

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11697

研究課題名(和文) 活性型ビタミンD3によるセメント芽細胞分化制御に基づく新規歯内療法の基盤構築

研究課題名(英文) Constructing method for cementoblastic differentiation induced by 1 α , 25-dihydroxy Vitamin D3

研究代表者

金谷 聡介 (Kanaya, Sousuke)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80375097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：100nM活性型ビタミンD3でヒト歯根膜細胞を刺激すると、セメント芽細胞に特異性が高いとされるCementum protein 1 (CEMP1)およびF-spondin遺伝子の発現が増強した。また、骨芽細胞やセメント芽細胞の分化・硬組織形成に重要であるOsterix、Runx2、ALP、OCNおよびBSP遺伝子の発現が増強した。さらに活性型ビタミンD3長期刺激でCEMP1タンパク質を強く発現する細胞がみられた。活性型ビタミンD3は石灰化を抑制、アスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメタゾンでは石灰化が促進されたが、蛍光免疫染色ではVD3刺激と比較してCEMP1タンパク質の発現は減弱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根末完成歯において歯髄が失活あるいは不可逆性歯髄炎などにより歯髄を全部除去した場合、緊密な根管充填を行うためには、根尖部に修復セメント質の形成を誘導することにより根尖部を閉鎖する必要がある。現在、水酸化カルシウム系糊材を根管に、あるいはMineral Trioxide Aggregate (MTA)セメントを根尖部に充填する方法が用いられているが、根尖の閉鎖には限界がある。本研究の目的は、ビタミンD3の局所投与および全身投与による新たなセメント芽細胞分化誘導法を確立し、修復セメント質形成による根尖部の閉鎖を促進する新規歯内療法の開発に向けた学術基盤を構築することである。

研究成果の概要(英文)：100nM 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 enhanced Cementum protein 1 (CEMP1) and F-spondin gene expressions considered as specific cementoblastic markers in human periodontal ligament cells. 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 also enhanced Osterix, Runx2, Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OCN) and Bone sialoprotein (BSP) gene expressions which are regarded as important factors for osteoblastic and cementoblastic differentiation and mineralization. These results indicated that 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 regulates periodontal ligament cells differentiation. Furthermore, Cells strongly expressed CEMP1 protein were appeared with long term 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 stimulation. 100nM 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 decreased mineralized nodule formation. 100nM 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3, Ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethazone enhanced mineralized nodule formation, however CEMP1 protein expression was decreased compared with 1 α ,25-dihydroxy Vitamin D3 alone.

研究分野：歯科保存学

キーワード：活性型ビタミンD3 Cementum protein 1 Osteocalcin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根未完成歯の根管治療においては、水酸化カルシウム製剤や MTA セメントを根管内に充填することにより根尖部に修復セメント質の形成を誘導させ、根尖の閉鎖を期待する方法が行われている。その薬理作用の分子メカニズムは未だ明らかではないが、充填材料から局所に徐放された細胞外 Ca^{2+} が歯周組織幹細胞に作用し、セメント芽細胞への分化を誘導することが報告されている (Paula-Silva ら *Calcif Tissue Int* 2010)。しかしながら、本術式の根尖部閉鎖の成功率は報告者によって大きく異なる。さらに MTA は完全に硬化するため、再治療の必要が生じた場合には同材料の除去が不可能であり、未だ根尖部の閉鎖を目的とした安定した治療法は確立していない。

活性型ビタミン D3 は骨形成に必要であるだけでなく、抗菌作用を有する LL-37 の発現をヒト歯肉上皮細胞から誘導するなど、創傷治癒を促進することが報告されている。近年、ビタミン D3 の健康食品 (サプリメント) は歯の喪失の予防に効果があり、ビタミン D3 の血中濃度は口腔の健康に関係していることが明らかになってきている (Krall ら, *Am J Med* 2001)。さらに Bashutski らは、ビタミン D3 の服用が歯周外科処置の効果を高めることを報告している (*J Dent Res* 2011)。

活性型ビタミン D3 はヒト骨芽細胞において osteocalcin の発現を増強し、分化および石灰化を誘導する。また、骨芽細胞における Receptor activator of nuclear factor - B ligand (RANKL) の発現を増強し、骨のリモデリングを調節していることも知られている。しかしながら、ヒトセメント芽細胞や歯根膜細胞に与える影響についてはほとんど報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ビタミン D3 の局所投与および全身投与による新たなセメント芽細胞分化誘導法を確立し、修復セメント質形成による根尖部の閉鎖を促進する新規歯内治療法の開発に向けた学術基盤を構築することである。

3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞培養系を用いて活性型ビタミン D3 による刺激を行い、セメント芽細胞に特異性の高いと考えられている Cementum protein 1 (CEMP1)、F-spondin 遺伝子および骨芽細胞やセメント芽細胞の分化・硬組織形成に重要である Osterix、Runx2、ALP、OCN および BSP 遺伝子の発現に及ぼす影響についてリアルタイム PCR にて解析を行った。CEMP1 タンパク質の発現については蛍光免疫染色法を用いて解析した。石灰化ノジュールの形成についてはアリザリンレッド S 法にて解析した。

4. 研究成果

活性型ビタミン D3 はヒト歯根膜細胞の分化に関わる遺伝子発現へ及ぼす影響

活性型ビタミン D3 でヒト歯根膜細胞を刺激すると、1 nM から 1000 nM のすべての濃度でセメント芽細胞特異的分化マーカーである Cementum protein 1 (CEMP1) 遺伝子の発現を増強する結果が得られた。骨基質タンパク質 Osteocalcin (OCN) についてもすべての濃度の活性型ビタミン D3 刺激で顕著な遺伝子発現の上昇がみられた。そこで、骨芽細胞の分化に必須の転写因子であり、セメント芽細胞の分化にも重要であると考えられている Osterix および Runt-related transcription factor 2 (Runx2) (1000 nM 以外のすべての濃度の活性型ビタミン D3 刺激で発現増強)、骨芽細胞やセメント芽細胞の分化・硬組織形成に重要である Alkaline phosphatase (ALP) および Bone sialoprotein (BSP) 遺伝子の発現もすべての濃度の活性型ビタミン D3 刺激で有意に増強した。さらに、100 nM 濃度の活性型ビタミン D3 でセメント芽細胞に特異性の高い遺伝子とされる F-spondin の発現も増強した。(図 1)

