象牙質－歯髄複合体の創傷治癒解明と再生療法確立

諸 富 孝 彦¹・北 村 知 昭¹・寺 下 正 道²

¹九州歯科大学口腔機能科学専攻口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野

²九州歯科大学口腔機能科学専攻医療人間形成学講座総合診療学分野

平成 20 年 7 月 18 日受付

平成 20 年 8 月 27 日受理

Clarification of Wound Healing and Establishment of Regenerative Therapy of Dentin-Pulp Complex

Takahiko Morotomi¹, Chiaki Kitamura¹ and Masamichi Terashita²

¹Division of Pulp Biology, Operative Dentistry and Endodontics,

Department of Cariology and Periodontology,

²Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice,

Science of Oral Functions,

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

E-mail: morotomi@kyu-dent.ac.jp

キーワード: 象牙質－歯髄複合体/創傷治癒/再生療法

歯髄組織は歯の知覚や栄養, 免疫および修復などを司る重要な組織であるが, その周囲を硬組織で囲まれ, わずかな径の根尖孔及び側枝のみで外界と交通し, 他の組織にはない閉鎖空間という特殊な環境下に存在する。このためひとたび各種刺激により歯髄に炎症が惹起されると, 重篤な炎症へと陥りやすい。現代歯科医療においては歯の保存に歯髄組織の存在が大きな役割を果たすことが広く認知されており, 各種の歯髄保護処置により可及的に歯髄保存が行われている。しかしながら, 歯髄組織の特殊性により従来の覆髄法や生活歯髄切断法では歯髄保存に成功するとは限らず, 抜髄処置に至る症例も今なお多い。

近年, 歯の発生メカニズムや歯髄創傷治癒機能の解明を目的とする研究が急速に発展し, それに伴い象牙質－歯髄複合体再生の可能性についても多くの報告がなされるようになった。しかし, 「歯髄再生療法」として臨床応用できる時期が目前に迫っているわけではない。本稿では象牙質－歯髄複合体再生療法に関する現在までの知見と, 今後の展望について紹介する。

1. 象牙質－歯髄複合体の創傷治癒

象牙芽細胞は, 象牙細管内に象牙芽細胞突起をのばして象牙質と一体化しており, 機械的・化学的または生物学的侵襲が象牙質に加わると, 象牙細管を通して歯髄にまでその侵襲がおよぶ。現在では象牙質と歯髄は一体のものとし, 象牙質－歯髄複合体として捉えられている。

齲蝕や, 窩洞形成時に象牙質－歯髄複合体に加わる各種刺激が過度でなければ, 創傷治癒過程を経て歯髄には反応象牙質や修復象牙質が形成される。このような歯髄創傷治癒メカニズムを解明することにより, 象牙質－歯髄複合体再生療法実現の可能性が開ける。

歯髄創傷治癒過程については *in vivo* および *in vitro* 両実験系において報告がなされている。*in vivo* では, 窩洞形成により傷害を受けた象牙芽細胞や歯髄細胞の処理にアポトーシスが関与していること^{1,2)}, 象牙細管深くに突起を伸ばす樹状細胞が, 歯髄防衛細胞として外来刺激に対して機能することが報告されている³⁾。*in vitro* の実験系においても各種刺激に対する歯髄細胞, 象牙芽細胞の応答について数多く報告されている。我々は, 窩

洞形成における主要な刺激であるヒートストレスにより、歯髄細胞はアポトーシスに陥るが熱抵抗性も有していること⁹⁾、浸潤麻酔で想定される低酸素環境下では歯髄細胞にアポトーシスと細胞周期停止が誘導されるが、酸素濃度を戻すと細胞機能が回復すること⁹⁾を明らかにし、歯髄細胞の有する回復能を示してきた。さらに、我々が確立した細胞増殖能の高い生後10日目のラット下顎切歯からの細胞単離法⁹⁾を用いて歯髄細胞群を継代し、象牙質形成能等の特徴を持つ象牙芽細胞様細胞株KN-3を樹立した⁹⁾。これにより動物実験を減少させながら歯髄創傷治癒・再生療法の確立に必要な知見を探ることも可能となると考えている。

2. 断髄後の歯髄再生療法の確立

再生医療実現の3要素として(1)細胞、(2)増殖因子・形態形成因子、(3)細胞の足場(スキャホールド)がある。象牙質-歯髄複合体再生療法を確立するためにもこれらの因子が不可欠である。ここでは、傷害を受けた後に残存している生活歯髄から象牙質-歯髄複合体を再生する研究の中で、3要素に関して現在までに明らかにされている知見について述べる。

