

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893301

研究課題名(和文)抗微生物ペプチドCathelicidinの歯髄修復作用解析

研究課題名(英文)Analyse the effects of antimicrobe peptide Cathelicidin on dental pulp repair.

研究代表者

堀部 寛治 (Horibe, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70733509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Cathelicidinは、受容体Fpr2と結合し、様々な生理作用を惹起する。ラット歯胚分化過程において、Cathelicidinは象牙質形成期の象牙芽細胞に局在し、形成完了後には消失した。一方、Fpr2は象牙芽細胞下層でみられ、その局在は象牙質形成完了後も維持していた。歯質切削刺激後の修復過程において、切削後早期にCathelicidin陽性炎症性細胞が歯髄組織に浸潤し、修復象牙質形成時期ではCathelicidinおよびFpr2局在が修復象牙芽細胞とその周囲に認められた。

Cathelicidin-Fpr2シグナルは歯胚発生および修復応答の象牙質形成に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cathelicidin is an antimicrobial peptide, binding to FPR2, and initiates various physiological actions. We examined the temporal localization of Cathelicidin and Fpr2 in rat tooth germ differentiation. In later bell stage, Cathelicidin was seen in odontoblasts and Fpr2-positive cells localized under odontoblasts. After tooth crown formation, Cathelicidin positive signals disappeared in crown odontoblasts, whereas Fpr2 positive signals were kept in subodontoblastic layer. Next we observed localization of Cathelicidin and Fpr2 in repair model of dental pulp tissues after cavity preparation. At 3 days after, Cathelicidin positive inflammatory cells were seen in the pulp under dental cavity. At 7 days, Cathelicidin and Fpr2 positive signals were detected in odontoblast contacting reparative dentin and cells under cavity. These results suggest that Cathelicidin-FPR2 signal is involved in physiologic and reparative dentin formation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：歯学 細胞・組織 生体分子 免疫学

1. 研究開始当初の背景

歯髄除去を行った失活歯は、生活歯と比較し、歯根破折のリスクが著しく増大する。歯根が破折した患歯は、原則的に保存が困難で、抜歯が第一選択となる。すなわち、歯髄を保存し生活歯を維持することは、歯の喪失を予防することに繋がる。Quality of Life (QOL) の概念が一般に浸透してきた現在、咬合機能の維持に対するニーズが高まっており、歯髄を保存する必要性は今まで以上に重要視されている。侵襲に対し生体は、傷害局所に組織幹細胞をリクルートすること、および成長因子を産生することで組織修復を可能にする。歯髄組織における組織修復においては、修復象牙質と Dentin Bridge が形成される。我々は、修復象牙質と Dentin Bridge の形成に、組織幹細胞のリクルートと成長因子産生が行われる可能性に着目した。これらの修復調節機構の解明は、歯髄組織の自己修復能を活性化させる生物学的治療法の確立に繋がるものと考えられる。そこで我々は、歯髄組織修復の促進因子として抗微生物ペプチド Cathelicidin に着目して本研究を計画した。

2. 研究の目的

Cathelicidin は、広汎な哺乳動物が発現する組織修復に関わる抗微生物ペプチドである。ヒトは Leucine leucine-37 (LL-37) を、そしてマウスとラットは Cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) と名付けられた Cathelicidin メンバーを発現する。Cathelicidin は創傷や感染早期に好中球、マクロファージ、上皮細胞などから分泌され、生体内に侵入してきた微生物の細胞膜に直接付着し、穿孔することで殺菌を行う。また Cathelicidin は宿主の細胞が発現する受容体と結合することで生理作用を示す。Cathelicidin は受容体 formyl peptide receptor 2 (Fpr2) と結合し、血管新生を促進、epidermal growth factor (EGF) や platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) などの成長因子の産生を促進し組織修復の促進因子として作用することが分かっているが、歯・歯周組織における Cathelicidin とその受容体 Fpr2 の局在および役割は不明である。そこで我々は、ラットの歯胚発生および、象牙質窩洞形成刺激後の歯髄組織修復過程における Cathelicidin および Fpr2 の経時的な局在の変化を免疫組織学的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯胚発生期における Cathelicidin および Fpr2 局在

