

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592868

研究課題名(和文) Wntシグナルを標的とした生体由来成分を用いた直接覆髄材の開発

研究課題名(英文) The development of direct pulp capping materials using biological agent

研究代表者

藤井 理史 (Fujii, Masashi)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：10284217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：局所に炎症が起こると様々なサイトカインや増殖因子が分泌され創傷治癒を誘導する。その中で、Wntタンパク質は皮膚などの創傷治癒促進因子の一つである。本研究では、炎症惹起後Wnt依存性シグナルが長期に継続する遺伝子改変マウス臼歯に実験的露髄面を作成し歯髄組織に炎症を惹起し、歯髄組織の創傷治癒におけるWntシグナルの重要性について検討した。遺伝子改変マウス群ではコントロール群と比較して歯髄組織の創傷治癒が促進し、形態学的に骨様であり免疫組織学的には象牙質様の新生象牙質の形成が認められた。これら結果より、内在性Wntシグナルの増強は歯髄組織の治癒を促進させる新たな治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Various cytokines and growth factors induce wound healing during inflammatory responses. Wnts are known to enhance skin wound healing. In this study, we utilized gene-modified mice in which Wnts signal is prolonged during inflammatory responses. We experimentally exposed the molars of these mice to evoke pulpal tissue inflammation to analyze the importance of Wnt signal during pulpal tissue inflammation. The wound healing responses of pulpal tissues in the molars of these gene-modified mice were enhanced compared with that of control mice. The regenerated hard tissues in these gene-modified mice were morphologically bone-like structure and immunohistochemically dentin-like tissues. These results indicated the development of methods to enhance endogenous Wnt signal in pulpal tissues could be contribute for generating biological materials for direct pulp capping.

研究分野：保存修復

キーワード：歯髄 直接覆髄 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

臨床の場において、う蝕除去時のスポット状や不顕性露髄、または生活歯窩洞形成時の露髄など、直接覆髄により歯髄保護が行われるケースは多い。直接覆髄は術中の無菌的操作の可否、止血の有無、露髄径、患者の年齢等が予後を左右する。早期に創傷治癒機転を働かせ、さらに露髄面表面に積極的に被蓋硬組織を形成できれば、直接覆髄の適応が広がるとともに、予知性も高まり、歯髄保護処置により抜髄を回避できるケースが増えると思われる。これまで、水酸化カルシウム製剤が多用され、現在では露髄表面にレジンで直接充填する方法も増え、また更に最近では、無機物酸化物の複合体である Mineral trioxide aggregate (MTA)が直接覆髄材として用いられている。水酸化カルシウム製剤はその硬組織誘導能から長期に渡り使用されているが、辺縁封鎖性の低さから、それ単体での裏層・覆髄は困難である。レジンは以前指摘されていたような、歯髄為害性は非常に少なくなり、歯質への強固な接着により、症例・歯科医師によっては水酸化カルシウム製剤より多用されている。しかし、レジンによる創傷治癒機転の促進並びに積極的硬組織誘導能は報告されていない。また、新たに覆髄材として用いられている MTA は、硬化時に形成される水酸化カルシウムにより硬組織誘導すると考えられており、露髄面下に一層の壊死層を形成後に硬組織が誘導されるメカニズムは、水酸化カルシウム製剤に類似している。MTA は比較して良好な予後成績から広まりつつあるが、その操作性の困難さ、硬化時間が長いなどの問題が残る。水酸化カルシウム製剤と MTA はその高い pH から抗炎症作用を持つものの、露髄を歯髄の機械的損傷と捉えれば、これまで臨床応用されている材料に積極的な創傷治癒機転を誘導する物は無い。このような背景から本研究では Wnt シグナリングに着目し、露髄により受傷した歯髄組織の創傷治癒を積極的に誘導しつつ、早期の被蓋硬組織形成を促す覆髄材の開発を目的とする。Wnt を用いた直接覆髄材の開発は、昨今、歯科・医科の様々な分野に広がる成長因子を用いた治療法の一つとして、将来的に世間に広く認知され、受け入れられる治療法となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、骨・皮膚などにおいて高い創傷治癒効果を発現する Wnt シグナリングの歯髄組織への効果を検討し、Wnt シグナリングに焦点を当てた高い組織修復能を持つ覆髄材の開発を最終目的とした基礎研究を行う。受傷時には内在性 Wnt シグナリングが活性化されるが、この活性化が延長されることが知られている遺伝子改変マウス (Axin2 欠損マウス) を用いた予備実験において、実験的露髄面周囲に骨・象牙質様組織が積極的に誘導される結果が得られている。この結果から、

