N, Oda Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Fibrillin-1 degradation and myofibroblasts induction in cultured human dental pulp. 93rd General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 13, 2015.

Takei E, Yoshihisa K, Edanami N, Hinata G, Yoshihisa N, Shigetani Y, Okiji T: M2-macrophage accumulation after pulpotomy with a light-cured resin-modified calcium-silicate material. 93rd

General Session & Exhibition of the IADR, Boston, USA, March 12, 2015.  
Takei E, Shigetani Y, Yoshiba K, Hinata G, Yoshiba N, Okiji T: Transient accumulation of M2 macrophages after pulpotomy with calcium silicate-based materials in rat molars. 日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会(第 141 回), 2014 年 10 月 30 日, 山形テルサ(山形市)  
細矢明宏, 二宮 禎, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中塚美智子, 中村浩彰: 象牙芽細胞分化における Bmi-1 の機能. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 27 日, 福岡国際会議場(福岡市)  
武井絵梨花, 重谷佳見, 吉羽邦彦, 日向剛, 吉羽永子, 興地隆史: ラット臼歯における Mineral Trioxide Aggregate による直接覆髄後の M2 マクロファージの動態. 第 47 回新潟歯学会総会, 2014 年 4 月 19 日, 新潟大学歯学部(新潟市)  
武井絵梨花, 重谷佳見, 吉羽邦彦, 日向剛, 吉羽永子, 興地隆史: ラット臼歯における Mineral Trioxide Aggregate による直接覆髄後の M2 マクロファージの動態. 日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会(第 139 回), 2013 年 10 月 17 日, 秋田県総合生活文化会館(秋田市)  
吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史: ヒト歯髄組織から outgrowth する細胞による組織構築に関する研究. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20-22 日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)  
細矢明宏, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男: 皮下移植歯の歯髄腔内に形成される骨様組織の由来. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20-22 日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)  
細矢明宏, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男, 中村浩彰: ラット臼歯皮下移植後の歯髄腔内に出現する骨芽細胞様細胞. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第 138 回), 2013 年 6 月 27, 28 日, 福岡国際会議場(福岡市)  
Yoshiba K, Yoshiba N, Shigetani Y, Okiji T: Immunolocalization of osterix during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with MTA. The 9th World Endodontic Congress, Tokyo International Forum (Tokyo), May 23-26, 2013.  
Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Alpha-SMA and STRO-1 during wound healing of

human dental pulp. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, WA, USA, March 23, 2013.  
Yoshiba K, Shigetani Y, Yamanaka Y, Takei E, Yoshiba N, Okiji T: Ultrastructural and compositional changes of MTA implanted in connective tissue. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, WA, USA, March 21, 2013.  
Takei E, Shigetani Y, Yoshiba K, Hinata G, Yoshiba N, Okiji T: Distributional changes of macrophage-subpopulations in rat molars pulp-capped with MTA. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, WA, USA, March 21, 2013.  
Hosoya A, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Nakamura H: Origin of Bone-like Tissues in dental pulp after tooth transplantation. 60th Annual Meeting of JADR, Niigata Convention Center (Niigata), December 14-15, 2012.  
吉羽邦彦, 重谷佳見, 山中裕介, 武井絵梨花, 吉羽永子, 興地隆史: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) の生体内組成変化と生体機能性. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012 年 11 月 9, 10 日, 大阪国際会議場(大阪市)  
細矢明宏, 雪田 聡, 二宮 禎, 平賀徹, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰: 分化直後の象牙芽細胞に局在する SUMO 化修飾因子と Osterix. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会. 2012 年 9 月 15 日, 奥羽大学(郡山市)  
武井絵梨花, 重谷佳見, 吉羽邦彦, 日向剛, 吉羽永子, 興地隆史: ラット臼歯における Mineral Trioxide Aggregate による直接覆髄後のマクロファージ系細胞の動態解析. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会(第 136 回), 2012 年 6 月 28, 29 日, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)  
細矢明宏, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男, 中村浩彰: 象牙芽細胞分化過程における SUMO 化修飾因子と Osterix の局在. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会(第 136 回), 2012 年 6 月 28, 29 日, 沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA, Kunihiro)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：30220718

### (2) 研究分担者

吉羽 永子 (YOSHIBA, Nagako)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：10323974

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：