胎生期 15, 17, 20 日のラット頭部および生後 3 日、および 2 週齢の上顎骨を採取し、4% パラホルムアルデヒドによる固定後、脱灰処理後、パラフィン包埋を行う。厚さ 4 μ m の連続切片を作成した後、上顎歯胚における

Cathelicidin および Fpr2 の局在を抗 Cathelicidin 抗体、抗 Fpr2 抗体を用いた免疫組織化学的手法により検討を行った。

(2) 象牙質切削刺激後の Cathelicidin および Fpr2, CD68 局在

6 週齢マウスの上顎第一臼歯近心面に、象牙質窩洞を形成する。窩洞形成後、各ステージ (0h, 6h, 1 日, 3 日, 7 日後) に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脱灰後、パラフィン包埋を行う。厚さ 4 μ m の連続切片を作製する。歯髄組織における Cathelicidin, Fpr2, マクロファージの局在を抗 Cathelicidin 抗体、抗 Fpr2 抗体、抗 CD68 の抗体を用いて免疫組織化学的手法により検討を行った。

4. 研究成果

(1) 歯胚発生期における Cathelicidin および Fpr2 局在

象牙質形成前の胎生期においては、Cathelicidin, Fpr2 とともに歯胚において局在は認められない (図 1)。

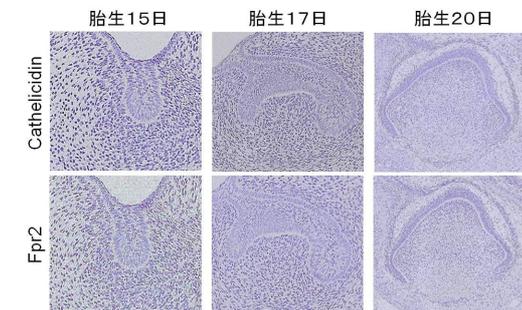


図1 胎生期のラット歯胚におけるCathelicidinおよびFpr2免疫染色像

しかし、発生段階が進み生後 3 日歯胚の歯冠部の象牙質形成部の象牙芽細胞において Cathelicidin (図 2・左) が、Fpr2 が象牙芽細胞層下層に局在が認められた (図 2・右)。

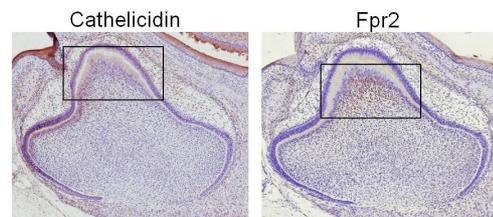


図2 生後3日の歯胚におけるCathelicidinおよびFpr2局在

象牙質形成が終了した 2 週齢のマウス上顎臼歯歯冠部の象牙芽細胞では、Cathelicidin の陽性反応は消失する (図 3・上段・左)。しかし、象牙質形成が進行している歯根部の象牙芽細胞では Cathelicidin の陽性反応が認められた (図 3・上段・右)。

