

培養歯髓細胞における BMP 発現と TNF- α の影響

佐藤 貴彦

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10月22日)

(受理：2001年11月6日)

Abstract : Narrowed dental pulp cavities and obturated root canals produced by diffuse calcification and pulp stone are often observed in advanced periodontal disease. Possibly inflammatory cytokines following periodontitis may have served as the stimulus inducing the pulp calcification, but the details are not clear.

The purpose of this study was to investigate the relation between pulp calcification and the bone morphogenetic proteins (BMPs) expressed in the dental pulp cells of advanced periodontitis cultivated *in vitro*, and to analyze the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulation on the expression of BMPs. The calcification process of the dental pulp cells was examined by alcian blue staining, von Kossa staining, immunostaining methods (BMP-2, BMP-4, osteonectin, osteocalcin and OB-cadherin) and mapping with combined microanalyzers. The mRNA expression of BMP-2, BMP-4 and transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) was investigated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. Dental pulp cells formed some nodules at 4 weeks of the cultivation in the medium without ascorbic acid and β -glycerophosphate. They included alcian blue-positive glucosaminoglycans, osteonectin, osteocalcin and TGF- β 2. The cells in the periphery of nodules seemed to be differentiated odontoblastic cells. The nodules showed calcification at 8 weeks after cultivation by mapping with combined microanalyzers and von Kossa staining. The nodules were positive for BMP-2 and BMP-4 at 4 and 8 weeks after cultivation. BMP-4 expression increased with TNF- α stimulation, while BMP-2 expression decreased. The results suggest that TNF- α probably serves as a kind of stimulus in dental pulp calcification of teeth with periodontitis.

Key words : dental pulp, calcification, bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor- α

緒 言

高度歯周炎罹患歯の治療に際しては、術後の咬合回復や疼痛軽減のために、抜髄処置を余儀なくされる症例にしばしば遭遇する。このような症例の抜髄処置の際に、第二象牙質の増生に

伴う歯髓腔の狭窄や根管の閉鎖、歯髓内石灰化物に遭遇することは決して少なくない¹⁾。これらのことは歯周炎が歯髓細胞による石灰化結節の形成を誘導する何らかの刺激を与えている可能性を推測させるものである。しかし、歯周炎でみられるどのような刺激が歯髓細胞の石灰化

BMP expression in the cultivated dental pulp cells and the effect of TNF- α stimulation

Takahiko SATO

(Department of Periodontology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Iwate 020-8505, Japan)

機序に作用するかについては明らかにされていない。

歯髓組織内の石灰化を惹起する要因については、臨床的には外傷^{2,3)}、カリエス⁴⁾、咬耗などのほか、全身的要因として、副腎皮質ホルモンの投与⁵⁾、加齢^{6,7)}等が知られている。歯髓および歯乳頭組織由来の線維芽細胞は *in vitro* でアルカリフォスファターゼ活性を有し、石灰化結節を形成する⁸⁻¹³⁾。培養歯髓細胞を用いた研究では現在までに、アルカリフォスファターゼの他に、bone morphogenetic protein (BMP)^{8,14,15)} や osteocalcin¹⁶⁾ が歯髓細胞に発現していることが報告されている。また、正常歯髓組織やそれらの継代初期の培養細胞による石灰化結節の形成過程には、コラーゲンの合成や結節内にカルシウム沈着が認められている¹⁴⁾。しかし、歯周炎罹患歯の歯髓組織由来の培養細胞の性状と石灰化結節の形成との関連、さらに石灰化結節の形成過程について検討した報告は見当たらない。*In vivo* においても、歯周炎と歯髓組織内の石灰化物形成との関連性は現段階では明らかにされていない。そこで本研究では、歯周炎罹患歯から採取した歯髓組織の培養歯髓細胞が *in vitro* で石灰化結節を形成し得るかどうかを、結節状細胞集簇部の石灰化過程を主体に検討した。また、培養細胞の細胞学的性状を明らかにするために、石灰化結節形成過程において、培養細胞から象牙芽細胞への分化が見られるか否かについて、象牙芽細胞のマーカーとされる transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2)²⁰⁾ について検討した。さらに、石灰化過程の BMP 発現と炎症性サイトカインのひとつである tumor necrosis factor- α (TNF- α) の BMP 発現におよぼす作用についても検討した。

材 料 と 方 法

1. 歯髓細胞の採取と培養

岩手医科大学歯学部附属病院第二保存科を受診した歯周炎患者のうち、治療上抜歯処置が必要であったものに研究内容を説明し、了解の得られた7名(男性4名、女性3名)(Table 1)

を対象とした。抜歯処置時に無菌的に採取した歯髓は、10%牛胎仔血清(FBS)、100units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、3 μ g/ml アムホテリシン B を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (ニッスイ、以下 D-MEM) を用いて explant 法にて 60 mm ディッシュ (NUNCLONTM, NUNC) に培養した。培養条件は 5%CO₂、37℃で、初代は 6～8 週間培養し、2 代目以降は 3～4 週間培養した後、細胞を継代培養した。継代方法は細胞を 0.25%トリプシン-0.05%EDTA 溶液処理にてディッシュから剥離し、培地を加えて 4 分の 1 の濃度に希釈した細胞懸濁液を等量ずつ 4 枚のディッシュに分注した。培地は 2～3 日おきに交換し、4～10 代継代培養した細胞を以下の実験に用いた。

従来から *in vitro* の石灰化に必須の物質としてアスコルビン酸 (Sigma-Aldrich ; 以下 Asc) と β グリセロリン酸ナトリウム (ナカライテスク ; 以下 β -Gp) が培地に添加されているが、Asc および β -Gp の培養細胞に対する作用についてはコラーゲン合成に及ぼす効果なども含めて充分には解明されていないことから本実験ではすべて Asc 非添加- β -GP 非添加培地で行うこととした。

