

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：42723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11233

研究課題名(和文) Er:YAGレーザー併用によるサイトカイン療法の象牙質および歯周組織再生効果

研究課題名(英文) Regenerative effect of dentin and periodontal tissue by cytokine therapy induced due to Er:YAG laser combination

研究代表者

小林 一行 (Kobayashi, Kazuyuki)

鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授

研究者番号：70288116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：hPDL細胞においてEr:YAGレーザー照射により組織再生に関わる細胞増殖や分化を制御する重要なサイトカインであるTGF- β が活性化された。しかしながら、直接活性化はされず、その活性化にはMMP-2、MMP-3、MMP-8の遺伝子発現が関与し、HSP90の関与も示唆された。
ブタ歯髄組織に対するEr:YAGレーザー照射はALP活性を上昇させる効果を有し、53、45、40 kDaのMMP活性や33 kDaのnon-MMP活性が認められた。ブタ歯髄組織由来の不活化細胞(PPU-7細胞)に対するレーザー照射では、MMP-2遺伝子発現の増強が認められ、TGF- β 活性への関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor-beta (TGF- β), which is an important cytokine that controls cell proliferation and differentiation, was activated in hPDL cells by Er:YAG laser irradiation. However, the direct activation was not done, and MMP-2, MMP-3, MMP-8 gene expression was involved in its activation, suggesting the involvement of HSP90.

Er:YAG laser irradiation on the porcine pulp tissue had an effect of increasing ALP activity, and MMPs activity of 53,45,40 kDa and non-MMP activity of 33 kDa were observed. Enhancement of MMP-2 gene expression was recognized by laser irradiation on immortalized cells (PPU-7 cells) derived from porcine pulp tissue, and it was considered to be involved in TGF- β activity.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：Er:YAGレーザー hPDL細胞 歯髄細胞(組織) TGF- β MMP プラスミン HSP

1. 研究開始当初の背景

近年、様々なレーザーの LLLT(Low reactive Level Laser Therapy)による生物学的効果が報告されているが、Er:YAG レーザーは他のレーザーとは異なり、軟組織だけでなく骨にも直接照射可能なレーザーである。Er:YAG レーザー治療は創傷治癒を促進することが知られており、低出力照射による歯肉線維芽細胞や骨芽細胞の増殖効果はそれを支持している。しかしながら、その作用機序は不明な点が多く、基本的なメカニズムが解明されれば治癒および再生促進に、より有効な治療手段として認識されることが考えられる。

象牙質形成能あるいは歯周組織再生能をもつと考えられる生理活性物質を臨床に応用する場合、適用する部位に存在する細菌や細菌由来の起炎物質を完全に除去することが重要である。しかしながら、これまでに生理活性物質適用部位の殺菌と再生との関係を調べた報告はない。そこで、細菌由来毒素や代謝産物除去、殺菌、さらには組織賦活作用もあると考えられる Er:YAG レーザーを用い、歯髄細胞や歯根膜細胞に照射を行った後、生理活性物質を作用させ、その効果を確認、検討し、さらに Er:YAG レーザー照射による TGF- β の活性化を中心に研究を行い、その作用機序解明の手掛かりを得る。

2. 研究の目的

細菌由来毒素や代謝産物除去、殺菌、さらには組織賦活作用もあると考えられる Er:YAG レーザーを用い、歯髄細胞や歯根膜細胞に照射を行った後、生理活性物質を作用させ、その効果を確認、検討し、さらに Er:YAG レーザーによる TGF- β の活性化を中心に研究を行い、作用機序解明の手掛かりを得る。

3. 研究の方法

<歯根膜細胞における研究>

レーザー装置・照射方法：Er:YAG レーザーを 50mJ・10pps・照射距離 2cm・スウィーピングモーションで 10 秒間照射を行った。

実験 1. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による ALP 活性

hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射の作用および生理活性物質添加後の作用を調べるため、hPDL 細胞を 96well プレートに培養し、Er:YAG レーザー照射後、象牙質タンパク質およびエナメルタンパク質をそれぞれ添加し 3・5・7 日間の培養後に ALP 活性の測定を行った。象牙質タンパク質としては、象牙質リンタンパク質(DPP)、象牙質シアロタンパク質(DSP)を、エナメルタンパク質としては、TRAP(tyrosine-rich amelogenin polypeptide)、20 kDa アメロゲニンを用い、各試料は生後約 5 カ月のブタ永久歯歯胚から抽出、分離、精製を行った。コントロールとしては PBS を、ポジティブコントロールとして TGF- β を使用した。

