

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462979

研究課題名(和文)熱ショックタンパク質誘導剤を用いた生物学的覆髄法の確立

研究課題名(英文)Establishment of biological direct pulp capping method with the agent inducing HSPs

研究代表者

諸富 孝彦 (Morotomi, Takahiko)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10347677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物学的覆髄を可能とする治療法の確立を目指して、新規覆髄システムの検討を行った。まず覆髄時に必須の歯髄組織の耐性向上に果たすHSP70の重要性を確認し、HSP70誘導剤による覆髄法の可能性を示した。また歯髄細胞の炎症応答時の挙動の解析を行った上で、新規歯髄消炎剤の開発とその可能性について解析した。さらに覆髄後、歯髄活性を保ちながら咬合圧に耐え、十分な封鎖性を維持できる質および量の象牙質様硬組織の形成誘導法について検討し、ヒト多血小板血漿や生体活性ガラスの応用について重要な知見を得ることができた。以上より歯髄の有する自然な象牙質-歯髄複合体の発生・修復過程を再現する覆髄法確立に重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is establishment of the therapy that makes a biological direct pulp capping. At first, we identified the crucial role of the heat shock protein (HSP) 70 to protect against various stimulus in cells derived from pulp and this results suggests the possibility of HSP70 inducer for direct pulp capping. Next, we investigated inflammatory response mechanism of pulp cells and potential of novel anti-inflammatory agent for pulp cells. Furthermore, we evaluated several methods to induce regenerated dentin formation with proper quality and quantity. We found that platelet-rich plasma and bioactive glass enhance hard tissue formation as well as differentiation of odontoblastic cells.

As mentioned above, we obtained evidence about the capability of the biological pulp capping method in a series of the studies.

研究分野：歯科保存学

キーワード：直接覆髄 heat shock protein 歯髄 炎症 象牙質形成

1. 研究開始当初の背景

歯髄は歯の知覚、栄養、免疫応答、そして修復など歯の向上性維持に重要な働きを担っていることは広く知られており、健全な歯を維持する上で歯髄の保存は重要である。そのため今日では、齲蝕や外傷に晒された歯の歯髄は可能な限り水酸化カルシウム製剤に代表される高 pH の薬剤・材料を用いた覆髄法を用いて保存される。しかし歯髄は周囲を硬組織に囲まれた応答性の低い組織であるため壊死に陥りやすく、現在の歯髄温存療法による歯髄保存効果は十分とは言えない。また、高 pH の薬剤・材料を使用することで覆髄部下層には第三象牙質が形成されることで歯髄腔は狭窄し活性が低下するうえ、形成される象牙質様硬組織は多孔性のため封鎖性に乏しいとの報告がなされている。そのため、歯髄の有する自然な象牙質-歯髄複合体の発生・修復過程を再現することが可能な「生物学的覆髄」を可能とする治療法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

高 pH による抗菌性と歯髄刺激の結果として歯髄に第三象牙質の形成を促す現在の覆髄法に代わり、歯髄細胞の有する耐性を高めた上で、歯の発生過程と同様の自然な細胞分化や象牙質基質の分泌・石灰化を促進する生物学的覆髄法を開発することを本研究の目的とした。この方法の確立により過剰な髄腔の狭窄を避け、咬合圧に耐え再感染を防ぐに必要十分な量と質の象牙質形成を誘導することが可能となり、健全な歯髄の保存と、それに伴い長期にわたる健全な歯の保存を可能とすることが期待できる。

3. 研究の方法

生物学的覆髄剤の開発を行う上で必要なのは、単一の薬剤開発のみに焦点を当てることなくトータルシステムとしての生物学的覆髄法の検討である。そのため本研究では覆髄時に必要とされる歯髄組織の耐性向上、歯髄の炎症応答の制御、必要十分な量および質の象牙質様硬組織の形成誘導法の全てを網羅した研究を計画し実施した。実験は倫理的な背景を考慮し、細胞培養法を用いた *in vitro* での研究を主体として進めた。

歯髄組織の耐性向上: 効率的かつ確実な歯髄組織の耐性誘導とそのメカニズムを解析するため、以前に報告した 41 の軽度熱刺激を細胞に加える方法を応用し、解析を行った。