2. 培養歯髓細胞による結節状構造物の観察

位相差顕微鏡下で細胞が集簇し、結節状構造物が観察されるようになった培養 4 週後と、その中に不透過物が観察されるようになった 8 週後の石灰化結節について組織学的検討を行った(培養 4 週後の細胞集簇部の結節状構造物と培養 8 週後の石灰化結節との両者をまとめて以下 nodule と表す)。スライドガラス上の培養細胞をリン酸緩衝液(phosphate buffered saline ; PBS, ニッスイ)で 2 回洗浄し、ブアン液で室温 30 分間固定した。酸性粘液多糖類をアルシアン青 (PH2.5) で、また膠原線維や細網線維を渡辺鍍銀法で染色し、カルシウム塩を von Kossa 染色で検出した¹⁷⁾。

Table 1. Cases used for sampling dental pulp tissues and clinical characteristics of the teeth.

| Case No. | age | sex | tooth number | pocket depth (mm) | DBR | BOP | pus discharge |
|----------|-----|-----|--------------|-------------------|-----|-----|---------------|
| 1 | 67 | M | 47 | 8 | 3 | + | + |
| 2 | 44 | M | 21 | 5 | 2 | + | + |
| 3 | 52 | F | 23 | 2 | 1 | — | — |
| 4 | 41 | F | 43 | 4 | 1 | — | — |
| 5 | 55 | F | 11 | 3 | 2 | — | — |
| 6 | 62 | M | 22 | 8 | 3 | + | + |
| 7 | 56 | M | 26 | 6 | 2 | + | + |

DBR: degree of bone resorption

BOP: bleeding on probing

3. コンバインド・マイクロアナライザーによるカルシウムとリンのマッピング像の検出

培養歯髄細胞を縦18mm, 横9mmにカットしたカバーガラス (MATSUNAMI) 上に細胞密度 3×10^4 /well で播き込んだ後, 培地交換のみを行い, 4 週, 6 週, 8 週の各期間培養を続けた。これらの期間培養した細胞は2.5%グルタルアルデヒド (pH7.4, 4°C) 溶液に30分間浸漬して固定した。次いでエタノール上昇系列で脱水した後, 凍結乾燥 (ID-2, Eiko) し, カーボンでコーティングした。さらに導電性塗料 (DOTITE XC-12, 日新 EM) で試料台との導通を取り, コンバインド・マイクロアナライザー (JXA-8900L, JEOL) によって nodule 部位を二次電子像で確認し, カルシウム (Ca) とリン (P) のマッピング像を観察した。

4. 培養歯髄細胞における BMP および骨基質蛋白質の免疫組織化学的検索

培養歯髄細胞をカルチャースライド上に細胞密度 3×10^4 /well で播き込み, 4 週間および 8 週間培養した。培養後, 血清の作用を無効化するために無血清 D-MEM に置換し, 8 時間経過後に固定を行った。

免疫組織化学的染色は以下の方法で行った。培養歯髄細胞を PBS で 2 回洗浄し, ブアン液で室温30分間固定した。内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために0.3%過酸化水素添加メタノール液に10分間浸漬した。PBS-Tween 20 (PBST) で 5 分間洗浄後, 非特異的反応を阻

害するために3%正常ロバ血清で10分間反応させ, 一次抗体として抗 BMP-2, あるいは BMP-4 ヤギ血清 (100倍希釈, Santa Cruz Biotechnology) を37°Cで90分間反応させた。反応終了後, PBST にて 5 分間ずつ 3 回洗浄を行った。次に二次抗体としてビオチン標識抗ヤギ IgG ロバ血清 (200倍希釈, Santa Cruz Biotechnology) を37°Cで45分間反応させた。反応終了後, PBST にて洗浄し, Avidin Biotin Complex (ABC 試薬, 和光) を滴下し, 15分間反応させてから PBST 洗浄後に発色させた。発色は 3, 3'-ジアミノベンチジン (DAB, 和光) 5 mg 1 錠を0.05M Tris-HCl (pH7.2) 50ml に溶解したものに過酸化水素水17 μ lを添加し, 10~15分間反応させて行った。その後 PBST で洗浄し, 超純水で 5 分間洗浄を行い, マイヤーのヘマトキシリンで核染した。次いでアルコール脱水, 透徹, 封入を行い光学顕微鏡にて観察した。また, BMP-2 と BMP-4 の免疫組織化学染色を行ったカルチャースライド (縦18mm, 横9mm) の全培養面を写真撮影し, 写真上でそれぞれ陽性を示した nodule 数を算定した。得られた数値を paired *t*-test を用いて統計分析を行った。

さらに, 培養 4 週後の細胞については, 抗 osteonectin 抗体 (マウスモノクローナル抗体, 200倍希釈, エル・エス・エル), 抗 osteocalcin ウサギ血清 (500倍希釈, テイジン生物医学総合研究所, 石塚誠一氏より供与された), 抗 OB-cadherin 抗体 (マウスモノクローナル抗

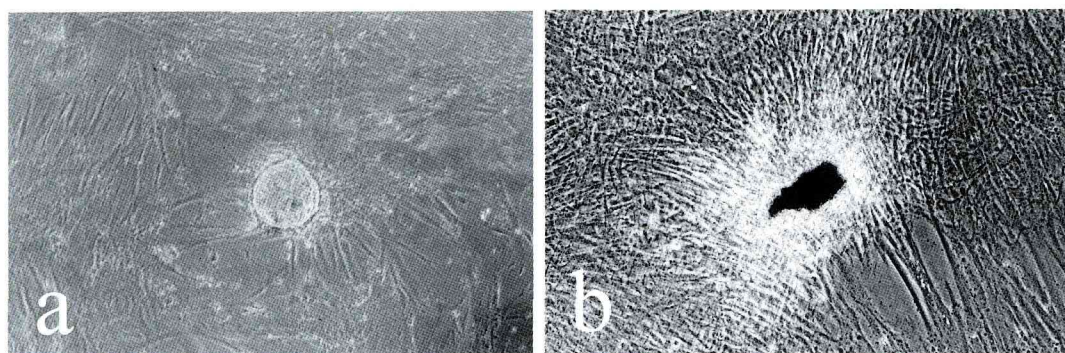


Fig. 1. Phase-contrast micrograph of cultivated dental pulp cells. a : at 4 weeks of cultivation. b : at 8 weeks of cultivation. (x 100, case No.5, 6 passages)