実験 2. SB 未添加・添加 hPDL 細胞における Er:YAG レーザー照射による ALP 活性

hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による TGF- β の作用確認のため、hPDL 細胞にレーザー照射を行い TGF- β I 型受容体の阻害剤である SB431542(SB)を未添加または添加培養後、3・5・7 日目に ALP 活性の測定を行った。

実験 3. Er:YAG レーザー照射による hPDL 細胞の増殖能および形態学的変化の観察

hPDL 細胞にレーザー照射を行い照射直後、培養後 3・5・7 日目に MTS アッセイを行ってレーザー照射による細胞増殖能を評価した。また、位相差顕微鏡を用いて細胞の形態学的変化の観察を行った。

実験 4. hPDL 細胞における Er:YAG レーザー照射 latent TGF- β 添加後の ALP 活性変化

Er:YAG レーザー照射による TGF- β の活性化について調べるため、latent TGF- β にレーザー照射後、hPDL 細胞に添加し 3・5・7 日間培養後に ALP 活性の測定を行った。

実験 5. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による MMPs (TGF- β 活性に関わる因子)の遺伝子発現およびその活性

遺伝子発現：レーザー未照射、照射群における培養 3・7 日目の MMP-2、MMP-3、MMP-8 遺伝子発現を調べるため、Quantitative リアルタイム PCR (qPCR)を行った。内部標準として GAPDH を使用し、MMPs の発現量を GAPDH 発現量 1 に対する割合で算出した。

ザイモグラフィ：proMMP-2、proMMP-3、proMMP-8 に対して Er:YAG レーザーを照射し、ザイモグラフィを行ってその活性を比較検討した(MMP-2；ゲラチン、MMP-3；カゼイン、MMP-8；ゲラチン)。

実験 6. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射によるプラスミン(TGF- β 活性に関わる因子)活性

hPDL 細胞に Er:YAG レーザー照射を行い、照射直後、培養 1・3 日後の細胞成分に対してプラスミン活性を蛍光強度測定することによって評価した。

実験 7. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による HSP(MMP 活性に関わる因子)の遺伝子発現

HSP90 α の遺伝子発現を調べるため、hPDL 細胞に Er:YAG レーザー照射を行い、照射直後、培養 1・3 日後の細胞成分に対して qPCR を行った。内部標準として GAPDH を使用し、HSP90 α の発現量を GAPDH 発現量 1 に対する割合で算出した。

<歯髄細胞(組織)における研究>

レーザーの照射条件：Er:YAG レーザーを 50mJ・10pps・照射距離 2cm・スウィーピングモーションで照射を行った。

実験 8. Er:YAG レーザー照射によるブタ歯髄組織中の有機質成分の比較

ブタ歯髄組織に Er:YAG レーザーを 30 秒、60 秒照射した後、3 日間培養した。その試料を NP-40 溶液にて抽出し、電気泳動を行い、CBB、

Stains-all 染色にてそれぞれのタンパク質成分を解析した。

実験 9. Er:YAG レーザー照射後の歯髄組織中のタンパク質成分による hPDL 細胞における ALP 活性

ブタ歯髄組織中に含まれる TGF- β が Er:YAG レーザー照射により活性化されるか確認を行った。実験 8 で抽出したタンパク質成分を hPDL 細胞に添加させ、3 日間培養後 ALP 活性を調べた。

実験 10. Er:YAG レーザー照射後の歯髄組織中のタンパク質成分に含まれるプロテアーゼの変化

実験 8 で抽出したタンパク質成分に含まれるプロテアーゼを Ca, EDTA の存在下においてゲラチンおよびカゼインゼイモグラフィにて検出、分析を行った。

実験 11. 歯髄組織のタンパク質成分凍結乾燥物への Er:YAG レーザー照射によるプロテアーゼ活性物の質量分析

ブタ歯髄組織を NP-40 によりタンパク質成分を抽出し、ヘパリンカラムにて分画し、各画分の凍結乾燥物に対し Er:YAG レーザー照射を行った後、カゼインゼイモグラフィを行ってその作用を比較検討した。さらに、レーザー照射によって活性が認められたタンパク質のバンドを切り出して質量分析し、そのプロテアーゼを調査した。

実験 12. Er:YAG レーザー照射による歯髄細胞増殖能

ブタ歯髄組織由来の不死化細胞 (PPU-7 細胞) に対し Er:YAG レーザーを照射し、照射直後、培養後 1・2・3・5 日目に細胞増殖能を MTS アッセイにより調べた。

実験 13. Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞への ALP 活性効果

Er:YAG レーザー照射後 3 日目の PPU-7 細胞における ALP 活性を調べた。

実験 14. Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞におけるアポトーシスの影響

Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞におけるアポトーシスの影響をカスパーゼ 3 抗体を用いた免疫染色にて調べた。

実験 15. Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞における MMP, DSPP 遺伝子発現

Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞における MMP-2, MMP-20, DSPP-v1, DSPP-v2 遺伝子発現を qPCR により解析した。それぞれの発現量を GAPDH 発現量 1 に対する割合で算出した。

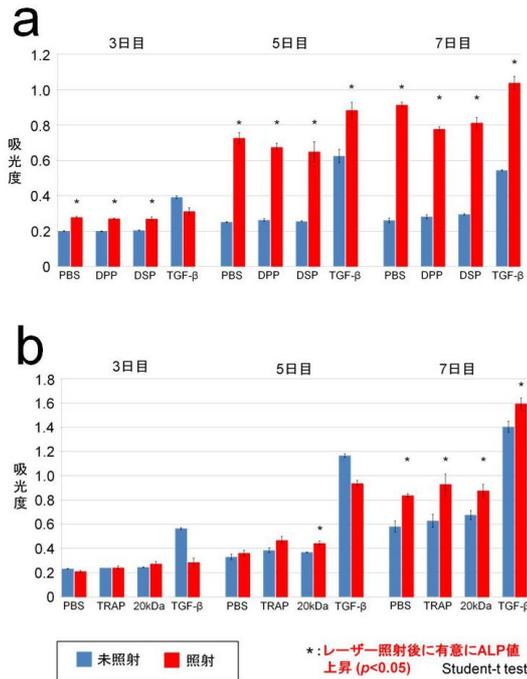
4. 研究成果

<歯根膜細胞における研究>

実験 1.

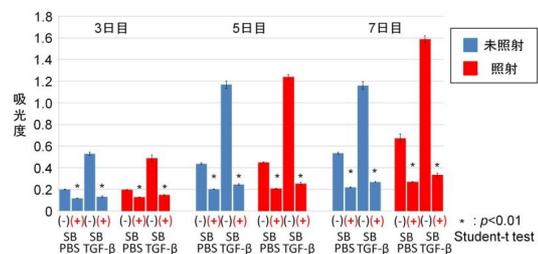
Er:YAG レーザー照射群は、未照射群と比較して ALP 活性が上昇する傾向を示した。ポジティブコントロールである TGF- β 添加群においては、3 日目では未照射群が高い値を示し、5 日あるいは 7 日目で他の試料と同様に照射群が未照射群に対して高い値を示した (n=3) (図: a; 象牙質タンパク質添加群, b; エナメルタンパク質添加群)。また、添加した生理活性物質間における ALP 活性の差はほとんど認められなかった。ポジティブコントロールの TGF- β 添加群において ALP 活性が 3 日目では未照射群が高い値を示し、5 日あるいは 7 日目で他の試料と同様に照射群が未照射群に対して高い値を示していたが、他の試料とは異なり TGF- β の添加による ALP 活性の急激な上昇を引き起こすポイントが、Er:YAG レーザー照射後 5 日以降にあることが考えられた。

た (n=3) (図: a; 象牙質タンパク質添加群, b; エナメルタンパク質添加群)。また、添加した生理活性物質間における ALP 活性の差はほとんど認められなかった。ポジティブコントロールの TGF- β 添加群において ALP 活性が 3 日目では未照射群が高い値を示し、5 日あるいは 7 日目で他の試料と同様に照射群が未照射群に対して高い値を示していたが、他の試料とは異なり TGF- β の添加による ALP 活性の急激な上昇を引き起こすポイントが、Er:YAG レーザー照射後 5 日以降にあることが考えられた。



実験 2.

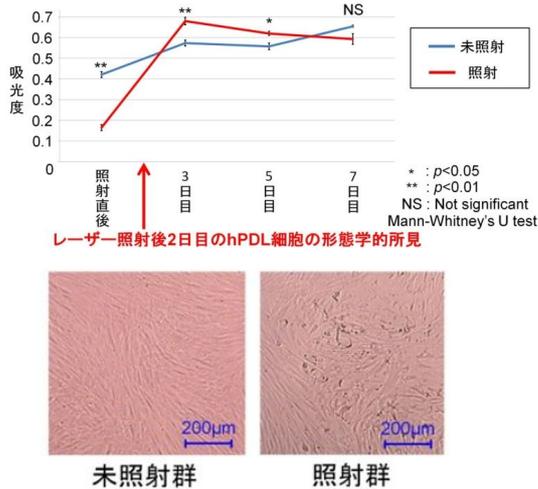
Er:YAG レーザー未照射、照射群ともに TGF- β I 型受容体の阻害剤である SB 添加群は未添加群に比べ ALP 活性が著しく低かった (n=3)。このことから、ALP 活性の上昇効果は TGF- β によるものと考えられた。



実験 3.

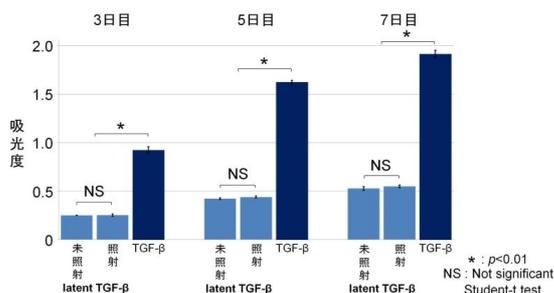
MTS アッセイにおいて Er:YAG レーザー照射直後は、未照射群に比べて細胞増殖能が低かったが、3 日目で未照射群の値を上回っていた (n=6 レーザー照射直後群 n=5)。7 日目では未照射・照射群間に有意差は認められなかった。レーザー照射群の ALP 活性が 7 日目で有意に上昇していたことから、この効果が単に細胞数の増加により引き起こされたのではないことが考えられた。形態学

的観察においては、Er:YAG レーザー照射後 2 日目の細胞形態は未照射群と比較して不規則な形態を呈していた。これらの結果は、ヒト歯肉線維芽細胞への Er:YAG レーザー照射により、照射 3 日後に細胞数が増加、細胞は不規則な形態を呈し、細胞内小器官が発達して代謝活性が高くなっているようであったという Pourzarandian らの報告 (J Periodontol, 76:187-193, 2005) を支持するものである。



実験 4.

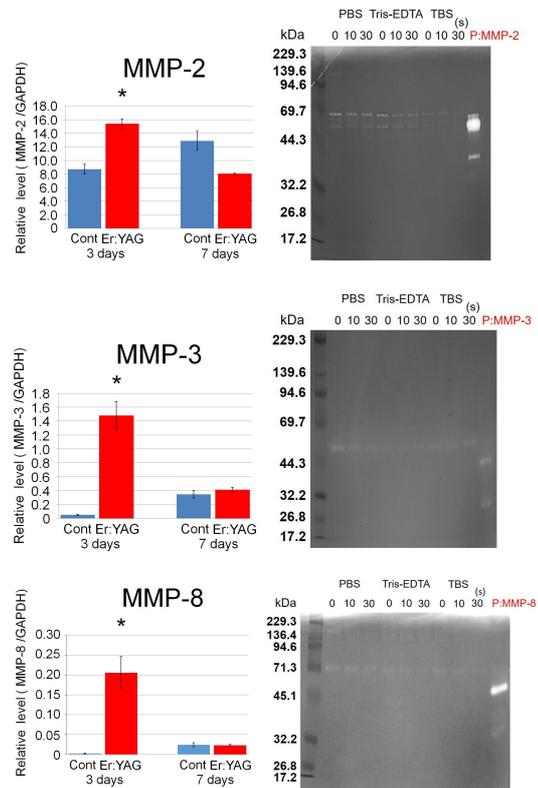
hPDL 細胞における Er:YAG レーザー照射 latent TGF-β 添加群培養後の ALP 活性は、未照射の latent TGF-β 添加群と有意差がなく同等であり、両群ともに TGF-β 添加群に比べ著しく低かった (n=3)。このことから、Er:YAG レーザー照射は、細胞内に存在する latent TGF-β を直接的には活性化させないことが示唆された。したがって、ALP の産生誘導は TGF-β によるものではあるが、Er:YAG レーザー照射により細胞内に存在する latent TGF-β が間接的に活性化されていることが考えられた。