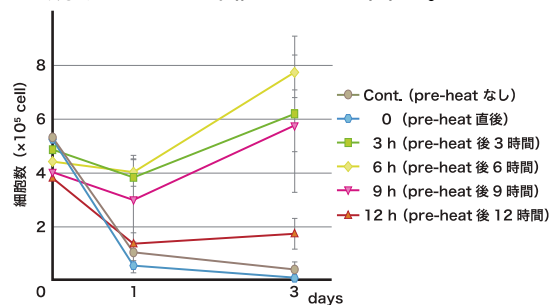
歯髄の炎症応答の制御: ラット歯髄由来象牙芽細胞様細胞へ炎症性サイトカインによる刺激を加え、歯髄由来細胞の炎症応答時の挙動とそのメカニズムを解析した。ま

た、新たな歯髄炎に対する消炎剤として Macromolecular Translocation Inhibitor (MTI-) の可能性についても解析した。必要十分な量および質の象牙質様硬組織の形成誘導法: 熱ショックタンパク質 (HSP) 70 誘導剤適用後の硬組織形成誘導を補完するために、積極的な象牙質形成誘導を促進する各種の方法を *in vitro* および *in vivo* 研究にて検討した。ボランティアより採取したヒト多血小板血漿 (PRP) を歯髄由来細胞へ適応し、その後の細胞増殖能や硬組織形成能について確認した。また生理活性ガラス (Bioactive glass: BAG) のもつ硬組織形成能を歯髄由来細胞により確認したうえ、ラットの上顎第一臼歯の露髄面を BAG 製剤により覆髄し、その効果を確認した。

4. 研究成果

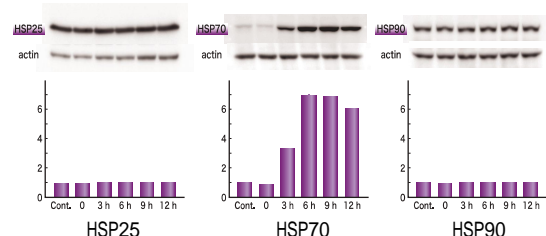
歯髄組織の耐性向上

歯髄由来細胞の耐性誘導に HSP70 の果たす役割: 象牙芽細胞様細胞に 41、12 時間の長期間にわたる軽度熱刺激を与えることで致死的な熱刺激に対する耐性を細胞に誘導することができ、その際に代表的な HSPs である HSP25 (HSP27)、HSP70、および HSP90 の発現が増強していることを報告したが、さらに研究を継続することで、41 で 20 分間という短期の軽度熱刺激であっても、その後 3~9 時間の間は致死的な熱に対する耐性を有し続けることが確認された【図 1】。



【図 1】41、20 分間の軽度熱刺激後の致死的な熱時隙への耐性獲得

この際、HSP70 の発現量が顕著に上昇する一方、HSP25 および HSP90 の発現量に変化は見られなかった。以上の結果より、歯髄由来細胞の耐性向上には種々の HSPs のうち HSP70 が深く関与することが示唆された【図 2】。



【図 2】41、20 分間の軽度熱刺激後 HSPs の発現

歯髄の炎症応答の制御

-1) 炎症反応時の歯髄由来細胞の挙動とそのメカニズム

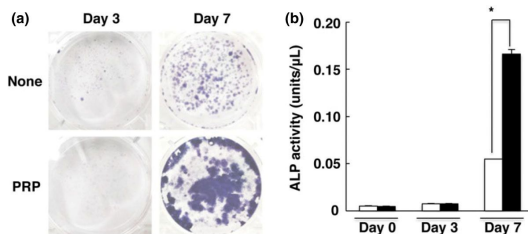
歯髄組織の炎症応答をコントロールする上で解明すべき炎症応答時の歯髄由来細胞の挙動メカニズムを明らかにするため、炎症性サイトカインである IL-1 および TNF- α 刺激に対する歯髄由来細胞の応答について検証した。その結果、IL-1 および TNF- α は象牙芽細胞様細胞の象牙質基質タンパク質の産生量を増加させ、さらに IFN- γ 投与によりこれらの発現を著しく抑制することが確認された。