(1) 細胞

失われた組織を再構築する際の主役は、生体に存在する組織幹細胞である。幹細胞は自己複製能と分化能を併せ持つ細胞と定義されているが、組織幹細胞は各組織内のnicheと呼ばれる特定の部位に存在し、様々な原因により失われた細胞を供給し続ける。歯髄間質にも歯髄幹細胞が存在しており、人の智歯や脱落した乳歯からの、自己複製及び多分化能を有する歯髄幹細胞単離・同定に関する報告がある⁸⁻¹⁰⁾。断髄処置後、断髄部に象牙質-歯髄複合体を再生させる際には、残存する歯髄の血管周囲に存在すると考えられている歯髄幹細胞を再生部位に誘導、増殖させることが可能と考えられる。

(2) 増殖因子・形態形成因子

増殖因子・形態形成因子は、細胞が組織を構築する際に増殖・分化を指示する誘導シグナルである。歯の発生過程においてもbone morphogenetic proteins (BMPs), fibroblast growth factors (FGFs), hedgehog proteins (Hhs), Wingless- and int-related proteins (Wnts)そしてtumor necrotic factor (TNF)の各シグナルファミリーに関与する分子が上皮と間葉で発現し、それらの相互作用により歯胚が形成される。このうち、BMP-2は歯髄細胞の象牙芽細胞への分化を促進し¹¹⁾、BMP-2、-4あるいはBMP-7は再生象牙質形成を促進することが報告されている^{12,13)}。そこでリコンビナ

ントBMPsを局所応用し修復象牙質形成を促進することが考えられるが、リコンビナントBMPsの半減期は短く、高濃度とすると生体への悪影響も考えられる。細胞自体にBMPsを産生させるため遺伝子の導入を行う方法も実験的には成功しているが¹⁴⁾、遺伝子改変技術の臨床応用には慎重論も多い。

以上の方法に対し、我々はドラッグデリバリーシステムを応用し、FGF-2をゼラチンハイドロゲルに含有・徐放させることで、歯質・歯髄組織の欠損部位に歯髄組織を誘導後、象牙質を再生させる方法の可能性について報告した¹⁵⁾。この方法では既に臨床応用されている薬剤・材料のみを用いた象牙質・歯髄複合体再生療法として確立することができ、臨床応用への障害は少ないと考えている。

(3) 足場(スキャホールド)

3番目の要素は、組織を構築する上で細胞の足場となるスキャホールドである。スキャホールドに用いられる細胞外基質に求められる性質として、細胞の遊走・接着を促進し、組織構築のための3次元微少環境を与えるのに十分な生体親和性や機械的強度を持ち、細胞増殖・分化に合わせて次第に吸収され、再生組織に置換されることがあげられる。これまでにも象牙質-歯髄複合体再生を目的として、合成ポリマーや天然ポリマー(コラーゲンやグリコサミノグリカン)、またハイドロキシアパタイト等の無機質を含むものなど各種生体材料が報告されている。スキャホールドの種類によっては細管構造を有する象牙質や骨様象牙質が形成されるという報告もあり^{12,16)}、象牙芽細胞分化誘導におけるスキャホールドの重要性も示唆される。

3. 象牙質-歯髄複合体再生療法の今後の展望

生活歯髄を利用できる断髄処置後とは異なり、抜髄処置後の歯髄腔内には歯髄細胞は存在しない。そのため、根尖孔外歯周組織からの脈管系・神経系誘導や歯髄細胞の歯髄腔内移植が必要となる。現在、その候補として挙げられているものが間葉系幹細胞である。

骨髄中には造血系細胞の他に骨髄間質細胞と呼ばれる細胞群が存在することが知られており、骨髄間質細胞には象牙芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞および筋細胞等、多くの間葉系細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞が含まれることが報告されている^{17,18)}。また、マウスの骨髄由来間葉系幹細胞と口腔上皮を組み合わせることで歯が形成されること¹⁹⁾、ヒト及びマウスの間葉系幹細胞を上皮成長因子(EGF)や脳由来神経栄養因子(BDNF)存在下で培養することにより、神経系細胞マーカーが発現すること

も確認されている²⁰⁾。最近では骨髄の他に臍帯血や脂肪組織からも間葉系幹細胞が分離できる可能性が示唆されている。以上の報告は、間葉系幹細胞は中胚葉系の機能細胞のみならず胚葉を超えた広範な分化の可塑性を持つことを示している。いずれの組織に細胞ソースを求めるにしても、自己組織からの間葉系幹細胞入手が可能となることから、免疫応答や造腫瘍性、倫理上の問題等に縛られることがなく、再生療法への適用が期待できる。