歯髄組織が高い Wnt シグナリング反応性を持つことが示唆される。本研究では、この遺伝子欠損マウスを用いた実験を進め、歯髄組織が如何にして Wnt に反応し創傷治癒機転を促進させるのかを解明する。更に、マウスやラットにおける実験的露髄歯に高活性リポソーム結合リコンビナント Wnt タンパクを投与し、その覆髄効果を解析し将来的な臨床応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験プロトコルの申請

本実験計画では、Axin2 欠損マウス及びコントロールとしての野生型マウスと、高活性のリポソーム結合リコンビナント Wnt タンパク填塞実験用のマウスおよびラットを使用予定である。

(2) マウス実験的露髄面の作成

Axin2 欠損マウス及びコントロールマウスへの実験的露髄面の形成は、0.05cm 径のカーバイドバー (NTI Carbide Burs, Axis Dental Corp) を用いる。

(3) マウス組織切片の作成並びに解析

それぞれのタイムポイントで得られた第一臼歯を上顎骨ごと取り出し、仮封セメントの脱落が無いことを確認した後に、4%パラフォルムアルデヒドで 24 時間固定した後、EDTA 脱灰を行う。

(4) ラット実験的露髄面の作成

ラットはマウスと比して大きく定量的解析に向くため、リポソーム結合リコンビナント Wnt タンパクの露髄面への填塞実験にはマウスで解析が困難な場合はラットを用いる。切削による炎症変化並びにその後の硬組織形成過程を、ヘマトキシリン・エオシン染色にてタイムポイントを追って観察する。また、露髄面に被蓋硬組織が得られた場合は、マウスと同様にそれが骨であるのか象牙質であるのかを (DSP) Dentin sialoprotein 及び Dentin matrix protein-1 に対する特異抗体を用いた免疫染色で検討する。また、修復象

牙質は免疫組織学的に骨様であることが多く、石灰化程度は原生象牙質に比較し高くないと言われている。そこで、マイクロCTを用いて形成された新生硬組織量を定量すると共にその石灰化度も計測する。

4. 研究成果

本研究は、Axin2 欠損マウスに実験的露髄を作成し、Wnt シグナリングが継続することが如何にして硬組織新生を伴う歯髄組織再生をもたらすのかを解析すること、続いて、ラットに同様の実験的露髄を作成し、高活性のリポソーム結合リコンビナント Wnt タンパク充填による創傷治癒促進、硬組織誘導能を定量的に評価し、直接覆髄材としての使用を目指すことを目標として基礎的検討を行った。

炎症惹起後 Wnt シグナリングが継続することが知られている Axin2 欠損マウスの第一臼歯咬合面に実験的露髄面を形成することにより、コントロールマウスと比較して歯髄組織の創傷治癒促進が認められた。Axin2 欠損マウスでは受傷後 1 日において、周囲組織残存細胞で Wnt 反応性が上昇し、それら Wnt 反応性細胞が受傷部周囲から遊走・浸潤し、受傷部に定着していることが増殖マーカー ki67 染色で明らかとなった。さらに、受傷後 10 日以降になると、Axin2 欠損マウスにおいては、受傷組織を閉鎖するように新生硬組織の再生を認めたが、コントロールマウスにおいてはほとんど認められなかった。この新生象牙質を形態学的に観察すると、象牙細管の走行は不明瞭であり、埋入された骨細胞様細胞を認めたことから、形態学的には骨に近い硬組織が再生されていた。一方で、興味深いことに新生硬組織は、象牙質特異抗体 DSP に強陽性であり、原生象牙質よりも強い染色を示す箇所も認められたことから、含有有機質の構成からみると象牙質であることが示唆された。つまり、新生硬組織は骨および象牙質双方の表現型を持つことが明らかとなった。マイクロCT による解析より、新生硬組織の石灰化度は原生象牙質と同程度であった。同様の手技で露髄させた遺伝子改変でない通常マウス臼歯の露髄面に Wnt3A タンパク質を投与すると、コントロール群と比較して優位な硬組織再生を認めた。この結果は、Axin2 欠損で内在性 Wnt シグナルを増強させた際に得られた知見を補完するのみでなく、外来性投与で創傷治癒が誘導されたことから、将来的な臨床応用の可能性がより広がったと考えられる。実験計画にあったラット実験的露髄面の作製もマウスと同様に行っ