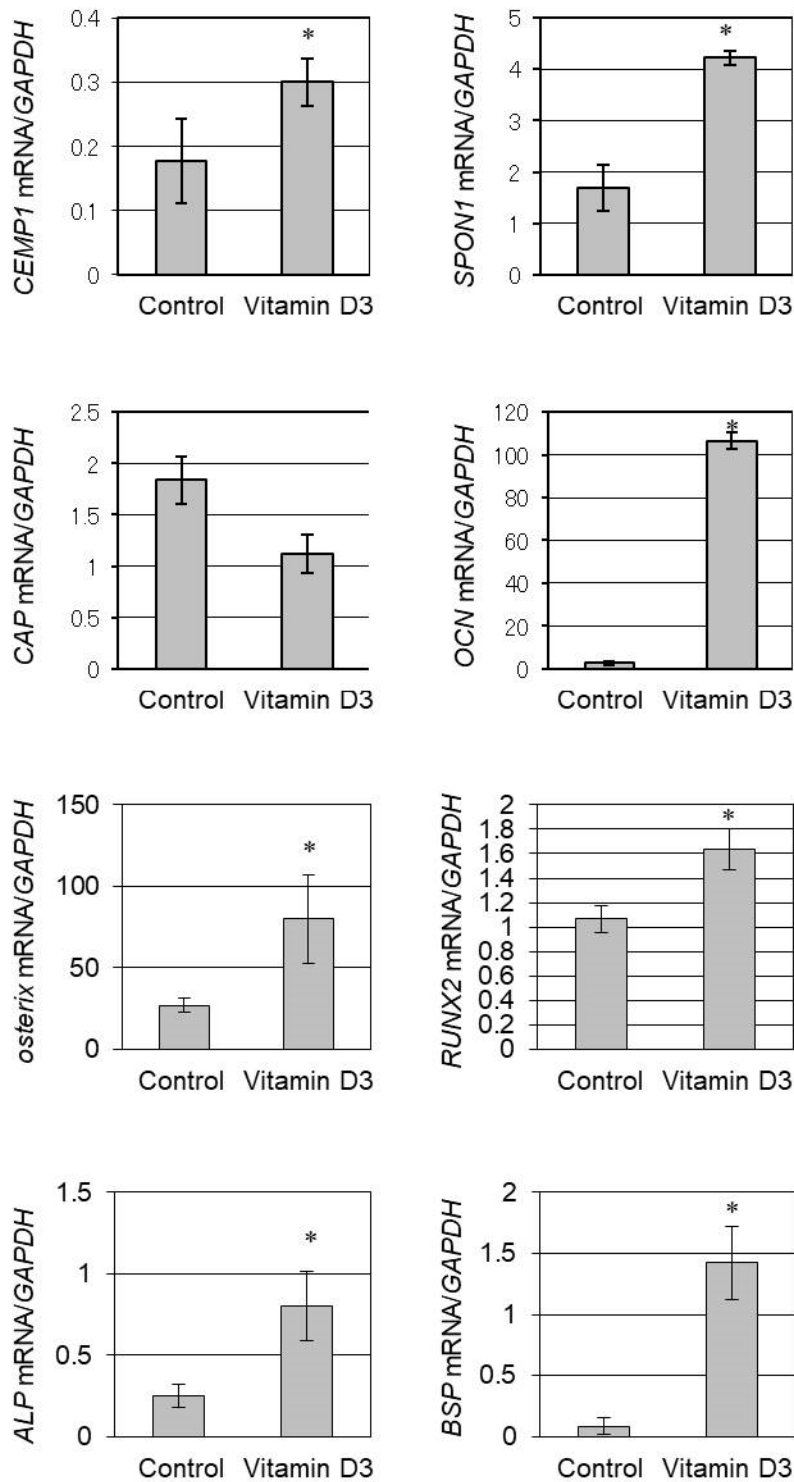


図.1 歯根膜細胞3日刺激における遺伝子発現

活性型ビタミン D3 がヒト歯根膜細胞の石灰化と CEMP1 タンパク質発現に及ぼす影響
 100nM 活性型ビタミン D3 は歯根膜細胞の石灰化を抑制したが、活性型ビタミン D3、アスコルビン酸、グリセロリン酸およびデキサメタゾンを同時に作用させると石灰化が促進された。しかしながら、蛍光免疫染色では VD3 刺激と比較して CEMP1 タンパク質の発現は減弱した。

活性型ビタミン D3、アスコルビン酸、グリセロリン酸およびデキサメタゾン長期刺激が歯根膜細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
 活性型ビタミン VD3 刺激は、刺激後 7 日で CEMP1、SPON1、Osterix 発現を増強した。

活性型ビタミン VD3 長期刺激 18 日において SPON1、ALP、OCN、BSP、Runx2 発現を増強した。50 μ l/ml アスコルビン酸、10mM グリセロリン酸、100nM デキサメタゾン存在下では、活性型ビタミン VD3 刺激は CEMP1 発現を増強しなかったが、ALP、OCN、BSP、Osterix 発現を増強した。(図 2)