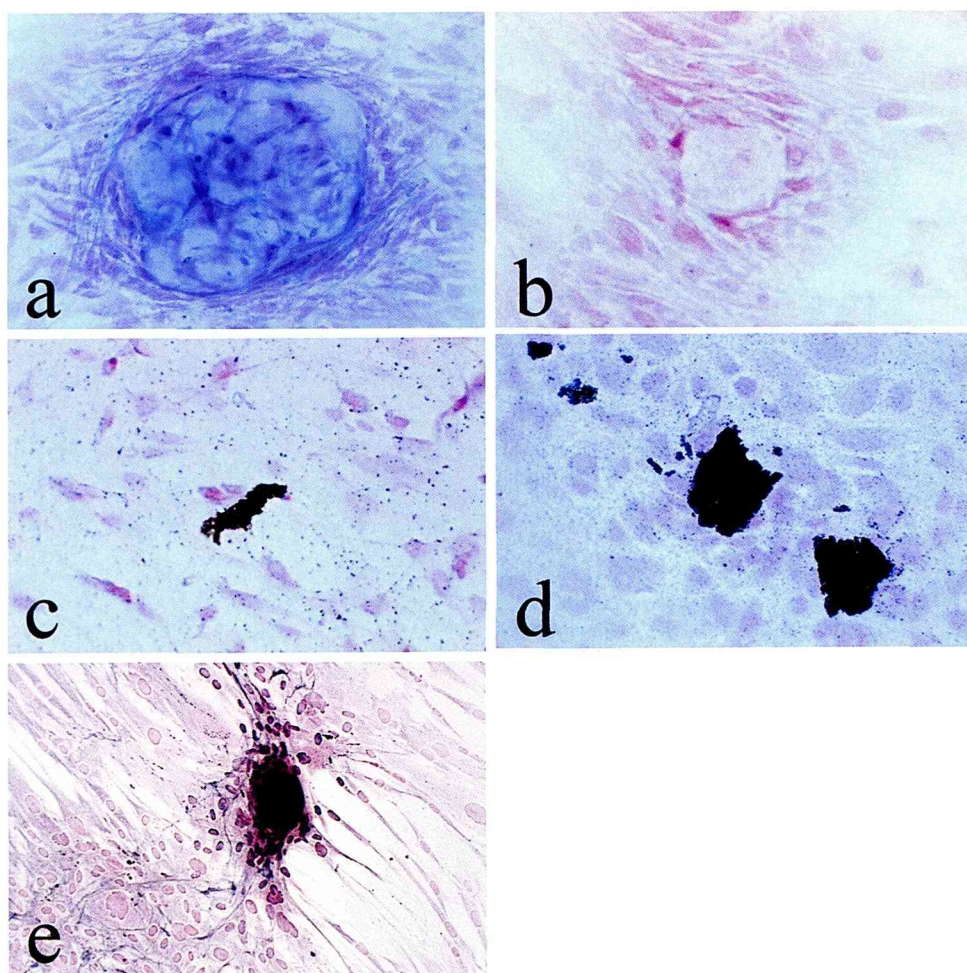


Fig. 2. Light micrograph of cultivated dental pulp cells. a : alcian blue staining at 4 weeks of cultivation. (x 400, case No.2, 7 passages)
 b : von Kossa staining at 4 weeks of cultivation. (x 400, case No.2, 7 passages)
 c : von Kossa staining at 6 weeks of cultivation. (x 400, case No.2, 7 passages)
 d : von Kossa staining at 8 weeks of cultivation. (x 400, case No.2, 7 passages)
 e : Reticulin silver impregnation at 4 weeks of cultivation. (x 200, case No.4, 7 passages)
 Counterstain is Kernechtrot.

体, 200倍希釈, Santa Cruz Biotechnology) を一次抗体として用い, ペルオキシダーゼ標識 DAKO Envision+ 試薬による酵素抗体法を行った。

5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による検索

培養歯髄細胞の BMP-2 と BMP-4 の mRNA 発現に及ぼす tumor necrosis factor- α (upstate® biotechnology; 以下 TNF- α) の影響を RT-PCR 法と前述した免疫組織化学的染色とで検討した。

培養歯髄細胞を 24 穴プレート (NUNCTM, NUNC) 上に細胞密度 3×10^4 /well で播き込み, 4 週間および 8 週間培養した。無血清 D-MEM に置換し, 8 時間経過後, 超純水で溶解した TNF- α (50ng/ml) を添加し, 24 時間作用させた。24 穴プレートから培養歯髄細胞を回収し, RNA 抽出用試薬 (TRIzol®, GIBCOBRL) を 500 μ l 加え, -80°C で凍結保存した。ランダムプライマー法を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した。

BMP-2 のプライマーは Hatakeyama ら¹⁸⁾, BMP-4 は Ogose ら¹⁹⁾ の報告に従い作製したプライマーを使用した。PCR の条件は BMP-2 が 94°C 2 分, 56°C 2 分, 72°C 3 分の 33 サイクルで, BMP-4 が 94°C 2 分, 56°C 2 分, 72°C 3 分の 34 サイクルとした。TGF- β 2 のプライマーと PCR 条件については吉田²⁰⁾ の報告に従って行った。各 BMP および TGF- β 2 mRNA の発現を 1.8% アガロースゲルで電気泳動して検出した。