-2) 歯髄消炎剤としての MTI- の可能性

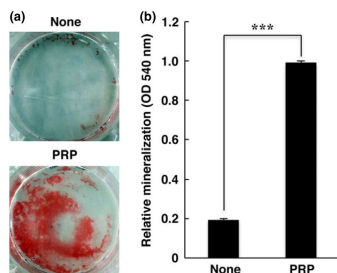
MTI- は炎症応答において主要な役割を果たす NF- κ B を阻害する核タンパク質である。TNF- α を歯髄由来細胞に作用させ炎症状態を再現した上で MTI- を投与すると、NF- κ B の転写活性を低下させ、歯髄炎の制御を可能とすることが示唆された。

必要十分な量および質の象牙質様硬組織の形成誘導法

-1) ヒト多血小板血漿 (PRP) の象牙質形成誘導能の解析：歯髄由来細胞に PRP を応用することで、象牙芽細胞様細胞への分化を誘導し、アルカリフォスファターゼ活性の上昇と石灰化結節の形成促進が確認され、PRP は象牙質様硬組織の形成誘導能を有する事が示唆された【図3, 4】。



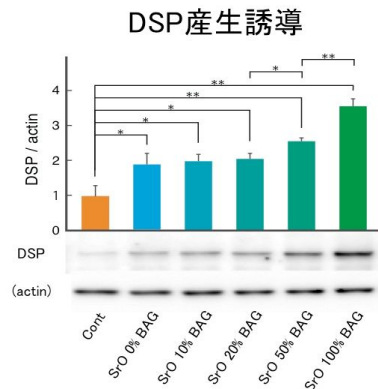
【図3】ヒト PRP による ALP 活性誘導能



【図4】ヒト PRP による石灰化結節形成能

-2) 生体活性ガラスによる象牙質誘導能：骨補填材として臨床応用されている生体活性ガラスの象牙質形成誘導能を確認したところ、生体活性ガラス溶解液は有意に象牙芽細胞様細胞において、象牙質基質である DSP および DMP-1 の発現を促進することが確認さ

れた。また、BAG の CaO_2 を SrO_2 に置換した Sr-BAG では、さらに誘導能が向上することが確認された【図5】。さらに、ラット上顎第一臼歯露髄面に BAG を基質とする材料を貼付すると、水酸化カルシウム製剤を用いたものと比較し炎症細胞の浸潤が少なかったことから、BAG は新規 HSP70 誘導剤を応用した覆髄材の基質として有用であることが示唆された。



【図5】Sr-BAG による DSP 産生誘導能

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14件)

- 1). 松本典祥, 水上正彦, 春名千英子, 諸富孝彦, 泉利雄, 阿南壽: 破壊されたラット根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain gel[®] の効果の解明. 日歯内療誌. 34(1): 22-28, 2013.
- 2). 畠山純子, 畠山雄次, 春名千英子, 松本典祥, 諸富孝彦, 泉利雄, 沢禎彦, 笹野泰之, 阿南壽: Leucine rich Amelogenin peptide による軟骨形成の誘導. 日歯保存誌. 56(6): 560-569, 2013.
- 3). Morotomi T, Kitamura C, Okinaga T, Nishihara T, Sakagami R, Anan H: Continuous fever-range heat stress induces thermotolerance in odontoblast-lineage cells. Arch of Oral Biol. 59(7): 741-748, 2014.
- 4). Hirata-Tsuchiya S, Fukushima H, Katagiri T, Ohte S, Shin M, Nagano K, Aoki K, Morotomi T, Sugiyama G, Nakatomi C, Kokabu S, Doi T, Takeuchi H, Ohya K, Terashita M, Hirata M, Kitamura C, Jimi E: Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF- κ B via an interaction with Smad4. Mol Endocrinol. 28(9): 1460-1470, 2014.
- 5). 諸富孝彦, 田畑泰彦, 阿南壽, 西原達次, 北村知昭: 歯髄の創傷治癒と局所的再生療