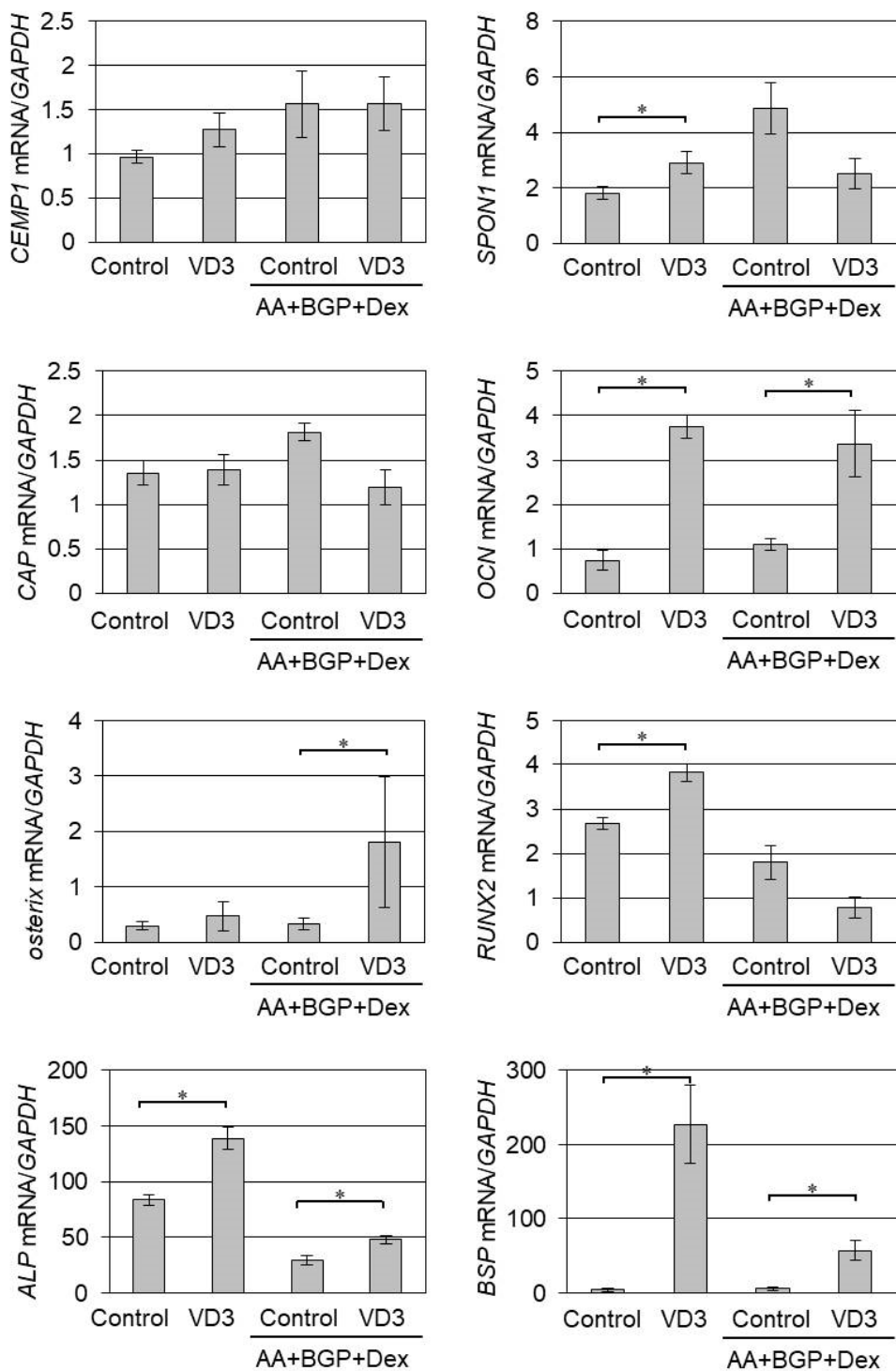


図.2 歯根膜細胞長期18日刺激における遺伝子発現

VD3: Vitamin D3, AA: Ascorbic acid, BGP: β -glycerophosphate, Dex: Dexamethazone

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanaya S, Xiao B, Sakisaka Y, Suto M, Maruyama K, Saito M, Nemoto E.	4. 巻 26
2. 論文標題 Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Appl Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 1.1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1590/1678-7757-2017-0231.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	根本 英二 (Nemoto Eiji) (40292221)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	天雲 太一 (Tenkumo Taichi) (80451425)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	