

## 短 報

## 培養歯髓細胞の nodule 形成におけるアポトーシスの関与

矢菅 隆利

岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任・指導：上野 和之 教授)

(受付：2001年12月20日)

(受理：2002年1月9日)

**Abstract :** We have previously reported that dental pulp cells can form calcified nodules, and that apoptosis was detected around the nodules by using an *in situ* apoptosis detection kit. However, the relationship between nodule formation of the pulp cells and apoptosis has not yet been clarified. The purpose of this study was to confirm the role of apoptosis in the nodule formation of dental pulp cells *in vitro*.

Dental pulp cells in explant culture originating from a patient with periodontitis were cultured from 5 to 9 times in D-MEM. The cells were cultured for 4 weeks in the absence or presence of a Caspase-3 inhibitor, Caspase-3 /CPP32 Inhibitor-CHO, in order to examine its effect on inhibition of apoptosis of dental pulp cells.

The formation of nodules by dental pulp cells was observed by phase contrast microscope in the fourth week of culture, and the total numbers of nodules in a definite field were counted. Apoptosis of dental pulp cells in nodules was detected with a Caspase-3 detection kit by FITC, and was observed by laser microscope. Statistical analysis on changes of the nodule numbers was done by paired or unpaired *t*-test.

Results showed that the number of nodules formed in the absence or presence of the caspase-3 inhibitor increased every week during four weeks ( $P < 0.01$ ). However, the number of nodules in the presence of the caspase-3 inhibitor was significantly less than that of the control culture at three and four weeks ( $P < 0.05$ ). These results indicate that apoptosis of dental pulp cells *in vitro* occurs along nodule formation and precedes calcification.

**Key words :** dental pulp cell, nodule formation, calcification, apoptosis

## 緒 言

象牙粒などの歯髓組織の石灰化現象は、知覚過敏に対する処置、歯冠修復のための形成処置

さらに抜髄等の歯内処置に関与し、臨床的に看過できないものである<sup>1)</sup>。しかし、その形成機序に関する実験的な研究は少なく<sup>2)</sup>、まだ充分には明らかにされていない。

Apoptosis of dental pulp cells in nodule formation *in vitro*.

Takatoshi YASUGE

Department of Periodontology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

一般的に、動脈硬化などの石灰化病変と細胞死との関連性は以前からよく知られている。最近、Kim<sup>3)</sup>がこれらの病的石灰化、さらに内軟骨性骨化などの生理的石灰化過程で、細胞のアポトーシスに伴って生じたアポトーシス小体が matrix vesicle の核となり石灰化の引き金となると報告するなど、石灰化過程におけるアポトーシスの役割が注目されている。歯髓組織におけるアポトーシスに関しては、Vermelin ら<sup>4)</sup>がヒトとラットの抜去歯を対象に odontoblast layer と sub-odontoblast layer に TUNEL 陽性細胞を検出したという報告がなされているだけで、象牙質形成、あるいは第二象牙質や象牙粒の形成などの石灰化現象におけるアポトーシスの役割はまだ解明されていない。著者ら<sup>5)</sup>と佐藤<sup>6)</sup>は歯髓組織由来の培養細胞を用いた *in vitro* 系で、nodule 形成と石灰化およびアポトーシスについて検討し、歯髓細胞の培養系において nodule 形成と基質沈着、nodule の石灰化<sup>5,6)</sup>、さらに同部における歯髓細胞のアポトーシス<sup>5)</sup>などが関連した現象であることを明らかにした。しかし、アポトーシスの発現時期、特に石灰化に至る前の nodule 形成とアポトーシス発現との関連性については不明な点が残されていた。そこで本研究では、前回の実験系と同じ培養歯髓細胞系を用いて、アポトーシスの最終段階で活性化することが知られているカスパーゼ-3 阻害剤を培地に添加してアポトーシスを阻害し、nodule 形成への影響を経時的に検討し nodule 形成とアポトーシス発現との関連性について解析した。