- 法：その背景と展望 . 歯界展望 . 124(No.1, 2014-7): 95-99, 2014.
- 6). 永吉雅人, 吉居慎二, 角館直樹, 福泉隆喜, 末松美希, 平田-土屋志津, 鷺尾絢子, 西野宇信, 矢野淳也, 諸富孝彦, 北村知昭: 歯内治療における術後疼痛の発症に関わる要因の解析 . 日歯保存誌 . 57(5): 407-413, 2014.
 - 7). Matsumoto N, Minakami M, Hatakeyama J, Haruna C, Morotomi T, Izumi T, Anan H: Histologic Evaluation of the Effects of Emdogain Gel on Injured Root Apex in Rats. J Endod. 40(12):1989-1994, 2014.
 - 8). Nakagawa A, Okinaga T, Ariyoshi W, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T: Effect of interferon- on the odontoblast differentiation and mineralization in odontoblast-like cells. Inflamm Regen. 35(4), 210-217, 2015.
 - 9). Morotomi T, Tabata Y, Kitamura C: Dentin-pulp complex regeneration therapy following pulp amputation. Adv Tech Biol Med. 3: 153. doi: 10.4172/2379-1764. 1000153, 2015.
 - 10). 諸富孝彦: 歯髄細胞の刺激耐性および象牙芽細胞分化を誘導する方法の検討 - 断髄後の象牙質-歯髄複合体再生療法の確立を目指して . 日歯保存誌 . 58(6): 443-445, 2015.
 - 11). 吉居慎二, 西野宇信, 末松美希, 諸富孝彦, 北村知昭: ファイバーポストの導光性が根管深部コンポジットレジンとの重合に与える影響 . 日歯保存誌 . 59(1): 40-46, 2016.
 - 12). Yeom K, Ariyoshi W, Okinaga T, Washio A, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T: Platelet-rich plasma enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts. Int Endod J. 49(3): 271-278, 2016.
 - 13). Morotomi T, Hirata-Tsuchiya S, Washio A, Kitamura C: Effects of 4-META/MMA-TBB Resin at Different Curing Stages on Osteoblasts and Gingival Epithelial Cells. J Adhes Dent. 18(2): 111-118, 2016.
 - 14). Nakayama K, Hirata-Tsuchiya S, Okamoto K, Morotomi T, Jimi E, Kitamura C: The Novel NF- B Inhibitor, MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug, Suppresses Inflammatory Responses in Odontoblast-Like Cells. J Cell Biochem. 2016 Mar 25. doi: 10.1002/jcb.25548. [Epub ahead of print]
- 1). Morotomi T, Kitamura C, Terashita M, Izumi T, Haruna C, Matsumoto N, Anan H: Analysis of thermotolerant mechanism induced by continuous mild heat stress on odontoblast-like cell KN-3. The 9th World Endodontic Congress of the International Federation of Endodontic Associations, Tokyo, Japan (May 23-26), 2013.
 - 2). Matsumoto N, Minakami M, Izumi T, Morotomi T, Haruna C, Ushio S, Fukuda Y, Itaya K, Henmi K, Anan H: Histologic evaluation of effects of emdogain gel on injured rat root apex. The 9th World Endodontic Congress of the International Federation of Endodontic Associations, Tokyo, Japan (May 23-26), 2013.
 - 3). 諸富孝彦: シンポジウム「若手研究者が描く Pulp Wound Healing & Regeneration」断髄後の象牙質-歯髄複合体再生療法の確立のための材料および手技の開発 . 第138回日本歯科保存学会2013年度春季学術大会, 福岡市 (6月27, 28日), 2013.
 - 4). 諸富孝彦, 北村知昭, 泉 利雄, 水上正彦, 西崎竜司, 稲永晃子, 阿南 壽: ストロンチウム置換生体活性ガラスは *in vitro* において象牙芽細胞様株細胞の分化を促進する . 第139回日本歯科保存学会2013年度秋季学術大会, 秋田市 (10月17, 18日), 2013.
 - 5). 諸富孝彦, 丸田道人, 松本典祥, 畠山純子, 泉 利雄, 松家茂樹, 阿南 壽: ストロンチウム置換生体活性ガラスの象牙質補填材としての可能性 . 第40回福岡歯科大学学会総会, 福岡市 (12月15日), 2013.
 - 6). 畠山純子, 畠山雄次, 松本典祥, 春名千英子, 諸富孝彦, 泉 利雄, 沢 禎彦, 阿南 壽: 歯の発生における Lecin rich Amelogenin peptide の発現解析 . 第40回福岡歯科大学学会総会, 福岡市 (12月15日), 2013.
 - 7). 諸富孝彦, 平田-土屋志津, 北村知昭: 4-META/MMA-TBB レジンの *in vitro* での骨芽細胞および歯肉細胞への影響 . 第74回九州歯科学会総会, 北九州 (5月31日, 6月1日), 2014.
 - 8). 諸富孝彦, 平田-土屋志津, 北村知昭: 硬化反応時および硬化終了後の4-META/MMA-TBB レジンが骨芽細胞に与える影響 . 第140回日本歯科保存学会2014年度春季学術大会, 大津市 (6月19, 20日), 2014.
 - 9). 諸富孝彦, 阿南 壽, 北村知昭: ストロンチウム置換生体活性ガラスの象牙芽細胞分化誘導能 . 第35回日本歯内療法学会学術大会, 新潟市 (7月12, 13日), 2014.