結 果

1. 歯髄細胞の初代培養

組織片から outgrowth した初期の培養歯髄細胞は緩やかに増殖したが, 培養 4 週目を過ぎた頃から細胞増殖が活発になり, 培養 6~8 週目でコンフルエントになった。

7 例の初代培養の中で培養歯髄細胞の形態と増殖性には症例により多少違いが観察された。

すなわち, 40 歳代の患者 (caseNo2, 4) から得られた細胞は小型で紡錘形を示し, 増殖性に富んでいたが, 60 歳代の患者 (caseNo1, 6) からの細胞はやや大型で増殖性は低かった。しかし, いずれも継代後 3 週間を過ぎると細胞の集簇部が観察されるようになり, 4 週目には nodule が認められた。

2. 培養歯髄細胞による石灰化結節の形成

培養歯髄細胞は, 紡錘形の線維芽細胞様の形態を呈して増殖し, 培養 10~14 日目でコンフルエントに達した。そのまま継代せずに培地交換のみを行うと, 3 週後には細胞は集簇し, そこに nodule が形成され始めた。Nodule 周囲の細胞は多角形で, また nodule 内に細胞が埋入しており, 埋入した細胞間には細胞間物質が認められた。この段階の位相差顕微鏡による観察では培養細胞に不透過像は認められなかった (Fig. 1 a)。しかし, 培養 6~8 週後には nodule は球形となり増大し, 位相差顕微鏡による観察では内部が網目状になり, 中心部に不定形の不透過部が確認された (Fig. 1 b)。

培養 4 週後, nodule 内の細胞間物質はアルシアン青染色により青色に染色された (Fig. 2 a)。Nodule の von Kossa 染色による観察では, 培養 4 週後に黒褐色物は検出されず (Fig. 2 b), 6 週後に黒褐色の顆粒物が検出され (Fig. 2 c), 培養 8 週後に nodule 部位に黒色不正形の明瞭な構造物が認められた (Fig. 2 d)。鍍銀染色では, 培養 4 週後の nodule 内から周辺部に放散するコラーゲン線維が認められ, これが細胞の走向と交錯するように伸び, 網目状を示した (Fig. 2 e)。

3. 培養歯髄細胞の nodule 形成におけるカルシウムとリンの分布

歯髄細胞培養後 4 週および 6 週目の Ca と P の分布をマッピング像で調べたところ, 細胞集簇部位に形成された nodule に P は全く検出されず, Ca がごく微量に検出された。培養 8 週後の歯髄細胞をコンバインド・マイクロアナライ

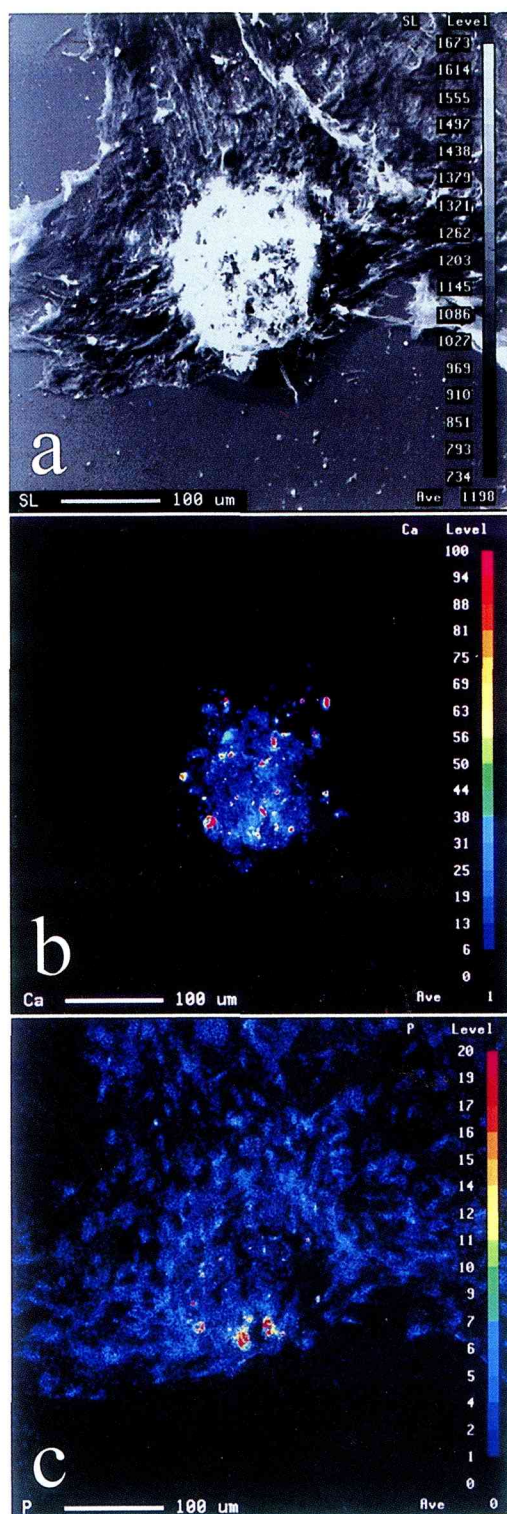


Fig. 3. Mapping image of cultivated dental pulp cells for 8 weeks of cultivation.

a : secondary electron image, b : Ca, c : P (case No.4, 7 passages)

ザーの二次電子像で分析したところ nodule 形成部位で不透過像が確認された (Fig. 3 a)。同一部位の Ca のマッピング像を調べたところ、Ca は nodule 内のみ高レベルで検出された (Fig. 3 b)。一方、P は Ca より微量であったが、nodule 内より nodule 辺縁部に多く検出された (Fig. 3 c)。

4. BMP と骨基質蛋白質の免疫組織化学的検索

培養 4 週後の免疫組織化学染色では、細胞集簇部は BMP-2, BMP-4 の両方に陽性を示した (Fig. 4 c, f)。また、細胞質に BMP-2 および BMP-4 に明らかな陽性を示す細胞が認められた (Fig. 4 a, b, d, e)。

