

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (c)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592209
 研究課題名（和文） レーザーの低エネルギー効果を生物学的に解析して硬組織再生療法への
 応用法を確立する
 研究課題名（英文） Establishment of regeneration therapy for hard tissues based on
 biological analysis of low energy Laser
 研究代表者 横瀬 敏志 (YOKOSE SATOSHI)
 奥羽大学・歯学部・教授
 研究者番号：90245803

研究成果の概要：骨組織は機械的な刺激に対して反応する組織である。これを Wolff の法則という。炭酸ガスレーザー照射は骨組織に対して有用な機械的刺激であり、骨組織の誘導が可能である。そこでこの骨誘導のメカニズムを解明して、炭酸ガスレーザーを骨組織の再生療法に応用する方法を確立するための基礎データをえることは歯科保存領域の骨再生療法の発展に寄与するものである。本件研究はここに着目して、炭酸ガスレーザーの低エネルギー効果を骨組織で検証した。その結果、低エネルギー炭酸ガスレーザー照射では骨形成を誘導することが可能であることが分かった。さらにこれらの骨誘導に関連して、骨芽細胞の分化促進に osteopontin の発現が必要であり、また、レーザーの刺激を伝達する役目には骨細胞が重要な役割を果たしていることが分かった。さらにこの刺激の伝達には Wnt シグナルが関与していることが明らかとなった。これらの結果は今後炭酸ガスレーザーを骨再生療法に応用する上で極めて有用な基礎データになるものである。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：レーザー、低エネルギー、硬組織、再生療法

1. 研究開始当初の背景

炭酸ガスレーザーの低エネルギー照射は細胞を活性化することが知られている。これは組織再生に十分応用できる現象である。一方骨組織は力に反応する性質を持つ (Wolff の法則)。そこで炭酸ガスレーザーの低エネルギー照射を骨組織の再生に利用して新たな骨組織再生療法を確立する。そのためには炭

酸ガスレーザーの骨組織に対する細胞生物学的な作用を分子レベルで解明する必要がある。本研究の背景には増殖因子やホルモン、サイトカインといったペプチドを用いる代わりに、感染や副作用のない物理的な力を再生療法に用いるといった特色あるアイデアが存在する。

2. 研究の目的

骨組織に見られる Wolff の法則 {骨組織は加わる力に適應するように形が決められる} は、骨再生療法に力を応用することが可能であることを示している。本研究の目的は炭酸ガスレーザーの低エネルギーが骨代謝にどのような作用を示すかを明らかにすることが最大の目的である。低エネルギー照射によって骨組織が誘導される現象が知られているが、そのメカニズムはほとんどわかっていないのが現状である。そのためにはレーザーのエネルギーをどのように骨組織が認識し、骨誘導に関連しているかを明らかにする必要がある。これはメカのセンサーを見つけることである。このメカニズムを解明して最終的には炭酸ガスレーザーを用いた骨再生療法の確立のために基礎的なデータを集積する。

3. 研究の方法

(動物): 8 週齢の SD ラットの脛骨に対して、右側に低エネルギー炭酸ガスレーザーを照射 ($30\text{J}/\text{cm}^2$) し、左側にはコントロール群として歯科用バーで実質欠損を作成した (図 1)。その後



図 1

経時的に試料を摘出し、中性ホルマリン固定、EDTA による脱灰を経て、パラフィン切片を作成した。

(形態学的解析): 一般的な染色として H-E 染色を行い形態的に観察した。また、免疫染色として osteopontin, Lef-1, sclerostin の一次抗体を用いて染色を行った。

(Real time PCR): レーザー照射と歯科用バーで骨欠損を作成した骨組織の骨髄細胞を flashout して摘出し、これらの細胞から total RNA を抽出した。次いで Oligo dt プライマーを使用して逆転写により cDNA を作成した。作成した cDNA から SYBER GREEN を用いたインターカレーター法によるリアルタイム PCR を行い、osteopontin と beta actin の mRNA の発現量を測定した。

形態学的な検索を行う。特に、メカニカルセンサーに密接に関連するといわれている Wnt

シグナル経路とマトリックスプロテインに注目して免疫組織化学的に検索する。

4. 研究成果

(1) 炭酸ガスレーザーによる骨形成誘導能

ラット脛骨に炭酸ガスレーザーを照射すると 5 日目から骨髄側に新たに骨組織が形成される (図 2※)。一方歯科用バーで骨欠損を形成しても骨髄側には骨は誘導されなかった (図 3)。



図 2

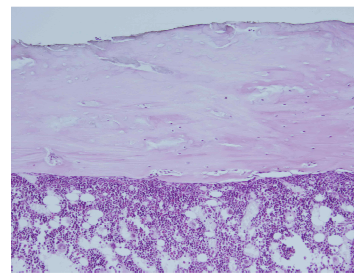


図 3

レーザー照射した 3 日目の骨組織の骨髄側では、照射部位に一致して骨髄細胞が凝集する像がみられた。さらにこれらの細胞では osteopontin の発現が強く認められた。一方、歯科用バーで骨欠損を作成した骨組織ではこのような現象は見られなかった。

