

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20395

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞におけるベルベリンを用いた新規硬組織再生法の開発研究

研究課題名(英文) Study of using Berberine in human dental pulp cell

研究代表者

須藤 瑞樹 (Suto, Mizuki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40708046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生薬のベルベリンは骨芽細胞の骨分化マーカーを発現させるがヒト歯髄細胞(hPulp)およびヒト歯根膜細胞(hPDL)への効果は不明である。本研究において培養細胞を用いて解析を行ったところ、ベルベリンはhPulpおよびhPDLの細胞増殖を亢進させることが明らかになった。その増殖誘導効果はhPDLにおいて顕著であったため、hPDLに重点をおき研究を行ったところ、この増殖はMAP Kinase非依存的であった。またアルカリフォスファターゼの発現が抑制され、これはMAP/ERK経路を介していることが示唆された。これによりベルベリンはhPDLに対して分化度を抑制しつつ増殖を亢進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Berberine, an alkaloid extracted from various plants, is galenical and promotes osteoblast differentiation. But, the effect of berberine in human periodontal ligament (hPDL) and human dental pulp cell(hPulp) is unknown. In this study, we showed that berberine promotes cell proliferation in hPDL and hPulp. The effect in hPDL was more prominent compared with hPulp. Therefore, we used hPDL and this proliferation did not depend on MAP kinase. Berberin inhibited the expression of alkaline phosphatase, and this inhibition was canceled by treatment with ERK1/2 inhibition, suggesting that the berberine-mediated inhibition of alkaline phosphatase was through MAP/ERK signaling pathway. Taken together, berberine inhibited differentiation and promoted proliferation in hPDL.

研究分野：歯内療法

キーワード：歯周組織再生 ヒト歯髄細胞 ヒト歯根膜細胞 ベルベリン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、生薬としてすでに使用されているベルベリンの石灰化促進作用、抗菌作用に着目した。ベルベリンはイソキノリンアルカロイドの一種で骨芽細胞へ刺激すると骨分化マーカーの発現を促進することが報告されている。しかしベルベリンによるヒト歯髄細胞への効果は知られていない。ヒト歯髄細胞は骨芽細胞と類似の表現型を有していることからベルベリン刺激による硬組織再生が期待できると考えられる。よってベルベリンによるヒト歯髄細胞の分化と機能を規定する因子を明らかにすることは歯内治療の再生医学の発展に大きな意味を持つと考えられる。

## 2. 研究の目的

ヒトの歯髄は象牙質に囲まれており、根尖孔のみで外部と繋がっているという身体の中でも特殊な環境下におかれている。歯髄は知覚や象牙芽細胞や未分化間葉系細胞への栄養、恒常性への関与も関係している。また歯髄は摩耗や咬耗、齶蝕で削られると局所的に象牙質が形成されるという再生能力をも有する。未分化間葉系細胞であるヒト歯髄幹細胞は象牙芽細胞様細胞に分化し、象牙質状の鉱物構造を生成する能力を有している。

このヒト歯髄細胞の分化は Bone morphogenetic protein (BMP)-2、Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 、などの各種成長因子が深く関与していると考えられているがそのメカニズムについては明らかにされていない。骨シアロタンパク質、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ 1型コラーゲン、オステオカルシンなどの遺伝子発現の表現型が骨芽細胞と類似しており、ヒト歯髄細胞は骨芽細胞と同様に硬組織再生能力を有していると考えられる。

「生薬」は免疫増強作用など宿主側の体質の改善を主目的とし、結果的に疾患を改善さ

せようとするものが多い。本研究では黄蓮や黄柏から抽出されるイソキノリンアルカロイドであるベルベリン ( $C_{20}H_{18}NO_4^+$ ; MW=336.4 g/mol)に着目した。ベルベリンは現在生薬として主に止瀉薬として使用されており、口腔内領域では口内炎の治療に用いられている。

ベルベリンで骨芽細胞を刺激すると、骨分化マーカーであるオステオポンチン、オステオカルシンおよび Runx2 の発現増強を促進することが報告されており、石灰化を促進することから硬組織再生への有用性が示唆されている。

また、ベルベリンは各種の病原微生物 (黄色ブドウ球菌、レンサ球菌などのグラム陽性菌をはじめグラム陰性菌など) に対する強い抗菌作用が認められている。さらにベルベリンは抗炎症作用も有しており、炎症を惹起させたラットにベルベリンを投与すると炎症性サイトカイン発現を低下させることが報告されている。

しかしながらベルベリンがヒト歯髄細胞に及ぼす作用については現在まだ研究がされていない。

そこで本研究ではベルベリンのヒト歯髄細胞に対する硬組織再生誘導作用および抗炎症作用の2分野に焦点を当ててその機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養方法

ヒト歯髄細胞 (hPulp Cell) は東北大学病院で同意を得た歯周組織に炎症徴候のない完全萌出した健全な第三大臼歯の歯髄を採取しそこから分離・培養を行う。

(2) ベルベリンによるヒト歯髄細胞への細胞毒性への影響 (Cell counting kit-8)