培養 4 週と 8 週後における BMP-2 および BMP-4 陽性 nodule 数を計測し、統計分析した結果 (Table 2), 培養 4 週後において BMP-2 陽性 nodule 数は 28.75 ± 3.77 個, BMP-4 陽性 nodule 数は 16.75 ± 4.57 個であり、両者間に有意差が認められた ($P < 0.01$)。また、BMP-2 陽性 nodule 数と BMP-4 陽性 nodule 数は培養 4 週から 8 週にかけて顕著に増加し、培養 8 週後では BMP-2 陽性 nodule 数は 142.67 ± 25.32 個, BMP-4 陽性 nodule 数は 140.00 個とほぼ同数になった。

また、培養 4 週後の歯髄細胞の nodule 部において、骨基質中に含まれる非コラーゲン性蛋白質の免疫組織化学染色の結果、nodule 部には osteonectin (Fig. 5 a) と osteocalcin (Fig. 5 b) が陽性で、OB-cadherin (Fig. 5 c) は陰性であった。

5. Nodule 形成におよぼす TNF- α の影響

1) 免疫組織化学的検索

培養 4 週後および 8 週後の歯髄細胞について TNF- α 添加群と非添加群では、BMP-2 と

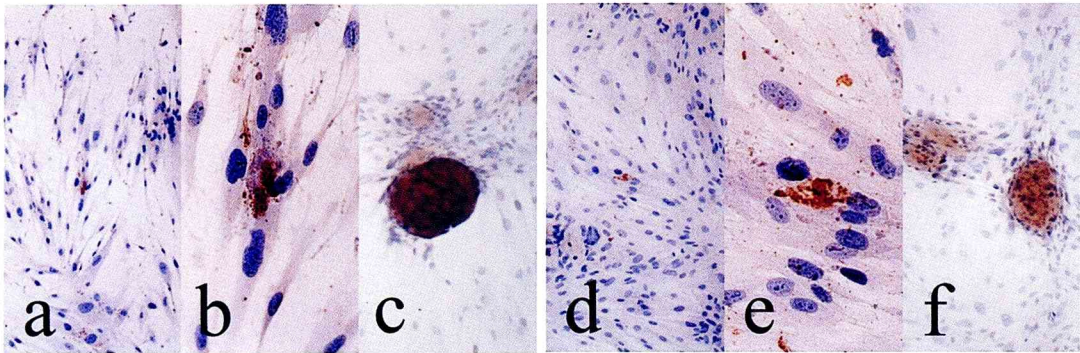


Fig. 4. Immunohistochemical staining for BMP-2 (a, b, c) and BMP-4 (d, e, f) in cultivated dental pulp cells at 4 weeks of cultivation. a, b : The cytoplasm of pulp cells is positive for BMP-2. c : A nodule is positive for BMP-2. d, e : The cytoplasm of pulp cells is positive for BMP-4. f : Nodules are positive for BMP-4.
a, c, d, f : x100, b, e : x400 (case No.5, 6 passages)

Table 2. The number of BMP-positive nodules in the absence and presence of TNF- α at 4 and 8 weeks of cultivation.

| Cultivation period (W) | Number of BMP-2 positive nodules | | Number of BMP-4 positive nodules | |
|---------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|
| | TNF- α | | TNF- α | |
| | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 4 | 28.75 \pm 3.77 (n=4) | 17.75 \pm 5.56 (n=4) | 16.75 \pm 4.57 (n=4) | 25.25 \pm 12.28 (n=4) |
| | <div style="text-align: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 40px;"></div> <div style="text-align: center;">*</div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 40px;"></div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 100px;"></div> <div style="text-align: center;">**</div> <div style="border-top: 1px solid black; width: 100px;"></div> </div> </div> | | <div style="text-align: center;"> <div style="border-top: 1px solid black; width: 100px;"></div> </div> | |
| 8 | 142.67 \pm 25.32 (n=3) | 76.67 \pm 21.73 (n=3) | 140.00 (n=2) | 168.50 (n=2) |

Statistically significant *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

BMP-4 の免疫組織化学的染色性に違いはみられなかった。TNF- α を添加した場合、BMP-2 陽性 nodule 数は培養 4 週後 ($P < 0.05$) と培養 8 週後ともに減少した。一方、BMP-4 陽性 nodule 数は培養 4 週後において増加したが、培養 8 週後においてはやや増加した (Table 2)。

2) RT-PCR 法による検索

培養 4 週後の歯髓細胞から cDNA を作製し、PCR を行った。その結果、TNF- α 添加によって BMP-2 mRNA 発現は減少し、BMP-4 mRNA 発現が増加した (Fig. 6)。この結果は前述の培養 4 週後における BMP-2 あるいは BMP-4 陽性 nodule 数の計測結果と一致した。

また、培養 4 週後の歯髓細胞において既に TGF- β 2 の発現が認められ、培養 8 週後ではそ

の発現は培養 4 週後よりもさらに増強していた (Fig. 7)。

考 察

胎生期歯乳頭由来の培養細胞や成人の第三大臼歯の健康な歯髓組織由来の培養線維芽細胞など歯周炎に罹患していない歯に由来する歯髓細胞が *in vitro* において石灰化能を現し、石灰化結節 (mineralized nodule) を形成することは既に報告されている⁹⁾。本実験における培養歯髓細胞も細胞集簇部として nodule を形成し、これらの nodule は最終的に石灰化した。すなわち、歯周炎罹患歯の歯髓組織由来の培養細胞もまた石灰化物を形成することが明らかになった。

培養系において歯髓細胞と近似した石灰化能

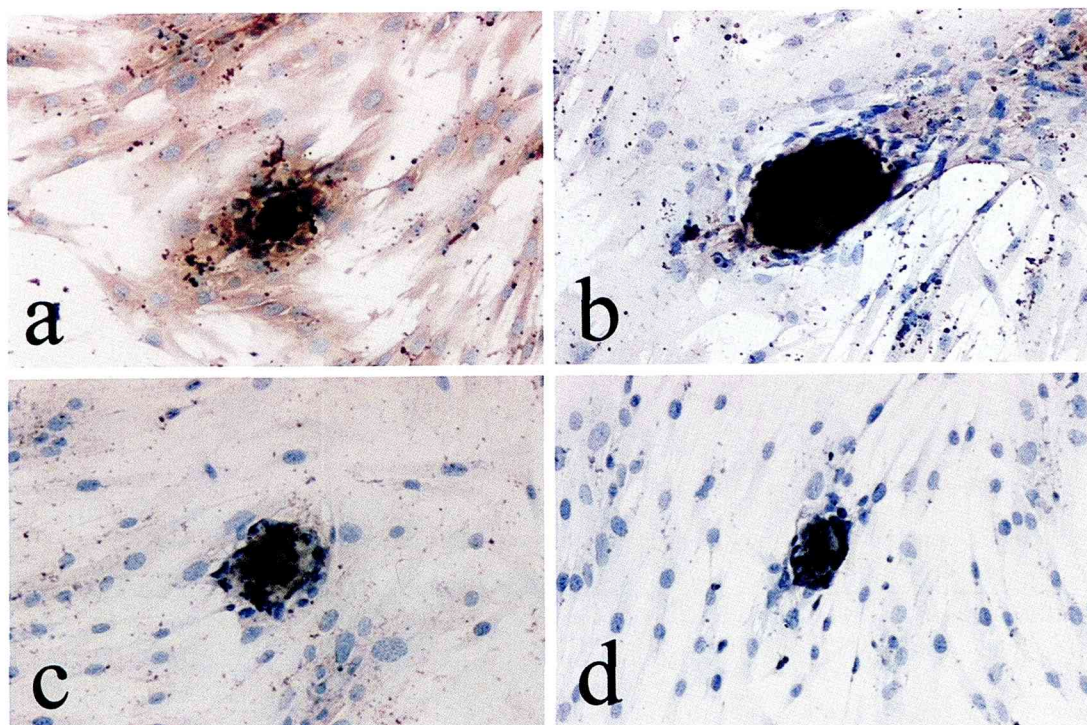


Fig. 5. Immunohistochemical staining for non-collagenous bone matrix proteins in cultivated dental pulp cells at 4 weeks of cultivation. a : osteonectin, b : osteocalcin, c : OB-cadherin, d : negative control (x 350, case No.7, 9 passages)

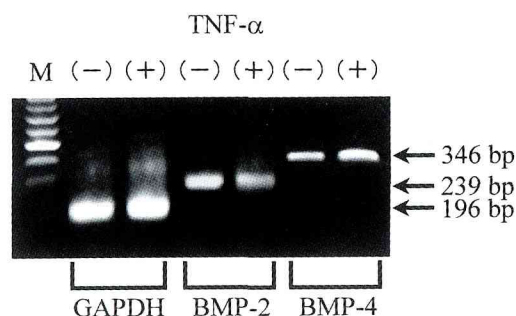


Fig. 6. RT-PCR for BMP-2 and BMP-4 mRNA expression by TNF- α stimulation in cultivated dental pulp cells at 4 weeks. (case No.4, 7 passages)

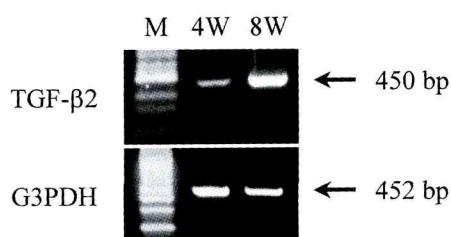


Fig. 7. RT-PCR for TGF- β 2 mRNA expression in cultivated dental pulp cells at 4 weeks and 8 weeks. (case No.4, 7 passages)

を有するマウス骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 -E 1) は、線維芽細胞様であり、コンフルエント後は骨基質を産生・分泌し、結節部に石灰化がおこる。また、コラーゲン線維を産生し線維間に基質小胞を分泌し、ハイドロキシアパタイトがこの小胞に沈着し、石灰化が始まる²¹⁾。すなわち、MC 3 T 3 -E 1 細胞は膜性骨化と同様な

石灰化を示す。したがって、本実験の歯髄細胞の石灰化物形成過程は、少なくともコラーゲン合成・マトリックスの産生分泌までは膜性骨化と同様なメカニズムによるものと推察される。そして、その後、結節内に細胞を封入したまま、同部にカルシウムの沈着が起こったものと考えられた。また、この石灰化の過程では骨小胞や

骨細胞の封入などは見られなかった。

歯髄組織内の石灰化物は象牙粒と、びまん性の石灰化物に分けられる^{7, 22)}。象牙粒には象牙細管と象牙芽細胞を伴う真性象牙粒とこれらの構造をもたない粒状の石灰化物である仮性象牙粒の両者がある。本実験で観察された石灰化物には骨組織の層板構造も象牙質の特徴である象牙細管も見られなかったが、球状の形態をしており、形態的には仮性象牙粒を思わせた。About 12²⁾は歯髄由来の培養細胞が象牙質基質を産生すると報告した。本実験において、nodule 形成に関わる周囲の細胞は osteonectin 陽性であったが、一方で骨芽細胞に特異的に検出される OB-cadherin は陰性であり、また RT-PCR による TGF- β 2 mRNA の発現という象牙芽細胞の形質を表現しており、象牙芽細胞様細胞に分化したことが推察された。