- 10). 諸富孝彦, 沖永敏則, 西原達次, 北村知昭: 持続的な軽度熱刺激は象牙芽細胞様細胞の熱耐性を向上させる. 第56回歯科基礎医学会学術大会, 福岡市(9月25-27日), 2014.
- 11). 廉 晃勲, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 永吉雅人, 北村知昭: 多血小板血症が象牙芽細胞様細胞(KN-3細胞)に与える影響. 第141回日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会, 山形市(10月30, 31日), 2014.
- 12). 中川愛加, 諸富孝彦, 永吉雅人, 北村知昭: 象牙芽細胞分化マーカー発現に対する炎症性サイトカインの影響. 第141回日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会, 山形市(10月30, 31日), 2014.
- 13). 諸富孝彦, 阿南 壽, 北村知昭: 前処理としての熱刺激条件の違いが象牙芽細胞様細胞の熱耐性能に与える影響. 第141回日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会, 山形市(10月30, 31日), 2014.
- 14). 平田-土屋志津, 岡本一起, 諸富孝彦, 北村知昭: MTI- によるBMP誘導性骨芽細胞分化への影響. 第141回日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会, 山形市(10月30, 31日), 2014.
- 15). Nakagawa A, Okinaga T, Ariyoshi W, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T: Effect of proinflammatory cytokines on the expression of DMP-1 in odontoblast-like cells. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu, Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2015, Kitakyushu, Japan (January 24), 2015.
- 16). 平田-土屋志津, 自見英治郎, 諸富孝彦, 北村知昭: NF-kB 阻害剤MPAIDsによる骨芽細胞分化への影響. 第75回九州歯科学会総会, 北九州(5月23, 24日), 2015.
- 17). 浦田真梨子, 古株彰一郎, 杉山悟郎, 平田-土屋志津, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎: 新たな骨形成促進薬の探索とその分子メカニズム. 第75回九州歯科学会総会, 北九州(5月23, 24日), 2015.
- 18). 松山篤史, 諸富孝彦, 北村知昭, 竹内弘: プレステロンの細胞遊走能に対する影響. 第75回九州歯科学会総会, 北九州(5月23, 24日), 2015.
- 19). 鷲尾絢子, 吉居慎二, 諸富孝彦, 北村知昭: 新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの各種細胞に及ぼす影響. 第75回九州歯科学会総会, 北九州(5月23, 24日), 2015.
- 20). 鷲尾絢子, 吉居慎二, 諸富孝彦, 北村知昭: 新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの封鎖性と生物学的影響. 第142回日本歯科保存学会2015年度春季学術大会, 北九州市(6月25, 26日), 2015.
- 21). 西藤法子, 諸富孝彦, 鷲尾絢子, 花田可緒理, 平田-土屋志津, Wahlberg Lasrs, Emerich Dwaine, 北村知昭: 象牙芽細胞様細胞の生存維持におけるGDNF分泌デバイスの効果について. 第142回日本歯科保存学会2015年度春季学術大会, 北九州市(6月25, 26日), 2015.
- 22). 鷲尾絢子, 吉居慎二, 諸富孝彦, 北村知昭: 新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの物理化学的特性と生物学的影響. 第36回日本歯内療法学会学術大会, 横浜市(7月11日, 12日), 2015.
- 23). 平田-土屋志津, 諸富孝彦, 北村知昭: 骨再生促進剤としての可能性: MTI- はNF B シグナル阻害によりBMP誘導性骨芽細胞分化を促進する. 第36回日本歯内療法学会学術大会, 横浜市(7月11日, 12日), 2015.
- 24). 西藤法子, 諸富孝彦, 鷲尾絢子, 平田-土屋志津, 北村知昭: カプセル化された細胞から分泌されるGDNFの象牙芽細胞様細胞への効果. 第13回日本再生歯科医学会学術大会, 新潟市(8月29日), 2015.
- 25). 諸富孝彦, 西藤法子, 鷲尾絢子, 北村知昭: スترونチウム置換生体活性ガラスの象牙芽細胞分化誘導能を有するスキャホールド材としての可能性. 第13回日本再生歯科医学会学術大会, 新潟市(8月29日), 2015.
- 26). 平田-土屋志津, 福島秀文, 片桐岳信, 大手聡, 進正史, 永野健一, 青木和広, 諸富孝彦, 杉山悟郎, 中富千尋, 古株彰一郎, 土井貴裕, 竹内弘, 大谷啓一, 寺下正道, 平田雅人, 北村知昭, 自見英治郎: NF- κ B p65はSmad4と結合することでBMP2誘導性の骨形成を抑制する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市(9月11-13日), 2015.
- 27). 平田-土屋志津, 岡本一起, 自見英治郎, 諸富孝彦, 北村知昭: NF- κ B阻害剤MPAIDsによる骨芽細胞への影響. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市(9月11-13日), 2015.
- 28). 浦田真梨子, 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 平田-土屋志津, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎: Geranylgeraniolは骨芽細胞分化を促進する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 新潟市(9月11-13日), 2015.
- 29). 西藤法子, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭: カプセル化細胞から分泌されたGDNFの象牙芽細胞様細胞生存能に及ぼす影響. 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都市(11月9, 10日), 2015.
- 30). 中山皓平, 平田-土屋志津, 永吉雅人, 諸富孝彦, 北村知昭: TNF- 誘導性 NF- κ B シグナルは象牙芽細胞様細胞の石灰化能を阻害する. 第143回日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会, 東京都(11月12, 13日), 2015.