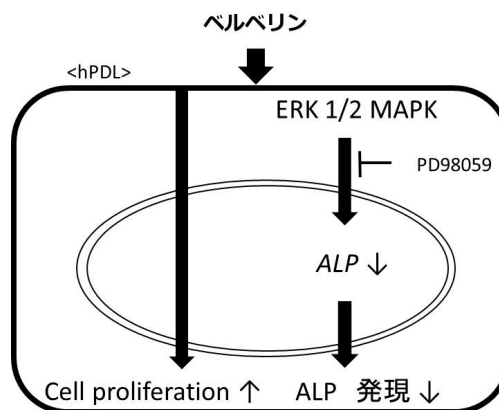
(3) ベルベリン刺激がヒト歯髄細胞の分化に及ぼす影響についての解析 (リアルタイム定量性 RT-PCR 法、Western blot 法)

(4) ベルベリンによるヒト歯髄細胞における増殖あるいは分化誘導のシグナル伝達機構についての解析 (Western blot 法)

#### 4. 研究成果

ヒト歯髄細胞にベルベリンによる細胞毒性の実験を行った結果、ベルベリン存在下で有意な細胞数の増加がみられた。またヒト歯根膜細胞 (hPDL) において同様な実験を行った結果、ヒト歯髄細胞の増殖よりも顕著であった。これによりまず hPDL に重点をおき研究を進めた。細胞周期において細胞分裂を増加させる cyclin D1 の遺伝子発現を定量リアルタイム PCR にて解析を行ったところ発現量は有意に増加した。ベルベリン刺激による hPDL の増殖作用への MAP kinase の関与について検討を行った結果、ウエスタンブロット法にて ERK1/2、p38 のリン酸化が誘導された。しかし、ERK1/2、p38 の各阻害剤にて前処理した hPDL をベルベリン存在下にて培養し細胞数の計測を行った結果、細胞増殖は抑制されなかった。このことよりベルベリンは MAP kinase 非依存的に hPDL の増殖を亢進することが示唆された。以上のことをふまえ、hPDL におけるベルベリンによる分化初期マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の発現に及ぼす影響を調べた結果、ALP 遺伝子発現の有意な抑制が認められた。この抑制に関して MAP kinase の関与について検討した結果、ERK1/2 阻害剤で ALP 遺伝子発現の抑制が解除された。このことからベルベリンによる ALP 発現の抑制は MAP/ERK 経路を介していることが示唆された。以上のことからベルベリンは hPDL に対して分化度を抑制しつつ増殖を亢進させることが明らかとなった。

(図1)



(図1)

#### 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)

[学会発表](計8件)

(1) Mizuki Suto, Kentaro Maruyama, Sousuke Kanaya, Eiji Nemoto, Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits proinflammatory cytokine secretion from murine macrophages triggered by E.coli Lipopolysaccharide. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. Feb 15-17 2017, Seiryu Auditorium, Tohoku University, Sendai Japan

(2) Mizuki Suto, Kentaro Maruyama, Sousuke Kanaya, Eiji Nemoto, Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibited LPS-induced inflammatory responses of macrophages through NK- B signaling pathway. China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2016. Dec 9-10 2016, Fuzhou, China

(3) 肖滨璐、金谷聡介、向阪幸彦、須藤瑞樹、齋藤正寛、根本英二、高濃度細胞外カルシウム刺激に対する間葉系未分化細胞の反応性の解析 ~ fibroblast growth factor 2 および bone morphogenetic protein 2 の発現誘導 ~、第59回秋季歯周病学会、2016年10月6、7、8日、新潟県新潟市、朱鷺メッセ

(4) 長谷川博、向坂幸彦、小松秀裕、丸山顕太郎、工藤聖美、金子哲治、遠藤学、山崎森里生、石幡浩志、須藤瑞樹、川股亮太、高精細微小穿孔アレイを有する骨再生用純チタン膜の効果、第 59 回秋季歯周病学会、2016 年 10 月 6、7、8 日、新潟新潟市、朱鷺メッセ

(5) 丸山顕太郎、池野修功、小松秀裕、向坂幸彦、大方広志、須藤瑞樹、根本英二、庄司茂、偏心モーター内蔵型振動スケーラーの歯石除去における有効性の評価、第 59 回秋季歯周病学会、2016 年 10 月 6、7、8 日、新潟新潟市、朱鷺メッセ

(6) 池野修功、金谷聡介、根本英二、須藤瑞樹、向坂幸彦、島内英俊、ベルベリンはヒト歯根膜細胞アルカリフォスファターゼを抑制し細胞増殖を誘導する、第 143 回春季日本歯科保存学会、2015 年 11 月 12、13 日、東京都文京区、文京シビックホール

(7) 須藤瑞樹、金谷聡介、島内英俊、根本英二、ヒト歯髓細胞への低出力超音波 (LIPUS) はオステオポンチンの発現を誘導する、第 143 回春季日本歯科保存学会、2015 年 11 月 12、13 日、東京都文京区、文京シビックホール

(8) 石幡浩志、遠藤直樹、須藤瑞樹、向坂幸彦、小松秀裕、丸山顕太郎、遠藤学、佐々木啓一、長谷川博、高精細多孔チタン膜による顎骨増生に関する研究、第 143 回春季日本歯科保存学会、2015 年 11 月 12、13 日、東京都文京区、文京シビックホール

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：歯周スケーラ  
発明者：丸山顕太郎、須藤瑞樹、根本英二、庄司茂、他  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：2016-198536  
出願年月日：2016 年 10 月 6 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
須藤 瑞樹 (Suto Mizuki)  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号：40708046

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし