

学位研究紹介

ラット臼歯断髄後の歯髄 Myofibroblast の 動態解析 Characterization of Dental Pulp Myofibroblasts in Rat Molars after Pulpotomy

新潟大学医歯学総合研究科 歯学分野
枝並 直樹

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental
Sciences

Naoki Edanami

【緒 言】

α -smooth muscle actin (α -SMA) を発現する myofibroblast は、細胞外基質のリモデリングにより創傷治癒や線維化に寄与することが知られている¹⁾。歯髄の修復象牙質形成過程においても、一過性に α -SMA 陽性細胞が創傷部に観察されることが報告されている²⁾ことから、myofibroblast の関与が推察される。しかしながら、修復象牙質形成過程における α -SMA 陽性細胞の詳細な動態は明らかにされておらず、また、myofibroblast の特定には、同じく α -SMA 陽性を示す血管壁細胞との鑑別が必要である。そこで我々は、断髄処置後のラット臼歯歯髄における α -SMA 陽性細胞の局在変化を免疫組織化学染色により観察するとともに、NG2 (血管壁細胞マーカー) の局在と比較することで、修復象牙質形成過程に myofibroblast が関与するかを検索した。また、myofibroblast の分化誘導因子である transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) および extra domain A fibronectin splice variant (EDA-FN) の修復象牙質形成過程における発現変化を、リアルタイム PCR を用いて解析し、 α -SMA 発現と比較した。

【方 法】

本研究は、新潟大学動物実験倫理委員会の指針を遵守し、同委員会の認可の下に実施された (承認番号 27 新大研第 79 号 1)。8 週齢 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯咬合面を直径 0.8mm のカーバイドバー (デンツプラ

イ三金) にて切削し、ケイ酸カルシウム系セメント (ProRoot MTA; Dentsply Tulsa Dental) を用いて断髄処置を行った。その後、窩洞はコンポジットレジン (ビューティフィルフロー; 松風) にて封鎖し、1, 3, 5, 7, 14 日経過後に以下の実験に用いた。また対象群として、未処置の動物を用いた。

(1) 動物を Periodate Lysine Paraformaldehyde 固定液を用いて灌流固定し、処置歯を周囲組織と共に摘出した。10% EDTA 溶液により試料の脱灰を行い、厚さ 10 μ m の凍結切片を作成した。次いで、抗 α -SMA 抗体を用いて、酵素抗体法による免疫染色を行うと共に、抗 α -SMA 抗体と、抗 NG2 抗体を用いて、蛍光抗体法による二重免疫染色を行った。

(2) 動物を安楽死させ、処置歯を抜去した。次いで、抜去歯の歯髄 (各期間 n=4) から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて、TGF- β 1, EDA-FN, α -SMA の mRNA 発現を解析した。

【結 果】

未処置および処置 1 日後の歯髄において、 α -SMA 発現は、血管周囲にのみ認められた (図 1 A)。しかしながら、処置 3 日後では、窩洞直下から歯根側の歯髄までに及ぶ広範囲に、紡錘形の α -SMA 陽性細胞が観察された (図 1 B)。また、二重免疫染色において、紡錘形 α -SMA 陽性細胞は NG2 陰性であった (図 2)。処置 5 日後には、紡錘形 α -SMA 陽性細胞は窩洞直下に集積した。14 日後になると修復象牙質の形成が観察され、 α -SMA 発現は再び血管壁細胞に局限した。リアルタイム PCR の結果から、TGF- β 1, EDA-FN, α -SMA の mRNA 発現は、未処置歯髄と比較して処置後有意に増加した (Dunnett's test $p < 0.05$)。TGF- β 1 と EDA-FN