実験 5.

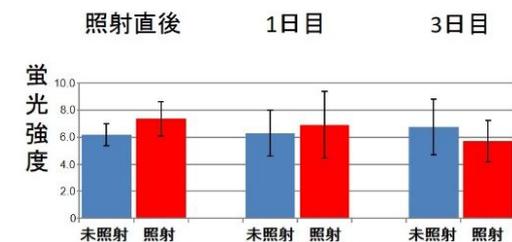
Er:YAG レーザーにより直接 TGF-β が活性化されなかったことから、その活性に関与する MMP の動態に着目した。hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-8) の遺伝子発現は、細胞増殖能と相関して 3 日目にレーザー照射群が未照射群と比較して有意な増強傾向が認められ (Student t-test: * $p < 0.01$; n=3), TGF-β 活性への関与が考えられた。しかしながら、ザイモグラフィによる解析からレー

ザー照射により MMPs が直接的に活性化されることはなかった。



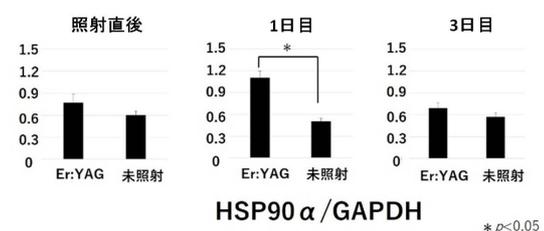
実験 6.

TGF-β の活性に関わるプラスミンについてもその動態を調査した。hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射によるプラスミン活性は、照射直後、照射後 1 日目および 3 日目において認められなかった。



実験 7.

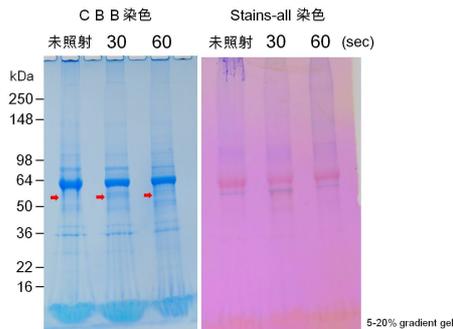
MMP の活性と相互に関わる HSP について、その動態を調査した。hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による HSP90α の遺伝子発現は、照射後 1 日目においてレーザー照射群が未照射群と比較して有意な増強傾向が認められ (Student t-test, n=3), MMP を介した TGF-β 活性への関与が考えられた。



<歯髄細胞(組織)における研究>

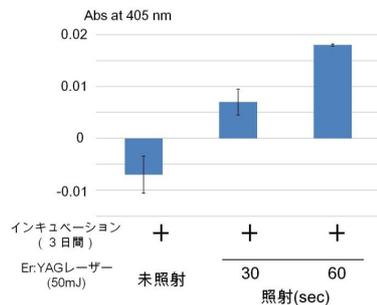
実験 8.

歯髄組織において Er:YAG レーザー照射群は未照射群のタンパク質成分と比較して、CBB 染色では 55kDa 付近のタンパク質が増加し、Stains-all 染色ではその差は認められなかった。



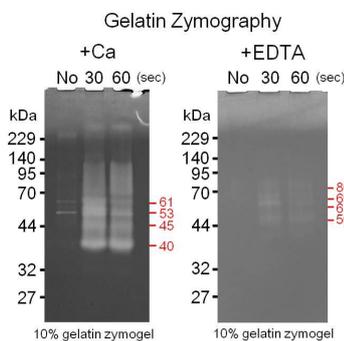
実験 9.