さらに、骨髄細胞から分離した mRNA を調べた結果、レーザー照射した骨組織では、歯科用バーで欠損を作成した骨より焼く 1.8 倍多い osteopontin の発現が認められた (図 4)。

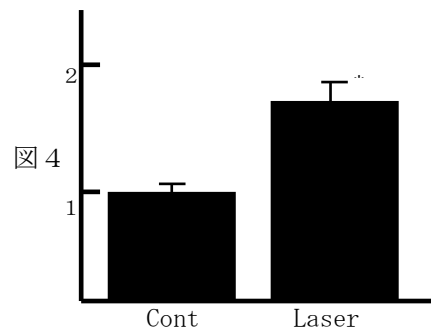


図 4

これらの結果は炭酸ガスレーザーで誘導

される骨組織の初期反応として osteopontin が重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2)炭酸ガスレーザー照射による骨細胞の反応

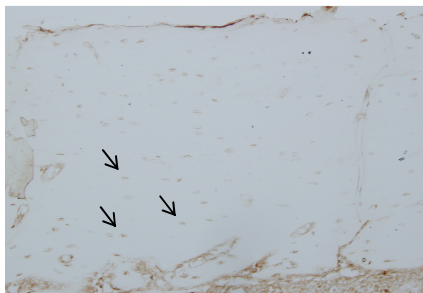
細胞がこのメカニズムを解明するために Wnt シグナルに注目して、Lef-1 と sclerostin の免疫染色を行った。レーザー照射後3時間の骨組織の骨細胞では照射部位に一致して、Lef-1 の発現が認められた (図5→)。

図5



レーザー照射部位から離れたところに存在する骨細胞では Lef-1 の発現は見られなかった。さらにレーザー照射後6時間の骨組織では同様にレーザー照射部位相当する皮質骨に存在する骨細胞に Lef-1 の発現がより強く認められた。しかしながら、骨形成が見られる照射後6日目の骨組織の骨細胞では Lef-1 の発現が認められなかった。また、wnt シグナル経路の阻害因子である sclerostin は Lef-1 の発現が強く見られた照射後3-6時間後の骨組織の骨細胞では発現が見られなかった。しかし、Lef-1 の発現が消失する照射後5日目の骨組織の骨細胞にその発現が見られるようになった (図6→)。

図6



以上の結果は炭酸ガスレーザー照射によって骨形成が誘導できることが明らかとなった。さらにそのメカニズムとして炭酸ガスレーザー照射が骨芽細胞の分化を促進し、そのときに骨基質タンパク質である osteopontin が重要な役割を果たすことが分かった。さらに炭酸ガスレーザー照射の物理的なメカニカルフォースを伝える機構とし

て骨細胞が重要な役割を果たし、さらにその刺激の伝達として Wnt 経路があり、Lef-1 と sclerostin が互いに調整し合って骨形成を調節していることが分かった。

これらの結果は今後炭酸ガスレーザーを骨再生療法に応用するために極めて有用な基礎データになるものである。

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 4 件)

横瀬敏志、大河内瑠夏、和田隆史、高橋一人、金子友紀、松浦芳久、安達仁、天野義和 「ラット切歯から分離した培養歯髄細胞に形成された石灰化結節の解析」日本歯科保存学会誌、査読あり、50(6)、2007、776-784

菊井徹哉、松浦芳久、中貴弘、横瀬敏志 「炭酸ガスレーザーによる漂白後エナメル質表面への hidroキシアパタイト融着の試み」日本レーザー歯学会、査読あり、19、2008、78-83

中貴弘、菊井徹哉、安達仁、中島宗隆、篠島美香、土田雄太、金井英納、成井和貴子、高橋一人、和田隆史、金子友紀、西村翼、横瀬敏志 「歯学部4学年学生に対する炭酸ガスレーザー実習の教育効果について(第2報)」日本レーザー歯学会、査読あり、19、2008、130-137

Tkahirō Naka, Satoshi Yokose. Immunohistochemical localization of Barx-2 in the developing fetal mouse submandibular glands. Acta Histochem. Cytochem. 42(2), 2009, 47-53.

[学会発表] (計 2 件)

金子友紀、和田隆史、横瀬敏志 他「卵巣摘出ラット脛骨に対する炭酸ガスレーザーの影響について」第129回日本歯科保存学会 2008年11月7日 富山国際会議場

安達仁、金子友紀、横瀬敏志 他「ラット脛骨のβTCP骨置換過程における組織化学的検索」第27回日本歯科保存学会 2007年11月9日 岡山コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横瀬 敏志 (YOKOSE SATOSHI)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：90245803

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者