## 材料および方法

### 1. 歯髓細胞の培養

岩手医科大学歯学部附属病院第二保存科に通院中の歯周炎患者1名(48歳、女性)の歯周治療上抜髄処置を必要とした歯(上顎左側犬歯)から歯髓を無菌的に採取した。採取に当たり、事前に研究内容を患者に説明し、同意が得られてから実施した。得られた歯髓は、10%ウシ胎仔血清(FBS)、100 U/ml Penicillin、100 µg/ml

Streptomycin、3 µg/ml Amphotericin B を添加した Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (Nissui、以下 D-MEM) を用いて Explant Culture Method で5%CO<sub>2</sub>を含む湿潤気相下で37°Cにて初代培養した。歯髓組織より遊走した歯髓細胞を D-MEM を用い、60mm シャーレ (NUNCLON、NUNC) 上で5~9代まで継代培養した。培地は培養開始から2~3日おきに交換した。対照群は D-MEM のみの培地で培養し、実験群は10 µM 濃度のカスパーゼ-3 阻害剤、Caspase-3 / CPP 32 Inhibitor-CHO (Ac-DEVD-CHO) (Kamiya Biomedical Company) を添加した D-MEM で培養した。

### 2. 位相差顕微鏡による nodule 形成の観察とカスパーゼ-3 活性像の観察

培養ヒト歯髓細胞を Culture Slides (BIOCOAT、FALCON) の4連チャンバーに4×10<sup>4</sup>個/wellの細胞密度で継代した。各チャンバーの任意の4カ所(各12mm<sup>2</sup>)を選び、40(4×10)倍での位相差顕微鏡による視野像を写真撮影し、その同一視野内の全ての nodule 数を培養開始から各週ごとに数えた。2週、4週の時点で、PhiPhiLuxG 1 D 2 Kit (OncoImmune Inc.) を用いて蛍光染色を行いカスパーゼ-3の活性を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV300、OLYMPUS) を用いて観察した。カスパーゼ-3活性の染色は、キットに示された手順に沿って実施した。カスパーゼ-3活性の検出に先立ち、共焦点レーザー走査型顕微鏡の検出感度を対照染色標本が0になるように設定した。nodule 数については平均値の差の検定 (paired *t* および unpaired *t* 検定) を用いて統計処理した。

## 結 果

### 1. 位相差顕微鏡による nodule 形成の観察

4連チャンバーに4×10<sup>4</sup>個/wellの細胞密度で播き込んだ歯髓細胞は、対照群でもカスパーゼ-3阻害剤を添加した実験群でも、培養開始1週目では、歯髓細胞が散在していたが、2週目では集簇化が認められた。培養3週では

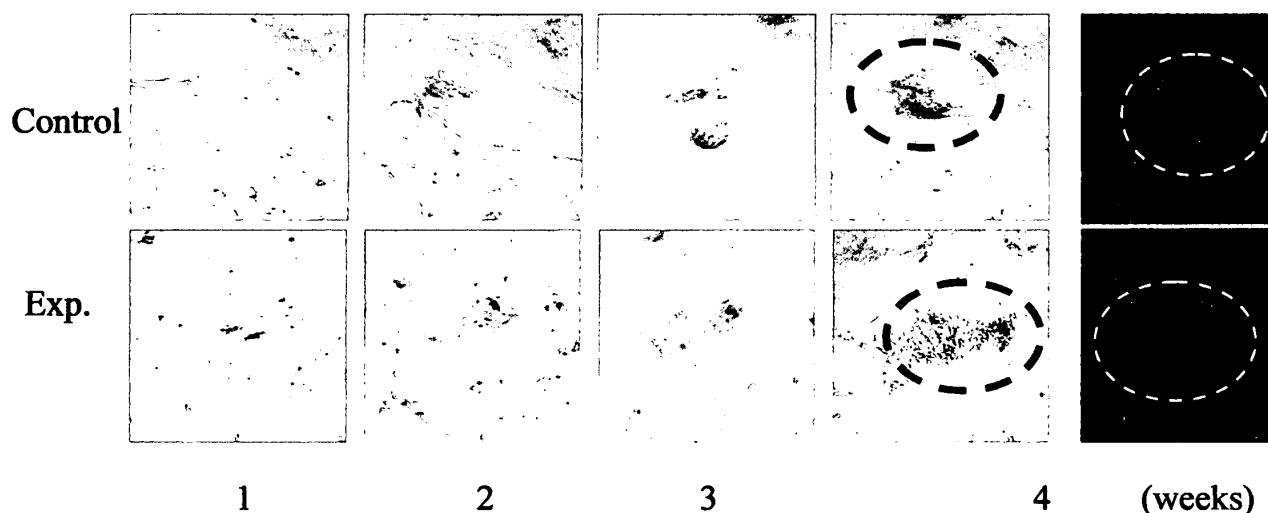


Fig. 1. Process of nodule formation on phase contrast microscopy and Caspase-3 activity staining by FITC at 4 weeks. ( $\times 200$ )

Exp. : experimental group

Each circle line at 4 weeks indicates nodule formation.

Table 1. Changes of nodule numbers at definite field.

|         | Periods of the incubation (weeks) |                 |                 |                 |
|---------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         | 1                                 | 2               | 3               | 4               |
| Control | 5.42 $\pm$ 3.65                   | 6.77 $\pm$ 4.09 | 8.21 $\pm$ 4.31 | 8.94 $\pm$ 4.33 |
|         | **                                |                 | **              | **              |
| Exp.    | 5.25 $\pm$ 3.23                   | 5.75 $\pm$ 3.59 | 6.52 $\pm$ 3.63 | 6.83 $\pm$ 3.57 |
|         | **                                |                 | **              | **              |

one field: 4mm  $\times$  3mm, N=48 fields

Mean  $\pm$  SD,

Statistically significant \*\* $P < 0.01$  : paired  $t$ -test

細胞密度がさらに高まり、4週目で培養細胞が基質成分を取り囲む明瞭な nodule 形成が確認された (Fig. 1)。

## 2. カスパーゼ-3 活性像の観察

培養開始3週目までは、対照群、実験群とも明らかなカスパーゼ-3 活性陽性所見は認められなかったが、培養開始4週目の対照群において、nodule 形成の中央部に明らかな陽性所見が認められた (Fig. 1)。一方、4週目の実験群でも nodule 形成部に陽性所見が認められた。しかし、対照群と比較して陽性部位は少なく、各陽性領域の面積は小さかった (Fig. 1)。すなわち、両群間にカスパーゼ活性の発現時期に

差は認められなかったが、活性の程度は実験群で減少していた。

## 3. nodule 形成数の変化

対照群と実験群における1週から4週に至るまでの、各週あたりの検索視野48部位における一視野あたりの平均 nodule 数および標準偏差を Table 1 にまとめて示した。この際、細胞が集合し細胞密度が高くなった部位も含めて計測した。その結果、対照群と実験群ともに経時的に有意に nodule 数が増加した ( $P < 0.01$ )。しかし、カスパーゼ-3 阻害剤を添加した実験群の nodule 数は、対照群と比較するといずれの測定時点においても少なかった (Fig. 2)。特

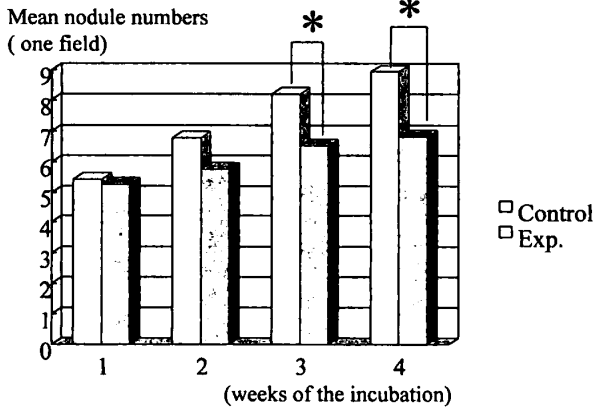


Fig. 2. Changes of nodule numbers at definite fields.  
Statistically significant \* $P < 0.05$  : unpaired  $t$ -test