1965年 Urist²³⁾は脱灰骨からの抽出物を筋組織内あるいは皮下組織に埋植するとその部位に骨あるいは軟骨組織が形成されるという現象を見いだした。1988年 Wozney ら²⁴⁾により、BMP-2, BMP-3, BMP-4 の遺伝子が初めて報告された。現在では30種類もの BMP ファミリー蛋白質が同定されており、TGF- β やアクチビンなどと共に、その構造の相同性に基づいて TGF- β スーパーファミリーに分類されている^{25, 26)}。BMP-2 と BMP-4 は強力な異所性骨誘導活性を有するが、この他に発生期の形態形成や生体機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。歯髄の細胞が BMP を発現していることは報告されており^{14, 27)}、本研究においても培養4週後および8週後で培養歯髄細胞の細胞質および nodule 内に BMP-2 と BMP-4 の発現が確認された。Nakashima ら¹⁴⁾は BMP-4 は α 1 (I) コラーゲン mRNA を増加させることから細胞基質蛋白の合成を調節し、BMP-2 は osteocalcin 合成を増加させたことから歯髄細胞の象牙芽細胞への分化誘導を調節すると考えた。本実験の結果でも BMP-2 発現が BMP-4 発現より早く見られたことから BMP-2 による歯髄細胞の象牙

芽細胞様細胞への分化が起こり、その後 BMP-4 発現により基質成分の産生が増強されたのではないかと考えられた。

TNF- α は歯周炎の発症と進展において必須の因子であり、また関節リウマチなどの炎症性病変や閉経後の骨粗鬆症の鍵となる因子でもある。TNF- α は骨組織の微細環境でも産生され、骨芽細胞や破骨細胞に多様な作用を与えることが報告されている²⁸⁾。TNF- α は DNA 合成、コラーゲン合成阻害²⁹⁾、osteocalcin 遺伝子発現の阻害³⁰⁾、そしてプラスミノゲンアクチベーターやマトリックスメタロプロテアーゼ³¹⁾、インターロイキン (IL-6³²⁾, IL-1 β ³³⁾) の合成促進などの作用を骨系細胞やマクロファージなどに及ぼす。さらに、BMP-2 と BMP-4 のアルカリフォスファターゼ誘導活性が IL-1 β 刺激によって亢進し TNF- α 刺激で阻害されることがわかり³⁴⁾、BMP の骨形成誘導作用が免疫/炎症性サイトカインによって調節されることが示されている。

本実験で、RT-PCR による BMP-2 や BMP-4 の遺伝子発現と免疫組織化学的染色結果から、TNF- α は BMP-2 mRNA の遺伝子発現を減少させ、TNF- α 刺激によって BMP-2 の down-regulation が起こることが明らかになった。

一方、本実験で TNF- α は BMP-4 mRNA の発現を亢進させた。ヒト Meningioma において異所性の石灰化物である Psammoma body が知られているが、この Meningioma tissue は BMP-2 mRNA を発現しておらず、BMP-4 mRNA を発現していた³⁵⁾。Psammoma body に関する研究は石灰化の過程には BMP-4 が関与していることを示唆している。歯周炎の炎症部位に局在する TNF- α がどのような経路で歯髄細胞に作用するのかは明らかにされていないが、TNF- α による BMP-4 の up-regulation は歯周炎罹患歯にみられる石灰化物形成刺激のひとつと考えられる。

結 論

歯周炎患者から採取した歯髓組織由来の培養細胞を検索対象として、その石灰化現象と BMP との関連、炎症性サイトカイン TNF- α の及ぼす影響を検討したところ、以下の結論を得た。

1. 培養歯髓細胞は培養 4 週後で nodule を形成し、培養 8 週後で nodule の石灰化が確認された。
2. 石灰化に至る前の段階で nodule は alcian blue, BMP-2, BMP-4, osteonectin, osteocalcin 陽性を示し、それらが歯髓石灰化現象において重要な役割を果たしていると考えられた。
3. TGF- β 2 の遺伝子発現が認められ、培養歯髓細胞に象牙芽細胞様細胞への分化が示唆された。
4. TNF- α は BMP-2 発現を抑制する一方、BMP-4 発現を増加させ、歯周炎罹患歯における石灰化亢進の刺激となっている可能性を推察させた。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究に際し終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座上野和之教授ならびに、直接のご指導を賜りました歯科保存学第二講座八重柏隆講師に深甚なる感謝の意を表します。ご校閲とご助言をいただきました本学口腔病理学講座佐藤方信教授、口腔診断学戸塚盛雄教授に厚く御礼申し上げます。本研究の遂行に際し、数々のご教示とご助言をいただきました口腔病理学講座畠山節子講師に深く感謝いたします。さらに、本学電子顕微鏡室吉田康夫専門技術員に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に際し、ご指導ご助力いただきました岩手医科大学歯学部第二保存科医局員の皆様から御礼申し上げます。

本研究の一部は文部省科学研究費（課題番号 09307045, 10307047）および岩手医科大学ハイ

テクリサーチセンター研究費の補助を受けて行われた。

本論文の要旨は、第44回春季日本歯周病学会学術大会（2001年4月、新潟）、第79回国際歯科研究学会（2001年6月、千葉）、第10回硬組織生物学会総会（2001年8月、盛岡）において発表した。