一方、Fpr2 は歯冠部の象牙芽細胞層下層での局在が維持されており (図 3・下段・左)、歯根部では局在は認められなかった (図 3・下段・右)。

これらの結果から、Cathelicidin Fpr2 シグナルは歯胚発生時における象牙質形成に関与することが示唆された。

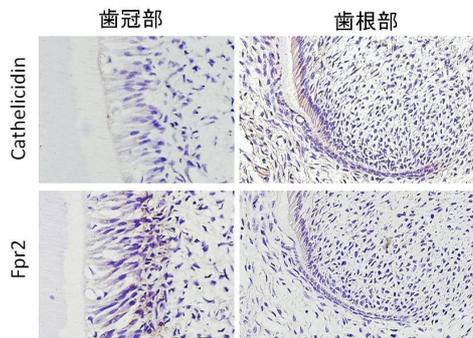


図3 2週齢マウスの第一臼歯冠部、歯根部象牙芽細胞におけるCathelicidinおよびFpr2局在

(2) 象牙質切削刺激後の Cathelicidin および FPR2, CD68 局在

マウス臼歯象牙質にラウンドバーによる切削刺激を与えると、刺激後24時間後には切削部直下の歯髄組織に壊死層が形成され、歯髄細胞は消失する。切削刺激から3日後には歯髄組織に細胞が再びみとめられるようになる。このとき歯質切削部直下の歯髄では、Cathelicidin 陽性細胞、その近傍部に CD68 陽性のマクロファージの浸潤が確認された(図4)。

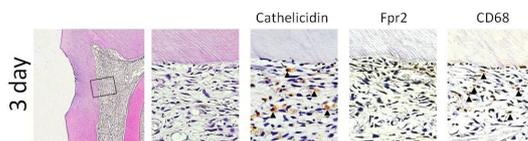


図4 象牙質窩洞形成3日後の歯髄組織における Cathelicidin, Fpr2, CD68陽性細胞の局在

切削刺激から一週間後、切削部直下では修復象牙質の形成が確認された。この修復象牙質の直下に配列する象牙芽細胞様細胞およびその近傍部には Cathelicidin, Fpr2 陽性シグナルが確認された(図5)。

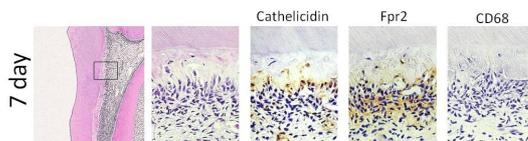


図5 象牙質窩洞形成7日後の歯髄組織における Cathelicidin, Fpr2, CD68陽性細胞の局在

切削刺激を加えてから8週間経過後の歯髄組織では、修復象牙質形成が完了し、組織修復が終了する。この時点では、Cathelicidin 陽性細胞は消失し、また切削刺激前と同様に象牙芽細胞層下層に Fpr2 陽性細胞が局在する。(図6)

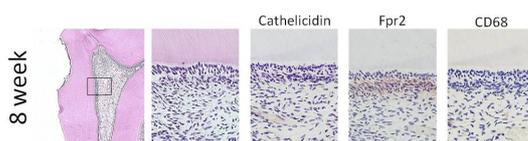


図6 象牙質窩洞形成8週後の歯髄組織における Cathelicidin, Fpr2, CD68陽性細胞の局在

侵襲刺激を受けた歯髄組織では、浸潤してきたマクロファージが分泌した Cathelicidin が Fpr2 と応答し、修復象牙質形成に参与している可能性が示唆された。

本研究結果から Cathelicidin-Fpr2 シグナルは歯胚発生による生理的な象牙質形成、そして修復応答による修復象牙質形成の両方に参与している可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

堀部寛治、細矢明宏、平賀徹、中村浩彰、抗微生物ペプチド Cathelicidin の象牙質修復に対する促進的関与、第57回 歯科基礎医学学会学術大会、2015年9月11日~13日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟)

堀部寛治、細矢明宏、平賀徹、中村浩彰、抗微生物ペプチド Cathelicidin の象牙質修復に対する促進的関与、第33回 日本骨代謝学会学術集会、2015年7月23日~25日、京王プラザホテル(東京)

堀部寛治、細矢明宏、平賀徹、中村浩彰、ラット歯・歯周組織における folmyl peptide receptor (Fpr2)の局在、第56回 歯科基礎医学学会学術大会、2014年9月25日~27日、福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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

堀部 寛治 (HORIBE, Kanji)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 70733509

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :