

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11713

研究課題名(和文) レーザー照射による歯髄-血管・神経相互作用へ及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) The effect of the laser irradiation on the pulp-vascular system and nerve complex

研究代表者

増田 宜子 (Masuda, Yoshiko)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10297038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラット大動脈内皮細胞を培養しNd:YAG レーザーを照射した。ラット下顎切歯の歯髄細胞を採取し培養しサブコンフルエントに達したらフラスコからはがしレーザー照射血管内皮細胞を1、歯髄細胞を3の割合になるように混ぜ共培養した。時間の経過とともに細胞の形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。培地交換後14、21日にてVon Kossa染色、ALP活性の測定を行った。血管内皮細胞を1、歯髄細胞を3の割合になるように混ぜ共培養したレーザー照射血管内皮細胞-歯髄細胞では環状構造が認められたが、ALP活性やVon Kossa染色での石灰化noduleは認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄の血管周囲のペリサイトには幹細胞の存在が報告されている。歯髄充血の際に血管が拡張する。その刺激によって幹細胞の遊走や分化が促進されると推測される。今回レーザー照射血管内皮細胞と歯髄細胞との共培養によってのみ環状構造が認められたため、レーザー照射が歯髄充血をIn vitro で再現できる可能性が示唆された。これにより歯髄充血から歯髄炎と進み抜髄となる治療法に関して歯髄を保存するための研究にレーザー照射血管内皮細胞が寄与できると考えられる。また、今回石灰化の促進は確認出来なかったが歯髄充血後に生じる修復象牙質形成の機序解明にレーザー照射血管内皮細胞が寄与出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rat endothelial cells were cultured and Nd:YAG laser was irradiated on the cells.

No irradiated rat endothelial cells were used as a control. Rat pulp cells were isolated from the mandibular incisor. Cultured rat pulp cells were removed from the dish after having reached a subconfluent state and combined to the dish, which endothelial cell were cultured on. Cell number ratio of pulp cells and endothelial cells was 3 to 1. The changes of the form of the cell were observed for 21 days. The annular structure like blood vessel-like structure was observed only laser irradiated cells. ALP activity and calcium content were not detected on 21 days.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄細胞 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯髄幹細胞が血管周囲に存在し強い刺激が加わると血管周囲の細胞が活発に細胞分裂を始める。これまで歯髄細胞と血管内皮細胞とのスフェロイドによる共培養において異なる比率で混ぜることで血管のネットワーク構造が認められる報告がある。歯髄細胞と血管内皮細胞を共培養すると血管ネットワークが構築されるが繊維芽細胞との共培養では起こらない。また、メスやレーザーによる損傷で歯髄細胞が損傷血管内皮細胞へ遊走する報告はある。歯髄に対するメカニカルストレスとしてレーザーを用い血管内皮細胞に損傷を与え歯髄細胞との3次元共培養(スフェロイド)にて象牙芽細胞様細胞への分化や修復象牙質産生を調べた報告はない。

我々は、膜を介して上段と下段に分かれている細胞培養システムによって上段に歯髄細胞、下段に血管内皮細胞を培養し下段の血管内皮細胞に Nd:YAG laser によって損傷を与え歯髄細胞が上段から下段へと遊走してくることを調べ報告した。

レーザーで損傷を与え、上段に歯髄細胞を培養したもので *tgf-β1*, *osteocalcin* 遺伝子の発現が増加した。さらに下段のレーザー照射血管内皮細胞で発現している遺伝子をマイクロアレイにて分析した。32倍と最も多く発現しているものは Potassium channel subfamily K(Kcnk10)TREK-2 などのメカニカルセンサーであった。神経細胞に關与するもの *synaptotagmin XVI*, *persephin* が認められた。ラット歯髄に Nd:YAG laser を照射して硬組織産生を促し、歯髄からライブラリーを作成して発現している遺伝子を調べたが血管内皮細胞で発現しているものと同様な遺伝子ではなかった。(Masuda YM et al., Arch Oral Biol, 51: 527-34, 2006. Isolation and partial sequencing of cDNA clones from rat incisor after Nd:YAG laser irradiation in root canal.)

2. 研究の目的

レーザー照射は、臨床にて大変有効で、露髄面の修復象牙質産生が促され実際に用いられている。歯髄にくまなく広がる血管-神経ネットワークにおいて血管系が修復象牙質産生に關与していることが示唆されている。レーザー照射の歯髄における分化・硬組織産生機序を解明するために、レーザー照射血管内皮細胞で発現する遺伝子をマイクロアレイによって分析したところメカニカルセンサーや神経伝達に關する因子が強く発現していた。そこでより生体に近い歯髄細胞の3次元培養スフェロイドを用いて血管内皮細胞にレーザー照射し

歯髓細胞との共培養でレーザー照射による歯髓細胞の象牙芽細胞様細胞への分化や硬組織産生、血管新生への影響を調べレーザー照射の歯髓における分化・硬組織産生機序を解明することとした。

3．研究の方法

ラット大動脈内皮細胞（凍結細胞）（旭硝子）を購入しラット内皮細胞成長培地（旭硝子）にて培養する。コンフルエントになったら 1×10^4 cells/cm² の濃度で 12 well plate に継代する。サブコンフルエントになったら Nd:YAG レーザーを照射する。1度の実験に同腹のラット 3~4 匹を用いる。ラット下顎切歯の歯髓細胞を採取しコラゲナーゼ、トリプシン酵素、EDTA によって処理した後 plate に播種 Primary culture の培養を 37 °C、5 %CO₂ にて行う。培地には α -MEM、10%子牛血清を加えたものを用いる。1週間でサブコンフルエントに達したら 1×10^4 cells/cm² の濃度で 12 well plate に播く。サブコンフルエントになったら共培養のために分離する。Nd:YAG レーザー照射は既に報告した方法と同様に行う。（Masuda et al., Photomed Laser Surg. 30:315-319, 2012.）6 well-plate それぞれに 5 spots 照射する。0.5 w, 20 pps, 30s/ spot にて 細胞に損傷を与え血管内皮細胞に損傷を加えた直後に可及的に素早く歯髓細胞と（歯髓:血管内皮:1:5, 1:3, 1:1, 3:1, 5:1）に混ぜ培養する。時間の経過とともに細胞の形態の変化を位相差顕微鏡にて観察する。培地交換後 14, 21 日にて Von Kossa 染色、ALP 活性の測定を行う。

4．研究成果

ラット大動脈内皮細胞を培養し Nd:YAG レーザーを照射した。ラット下顎切歯の歯髓細胞を採取し培養を行う。サブコンフルエントに達し様々の割合で混ぜレーザーを照射し歯髓細胞と共培養した。時間の経過とともに細胞の形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。血管内皮細胞を 1、歯髓細胞を 3 の割合になるように混ぜたところレーザー照射血管内皮細胞-歯髓細胞では環状構造が認められた。培地交換後 14, 21 日にて Von Kossa 染色、ALP 活性の測定を行ったが ALP 活性や Von Kossa 染色での石灰化 nodule は認められなかった。レーザー照射後に血管内皮細胞をフラスコからはがすことによって過剰なストレスを与えていることが影響したと示唆された。

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 MASUDA YOSHIKO、SAKAGAMI HIROSHI、YOKOSE SATOSHI、UDAGAWA NOBUYUKI	4. 巻 34
2. 論文標題 Effect of Small-molecule GSK3 Antagonist on Differentiation of Rat Dental Pulp Cells into Odontoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11877	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増田宜子、横瀬敏志
2. 発表標題 GSK3アンタゴニスト(Tidegrusib)による培養歯髄細胞の修復象牙質産生への影響の解明
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

〔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	友村 美根子 (TOMOMURA MINEKO) (30217559)	明海大学・保健医療学部・教授 (32404)	
研究分担者	肖 黎 (LI XIAO) (80548256)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	