文 献

- 1) Gregory, W. B.: Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surg.* 37 : 257-270, 1974.
- 2) Piattelli, A.: Pulp obliteration: A histological study. *J. Endod.* 19 : 252-254, 1993.
- 3) Robertson, A., Lundgren, T., Andreasen, J. O., Dietz, W., Hoyer, I., Noren, J. G.: Pulp calcifications in traumatized primary incisors. A morphological and inductive analysis study. *Eur. J. Oral Sci.* 105 : 196-206, 1997.
- 4) Piattelli, A.: Generalized "complete" calcific degeneration or pulp obliteration. *Endod. Dent. Traumatol.* 8 : 259-263, 1992.
- 5) Gold, S. I.: Root canal calcification associated with prednisone therapy : A case report. *JADA.* 119 : 523-525, 1989.
- 6) Nitzan, D. W., Michaeli, Y., Weinreb, M., Azaz B.: The effect of aging on tooth morphology : A study on impacted teeth. *Oral Surg.* 61 : 54-60, 1986.
- 7) Seltzer, S.: Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg.* 72 : 721-745, 1991.
- 8) Nakashima, M.: Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg.* 73 : 484-489, 1992.
- 9) 柴秀樹：ヒト培養歯髓細胞の石灰化能に関する研究，*廣大歯誌*，25 : 58-71, 1993.
- 10) 宮里尚幸，小俣秀人，真田一男，勝海一郎：ヒト歯髓および歯根膜由来培養線維芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性とオステオカルシン合成に及ぼす L-アスコルビン酸 2-リン酸の影響，*日歯保存誌*，41 : 1101-1113, 1998.
- 11) Hao, J. J., Shi, J. N., Niu, Z. Y., Xun, W. X., Yue, L., Xiao, M. Z.: Mineralized nodule formation by human dental papilla cells in culture. *Eur. J. Oral Sci.* 105 : 318-324, 1997.
- 12) About, I., Bottero M-J., Denato, P., Camps, J., Franquin, J-C., Mitsiadis, T. A.: Human dentin production *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 258 : 33-41, 2000.
- 13) Abe, Y., Aida, Y., Abe, T., Hirofujii, T., Anan, H., Maeda, K.: Development of mineralized nodules

- in fetal rat mandibular osteogenic precursor cells : Requirement for dexamethasone but not for β -glycerophosphate. *Calcif. Tissue Int.* 66 : 66-69, 2000.
- 14) Nakashima, M., Nagasawa, H., Yamada, Y., Reddi, A. H.: Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev. Bio.* 162 : 18-28, 1994.
 - 15) Gu, K., Smoke, R. H., Rutherford, R. B.: Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Archs. Oral Biol.* 41 : 919-923, 1996.
 - 16) Ranly, D. M., Thomas, H. F., Chen, J., MacDougall M.: Osteocalcin expression in young and aged dental pulps as determined by RT-PCR. *J. Endod.* 23 : 374-377, 1997.
 - 17) 影山圭三 監修, 慶応義塾大学医学部病理学教室 編集: 病理組織標本の作り方, 第4版, 医学書院, 東京, 141-142, 107-109, 208-209, 1973.
 - 18) Hatakeyama, S., Gao, Y.-H., Ohara-Nemoto, Y., Kataoka, H., Satoh, M.: Expression of bone morphogenetic proteins of human neoplastic epithelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42 : 497-505, 1997.
 - 19) Ogoe, A., Motoyama, T., Hotta, T., Watanabe, H., Takahashi, H. E.: Bone formation in vitro and in nude mice by human osteosarcoma cells. *Virchows Archiv.* 426 : 117-125, 1995.
 - 20) 吉田清司: 培養ヒト歯髄細胞が産生する TGF- β isoform に関する研究, 日歯保存誌, 44 : 194-203, 2001.
 - 21) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S.: *In vitro* differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96 : 191-198, 1983.
 - 22) Arys, A., Philippart, C., Dourov, N.: Microradiography and light microscopy of mineralization in the pulp of undemineralized human primary molars. *J. Oral Pathol. Med.* 22 : 49-53, 1993.
 - 23) Urist, M. R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150 : 893-899, 1965.
 - 24) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mittleman, B., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242 : 1528-1534, 1988.
 - 25) Kingsley, D. M.: The TGF- β superfamily : New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Dev.* 8 : 133-146, 1994.
 - 26) 酒匂崇, 石堂康弘: BMP 研究の進歩—オーバービュー—, 整・災外, 42 : 913-918, 1999.
 - 27) Takeda, K., Oida, S., Goseki, M., Iimura, T., Maruoka, Y., Amagasa, T., Sasaki, S.: Expression of bone morphogenetic proteins genes in the human dental pulp cells. *Bone* 15 : 467-470, 1994.
 - 28) Kurokouchi, K., Kambe, F., Yasukawa, K., Izumi, R.: TNF- α increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NF- κ B in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J. Bone Miner. Res.* 13 : 1290-1299, 1998.
 - 29) Nanes, M. S., Mckoy, W. M., Marx, S. J.: Inhibitory effects of tumor necrosis factor- α and interferon- γ on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). *Endocrinology* 124 : 339-345, 1989.
 - 30) Kuno, H., Kurian, S. M., Hendy, G. N., White, J., Deluca, H. F., Evans, C.-O., Nanes, M. S.: Inhibition of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulated osteocalcin gene transcription by tumor necrosis factor- α : Structural determinants within the vitamin D response element. *Endocrinology* 134 : 2524-2531, 1994.
 - 31) Panagakos, F. S., Kumar, S.: Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Inflammation* 18 : 243-265, 1994.
 - 32) Passeri, G., Girasole, G., Manolagas, S. C., Jilka, R. L.: Endogenous production of tumor necrosis factor by primary cultures of murine calvarial cells: Influence on IL-6 production and osteoclast development. *Bone and Mineral.* 24 : 109-126, 1994.
 - 33) Chaudhary, L. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L.: Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : Lack of regulation by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 130 : 2528-2534, 1992.
 - 34) Nakase, T., Takaoka, K., Masuhara, K., Shimizu, K., Yoshikawa, H., Ochi, T.: Interleukin-1 β enhances and tumor necrosis factor- α inhibits bone morphogenetic proteins-2-induced alkaline phosphatase activity in MC 3 T 3 -E 1 osteoblastic cells. *Bone* 21 : 17-21, 1997.
 - 35) Hirota, S., Nakajima, Y., Yoshimine, T., Kohri, K., Nomura, S., Taneda, M., Hayakawa, T., Kitamura, Y.: Expression of bone-related protein messenger RNA in human meningiomas : Possible involvement of osteopontin in development of psammoma bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54 : 698-703, 1995.