これまで紹介してきたように、歯髄創傷治癒過程や象牙質-歯髄複合体再生療法をめぐる研究は近年急速に進んでいる。しかしながら、特殊な実験条件下における報告がほとんどであり、臨床応用という観点では安全性や経費、倫理上の問題等クリアすべき課題がまだ多く残されている。そのため、現時点では将来治療に応用できる可能性があるというレベルでしかない。患者に苦痛や過度の負担を負わせることなく、安全性の確立された象牙質-歯髄複合体再生療法を実現させるためには、より長期的な展望のもと地道な研究の継続が必要である。

引用文献

- 1) Kitamura, C., Kimura, K., Nakayama, T., Toyoshima, K. and Terashita, M.: Primary and secondary induction of apoptosis in odontoblasts after cavity preparation of rat molars. *J. Dent. Res.* 80: 1530-1534, 2001.
- 2) Kitamura, C., Ogawa, Y., Nishihara, T., Morotomi, T. and Terashita, M.: Transient co-localization of c-Jun N-terminal kinase and c-Jun with heat shock protein 70 in pulp cells during apoptosis. *J. Dent. Res.* 82: 91-95, 2003.
- 3) Ohshima, H., Nakakura-Ohshima, K., Takeuchi, K., Hoshino, M., Takano, Y. and Maeda, T.: Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microsc. Res. Tech.* 60: 483-490, 2003.
- 4) Kitamura, C., Nishihara, T., Ueno, Y., Nagayoshi, M., Kasugai, S. and Terashita, M.: Thermotolerance of pulp cells and phagocytosis of apoptotic pulp cells by surviving pulp cells following heat stress. *J. Cell Biochem.* 94: 826-834, 2005.
- 5) Ueno, Y., Kitamura, C., Terashita, M. and Nishihara, T.: Re-oxygenation improves hypoxia-induced pulp cell arrest. *J. Dent. Res.* 85: 824-828, 2006.
- 6) Morotomi, T., Kawano, S., Toyono, T., Kitamura, C., Terashita, M., Uchida, T., Toyoshima, K. and Harada, H.: In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Arch. Oral Biol.* 50: 695-705, 2005.
- 7) Nomiya, K., Kitamura, C., Tsujisawa, T., Nagayoshi, M., Morotomi, T., Terashita, M. and Nishihara, T.: Effect of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J. Endod.* 33: 1187-1191, 2007.
- 8) Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G. and Shi, S.: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81: 531-535, 2002.
- 9) Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P. Jr., Han, J., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. and Sucov, H. M.: Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* 127: 1671-1679, 2000.
- 10) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Shi, L.: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5807-5812, 2003.
- 11) Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakashima, A. and Akamine, A.: Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J. Dent. Res.* 83: 590-595, 2004.
- 12) Nakashima, M.: Induction of dentine formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP)-2 and -4. *J. Dent. Res.* 73: 1515-1522, 1994.
- 13) Rutherford, R. B., Wahle, J., Tucker, M., Rueger, D. and Charette, M.: Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral Biol.* 38: 571-576, 1993.
- 14) Nakashima, M., Tachibana, K., Iohara, K., Ito, M., Ishikawa, M. and Akamine, A.: Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Hum. Gene Ther.* 14: 591-597, 2003.
- 15) Kikuchi, N., Kitamura, C., Morotomi, T., Inuyama, Y., Ishimatsu, H., Tabata, Y., Nishihara, T. and Terashita, M.: Formation of dentin-like particles in dentin defect above exposed pulp by controlled release of fibroblast growth factor 2 from gelatin hydrogels. *J. Endod.* 33: 1198-1202, 2007.
- 16) Nakashima, M.: Induction of dentine in amputated pulp of the dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch. Oral Biol.* 39: 1085-1089, 1994.
- 17) Satomura, K., Krebsbach, P. H., Bianco, P. and Gehron, R. P.: Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J. Cell Biochem.* 78: 391-403, 2000.
- 18) Negishi, Y., Kudo, A., Obinata, A., Kawashima, K., Hirano, H., Yanai, N., Obinata, M. and Endo, H.: Multipotency of a bone marrow stromal cell line, TBR31-2, established from ts-SV40 T antigen gene

- transgenic mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 450-455, 2000.
- 19) Ohazama, A., Modino, S.A.C. and Miletich, I.: Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. J. Dent. Res. 83: 518-522, 2004.
- 20) Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Palaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta S., Janssen, W., Patel, N., et al.: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. Exp. Neurol. 149: 411-423, 2000.