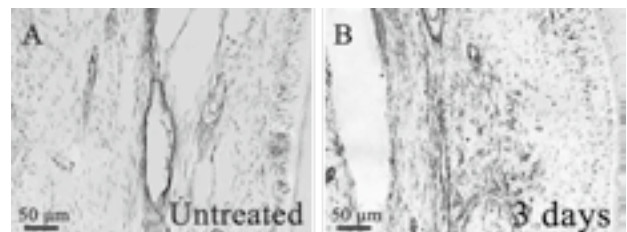


図 1 α -SMA に対する免疫染色

A : 正常歯髄組織において、 α -SMA 陽性反応は血管周囲に局限して認められる。

B : 断髄処置 3 日後の歯髄組織において、多数の紡錘形 α -SMA 陽性細胞が認められる。

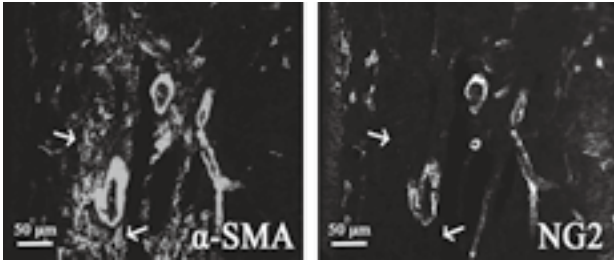


図2 α -SMA と NG2 に対する免疫染色
 α -SMA 陽性かつ NG2 陰性である myofibroblast を認める(矢印)

は処置 1 日後に、 α -SMA は処置 3 日後に発現量が最大となり、その後、TGF- β 1, EDA-FN, α -SMA とともに、処置 14 日後までに未処置歯髄と同等まで発現量が減少した。

【考 察】

修復象牙質形成過程では、一過性に多数の紡錘形 α -SMA 陽性細胞が観察された。これらは未処置歯髄で認められる α -SMA 陽性の血管壁細胞とは異なり、NG2 陰性を呈しており、myofibroblast であると考えられる。myofibroblast は TGF- β 1 と EDA-FN の刺激により分化することが、これまでに多くの臓器で報告されている¹⁾。本研究においても、myofibroblast の出現に先立って、TGF- β 1 と EDA-FN の有意な増加が確認されたことから、修復象牙質形成過程における myofibroblast の分化にも TGF- β 1 と EDA-FN が誘導因子として働いていることが示唆される。

本研究において myofibroblast は、処置 3 日後には歯髄の広範囲に出現し、処置 5 日後では断髄面直下に集積して観察された。このことが、myofibroblast の創傷部への遊走によるものかは不明であるが、これまでの研究では創傷時に歯髄細胞が pulp core から周辺部に、または、根尖部から歯冠部に移動することが知られており³⁾、本研究における myofibroblast も、何らかの遊走因子により創傷部へ移動した可能性がある。

断髄面直下に集積した myofibroblast は、その後、修

復象牙質が形成されると共に観察されなくなった。これまでに、 α -SMA 陽性細胞が骨芽細胞や、象牙芽細胞に分化しうることが報告されている⁴⁾ ことから、本研究で観察された myofibroblast の一部は、新生象牙芽細胞に分化することで α -SMA 発現を消失したとも考えられる。

修復象牙質形成過程に特異的に出現する myofibroblast は、歯髄創傷部の治癒に重要な役割を果たしていると考えられるため、この細胞を活性化させることで治癒を促進する新たな歯髄保存療法の開発が期待できる。

【結 論】

断髄後の歯髄において、修復象牙質形成に先立ち TGF- β 1 と EDA-FN が増加し、 α -SMA 陽性かつ NG2 陰性である myofibroblast が一過性に出現することが示された。

【参考文献】

- 1) Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al: Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 349-363, 2002.
- 2) Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, et al: Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of α -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol*, 138: 583-592, 2012.
- 3) Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Djole SX, et al: Plithotaxis, a collective cell migration, regulates the sliding of proliferating pulp cells located in the apical niche. *Connect Tissue Res*, 55 (suppl 1) : 68-72, 2014.
- 4) Vidovic I, Banerjee A, Fatahi R, et al: α SMA-expressing perivascular cells represent dental pulp progenitors in vivo. *J Dent Res*, 96: 323-330, 2017.