に培養開始3週目および4週目では、両群の間に有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。

### 考 察

著者ら<sup>9)</sup>は前回の実験で、培養歯髄細胞による nodule 形成とそれに続く石灰化部位に TUNEL 法でアポトーシス小体が観察されたことから、培養歯髄細胞の nodule 形成とその石灰化に歯髄細胞のアポトーシスが密接な関連性を持つことを推察した。さらに、本実験でアポトーシスを阻害すると、歯髄細胞による nodule 形成が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から培養歯髄細胞による nodule 形成とその石灰化過程において、アポトーシスは石灰化に至る前の nodule 形成段階に発現し、nodule 形成とそれに続く石灰化に必須の機序であると考えられた。

アポトーシスは内軟骨性骨化などの生理的石灰化や動脈硬化などの病的石灰化のいずれにおいても重要な機序であると報告されている<sup>3)</sup>。石灰化におけるアポトーシスの役割については、アポトーシス小体がカルシウム結晶の核となることが平滑筋細胞の nodule 形成とその石灰化過程で示されている<sup>7)</sup>。歯髄細胞の培養系において、培養4週目の nodule 内には、コラーゲン線維、グルコサミノグリカン、osteocalcin, osteonectin などが局在し、さらに、培養8週目にはカルシウムが沈着し石灰化

することが証明されている<sup>6)</sup>。培養歯髄細胞においても、アポトーシスが nodule 形成後の石灰化を開始させる役割を担っていると考えられるが、この点については電子顕微鏡的観察などを用いてさらに検討を加えたい。

本実験で、培養4週目のカスパーゼ-3活性は実験群の nodule 部位で完全には消失しなかった。この理由は、今回培地に添加したカスパーゼ-3阻害剤の濃度 ( $10 \mu\text{M}$ ) が比較的低く、アポトーシスの阻害が完全ではなかったためと考えられた。

謝 辞：稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました本学歯科保存学第二講座上野和之教授ならびに本学口腔微生物学講座木村重信教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に関して直接的なご指導を賜りました歯科保存学第二講座の八重柏隆講師ならびに藤本淳助手、佐藤貴彦大学院生に厚く感謝致します。

本研究の一部は岩手医科大学ハイテクリサーチセンター研究費の補助を受けて行われた。

本研究の要旨は、岩手医科大学歯学会第27回総会 (2001年12月1日) にて発表した。

### 参 考 文 献

- 1) Ten Cate, A. R.: Oral Pathology, Development, Structure, and Function. Fifth ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, pp191-192, 1998.
- 2) 柴 秀樹：ヒト培養歯髄細胞の石灰化能に関する研究, 広歯誌, 25: 58-71, 1993.
- 3) Kim, KM.: Apoptosis and calcification. *Scanning Microscopy* 9: 1137-1178, 1995.
- 4) Vermelin, L., Lecolle, S., Septier, D., Lasfargues, JJ., Goldberg, M.: Apoptosis in human and rat dental pulp. *Eur J. Oral Sci.* 104: 547-553, 1996.
- 5) 矢菅隆利, 八重柏隆: 歯髄細胞の石灰化におけるアポトーシス発現について, 日歯保存誌, 44: 234-242, 2001.
- 6) 佐藤貴彦: 培養歯髄細胞における BMP 発現と TNF- $\alpha$  の影響, 岩医大歯誌, 26: 155-165, 2001.
- 7) Proudfoot, D., Skepper, J. N., Hegyi, L., Bennett, M. R., Shanahan, C. M., Weissberg, P.L.: Apoptosis regulates human vascular calcifica-

tion evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 87 : 1055-1062, 2000.