- 31). 平田-土屋志津, 岡本一起, 中山皓平, 永吉雅人, 諸富孝彦, 北村知昭: MTI- ペプチドの骨芽細胞における抗炎症効果の検討. 第143回日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会, 東京都 (11月12, 13日), 2015.
- 32). 吉居慎二, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭: 新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの根管封鎖性の検討. 第143回日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会, 東京都 (11月12, 13日), 2015.

〔図書〕(計3件)

- 1). 諸富孝彦. 必修 臨床研修歯科医ハンドブック 第4版 (竹原直道, 廣藤卓雄 監修) 医歯薬出版 平成27年3月25日 (共著)
- 2). 北村知昭, 諸富孝彦. エンドドンティクス 第4版 (編集主幹 興地隆史, 須田英明, 中村 洋) 永末書店 平成27年4月18日 (共著)
- 3). 諸富孝彦, 吉居慎二, 北村知昭. 日本歯科評論別冊 2015 最新歯内療法の器具・器材と臨床活用テクニック (北村和夫, 木ノ本喜史, 佐藤暢也, 澤田則宏 編) ヒョーロン・パブリッシャーズ 平成27年5月15日 (共著)

6. 研究組織

(1)研究代表者

諸富 孝彦 (Takahiko MOROTOMI)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 10347677