Er:YAG レーザー照射後の歯髄組織から抽出したタンパク質を hPDL 細胞に添加させ、3 日間培養後に ALP 活性を測定した結果、未照射群と比べ高い値を示した。



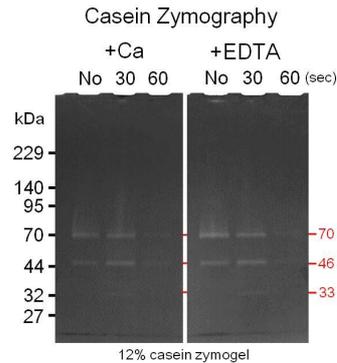
実験 10.

Er:YAG レーザー照射後の歯髄組織から抽出したタンパク質成分中に含まれるプロテアーゼをゲラチンゼイモグラフィーにて検出したところ、Ca 存在下において 61kDa, 53kDa, 45kDa および 40kDa のプロテアーゼ活性が認められた。また、EDTA 存在下においても、いくつかのプロテアーゼ活性が確認された。これらのうち Ca 存在下で顕著な活性化が認められた 53kDa, 45kDa および 40kDa のプロテアーゼは EDTA 存在下ではバンドが検出されないことより MMP であることが示唆された。



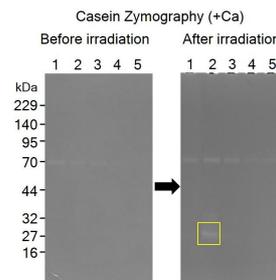
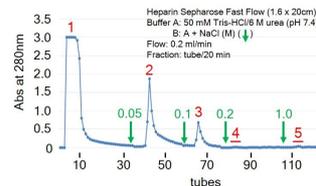
カゼインゼイモグラフィーでは 70kDa, 46kDa および 33kDa 付近にバンドが認めら

れ、30 秒照射では 33kDa 付近のプロテアーゼの活性が認められ、60 秒照射においては、いずれも活性が减弱していた。また、これらプロテアーゼは Ca が存在しない EDTA の条件下においても検出されることから MMP 以外のプロテアーゼであることが示唆された。



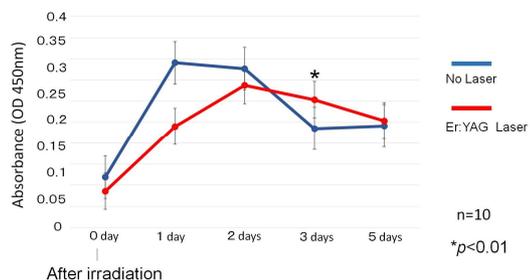
実験 11.

ブタ歯髄組織を NP-40 にて抽出後、ヘパリンカラムにて分画を行うと 5つのピークが認められた。それぞれの画分の凍結乾燥物に対して Er:YAG レーザー照射後、カゼインゼイモグラフィーを行ったところ 30kDa 付近にレーザー照射による活性が認められ、質量分析の結果から 30kDa 付近のプロテアーゼは MMP-20 であることが示唆された。



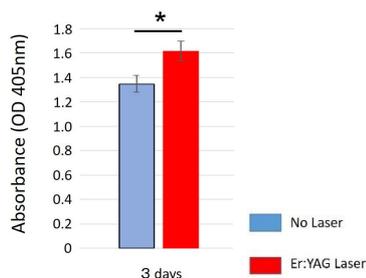
実験 12.

PPU-7 細胞に対する Er:YAG レーザー照射は、MTS アッセイにおいて照射直後では未照射群に比べて細胞増殖能が低かったが、2 日目でピークとなり、3 日目で未照射群の値を上回っていた、5 日目では未照射・照射群間に有意差は認められなかった。



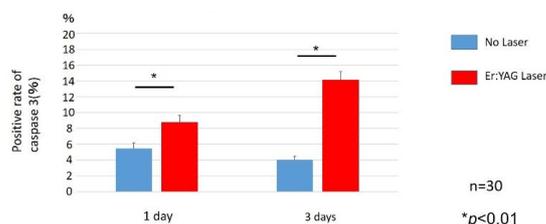
実験 13.

Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞における ALP 活性は、照射後 3 日目において未照射群に比べて有意に高い値を示し (* $p < 0.05$, Student t-test, $n=3$), 実験 9 の結果と同様 Er:YAG レーザー照射は、歯髄細胞(組織)に対し ALP 活性を上昇させる効果を有していた。



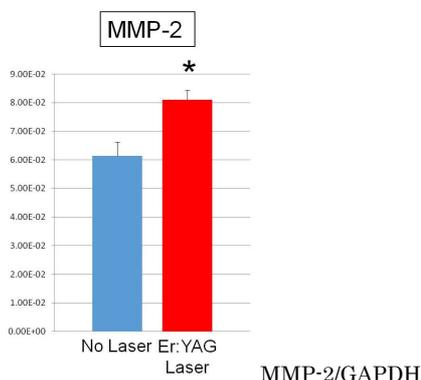
実験 14.

PPU-7 細胞に対する Er:YAG レーザー照射は、照射後 1 日目において未照射群と比べて有意にアポトーシスの割合が高く、3 日目により顕著であった(Mann-Whitney U-test)。



実験 15.

Er:YAG レーザー照射による PPU-7 細胞における MMP-2, MMP-20, DSPP-v1, DSPP-v2 遺伝子発現を qPCR により解析した結果、レーザー照射後 3 日目の MMP-2 遺伝子発現が有意に増強しており (Mann-Whitney U-test : * $p < 0.05$; $n=6$), TGF- β 活性への関与が考えられた。



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 1 件)

小林一行, 丹羽堯彦, 山川駿次郎, 斉藤まり, 山崎泰志, 細矢哲康, 五味一博, 山越康雄.

hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザーの照射効果. 日本レーザー歯学会誌, 査読有, 27(3), 2016, 84-89

DOI : 10.5984/jjpnsoclaserdent.27.84

[学会発表](計 7 件)

丹羽堯彦, 小林一行, 山川駿次郎, 山本竜司, 長野孝俊, 五味一博, 山越康雄. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザー照射による TGF- β 1 の動態. 第 29 回日本レーザー歯学会総会・学術大会, 2017 年

Shunjiro Yamakawa, Takahiko Niwa, Kazuyuki Kobayashi, Yasushi Yamazaki, Yasuo Yamakoshi, Noriyasu Hosoya.

Change of matrix components in porcine pulp tissues by Er:YAG laser irradiation. 39th Asia Pacific Dental Congress, 2017 年

山川駿次郎, 丹羽堯彦, 小林一行, 山本竜司, 唐木田丈夫, 山崎泰志, 山越康雄, 細矢哲康. プタ歯髄組織由来細胞の増殖能に対するレーザー効果について. 鶴見大学歯学会第 83 回例会, 2016 年

小林一行, 丹羽堯彦, 山川駿次郎, 斉藤まり, 山本竜司, 山越康雄. hPDL 細胞中の内在性 TGF- β に対する Er:YAG レーザーの照射効果. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年

山川駿次郎, 丹羽堯彦, 小林一行, 山本竜司, 細矢哲康, 山越康雄. Er:YAG レーザーによる プタ歯髄組織への影響について. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年

小林一行, 丹羽堯彦, 山川駿次郎, 斉藤まり, 山崎泰志, 細矢哲康, 五味一博, 山越康雄. hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザーの照射効果. 第 28 回日本レーザー歯学会総会・学術大会, 2016 年

山川駿次郎, 丹羽堯彦, 小林一行, 細矢哲康, 大井田新一郎, 山越康雄. プタ歯髄組織における Er:YAG レーザーの効果について. 鶴見大学歯学会第 82 回例会, 2015 年

[その他]

第 28 回日本レーザー歯学会総会・学術大会 (2016 年 7 月 16 日, ウィンクあいち)において発表した“hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザーの照射効果”で優秀発表賞を受賞した。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 一行 (Kobayashi, Kazuyuki)

鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授

研究者番号 : 70288116