たが、まずマウスで良好な結果が得られたために、そちらを優先して解析・検討した結果、実験期間内で結論を導き出すには至らなかった。本研究は Dr. Jill Helms (Stanford University) との共同研究で行われた。

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)

1. (原著論文) Hunter D.J., Bardet C., Mouraret S., Liu B., Singh G., Sadoine J., Dhamdhare G., Smith A., Tran X.V., Joy A., Rooker S., Suzuki S., Vuorinen A., Miettinen S., Chaussain C., and *Helms J.A. Wnt Acts as a Pro-Survival Signal to Enhance Dentin Regeneration. *J Bone Miner Res.* Accepted 2015 (査読あり)
2. (原著論文) *Suzuki, S., Kobuke, S., Haruyama, N., Hoshino, H., Kulkarni, A. B., and Nishimura, F. Adhesive and migratory effects of phosphophoryn are modulated by flanking peptides of the integrin binding motif. *PLoS One.* (2014) Nov 14;9(11):e112490. doi: 10.1371/journal.pone.0112490. eCollection 2014. (査読あり)
3. (原著論文) *Suzuki, S., Nagayasu, S., Arakawa, M., Kobuke, S., Hoshino, H., Hashikata, T., Motoyama, T., and Nishimura, F. The effects of matrix trioxide aggregate (MTA) on the adhesion, migration and apoptosis of dental pulp cells *The Japanese Journal of Conservative Dentistry* Accepted 2014 (査読あり)
4. (総説) *鈴木茂樹 バイオリジカルな歯髄創傷治癒誘導-SIBLING ファミリー- 歯界展望 2014-7 Vol. 124 No. 1 2014 (査読なし)
5. Hashikata, A., Yamashita, A., Suzuki, S., Nagayasu, S., Shinjo, T., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakai, Y., Nin, K., Watanabe, N., Asano, T., Abiko, Y., Kushiyama, A., Nagasaka, S., and *Nishimura, F. The

Inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. (2014) 29(3):611-618. 査読有

6. Suzuki, S., and *Kulkarni, A. B. Lessons Learned from Mouse Models of DSPP, DSP, and DPP. Bentham Science Publishers. (2012) (10):221-230 (査読なし).
7. *Suzuki, S., Haruyama, N., Nishimura, F., and Kulkarni, A. B. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. Arch Oral Biol. (2012) 57(9):1165-1175. 査読有
8. Nagayasu, S., Suzuki, S., Yamashita, A., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakai, Y., Nin, K., Watanabe, N., Nagasaka, S., Yabe, D., and *Nishimura, F. Smoking and adipose tissue inflammation suppress leptin expression in Japanese obese males: potential mechanism of resistance to weight loss among Japanese obese smokers. Tob. Induc. Dis. (2012) 10.1186/1617-9625-10-3. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木茂樹

第 138 回日本歯科保存学会 シンポジウム I
「若手研究者が描く Pulp Wound Healing & Regeneration」講演タイトル: 内在性 Wnt による歯髄創傷治癒促進効果と Dentin Phosphoprotein による硬組織形成作用の検討
平成 25 年 6 月 27 日 福岡国際会議場

〔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

藤井 理史 (FUJII MASASHI)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号: 1 0 2 8 4 2 1 7

(2) 研究分担者

鈴木 茂樹 (SUZUKI SHIGEKI)

広島大学・大学院医歯薬学保健学研究院・助教

研究者番号: 3 0 5 4 9 7 6 2