

機関番号：32404

研究種目：「基盤研究 (C)」

研究期間：2008 年 ～ 2010 年

課題番号：20592233

研究課題名 (和文)

Enamel Proteins による修復象牙質形成誘導のメカニズム解明に関する研究

研究課題名 (英文)

A study of the mechanism of reparative dentin by Enamel Proteins.

研究代表者

中村 幸生 (YUKIO NAKAMURA)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：40207931

研究成果の概要 (和文)：

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を用いて Enamel Proteins (EMD) のメカニズムに関する検討を行った。HUVEC に EMD を添加して培養を行い、経時的に MMP-2, MMP-3, VEGF の発現量を ELISA と RT-PCR で観察したところ、MMP-2 に関して、12 時間、24 時間、48 時間後と発現量の増加が認められた。しかも各段階において Dose response の傾向も示された。

研究成果の概要 (英文)：

We found the secretion of MMP-2 from the HUVEC was significantly enhanced when the exposed EMD. This result was reflected by increases in both protein and mRNA levels. The elevation of MMP-2 secretion which we observed following addition of EMD also provides a possible mechanism to account for the adverse change in MMP-2 activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：Enamel Proteins, 修復象牙質, メカニズム, 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、Enamel Proteins が修復象牙質を形成する新生象牙芽細胞を中心とする硬組織形成細胞に対して直接的に働きかける能力を有していると考え始められた。

## 2. 研究の目的

Enamel Proteins の細胞への直接的な効果が明確でなかったため、修復象牙質形成を創傷治癒という観点から見直し、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を用いて血管新生に対する効果の検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 実験 1. HUVEC に EMD を添加して培養し、細胞増殖能を WST-1 assay で検索した。

(2) 実験 2. 培養された細胞に wounded を形成し、Migration を観察した。

(3) 実験 3. HUVEC に EMD を添加して培養し、経時的に MMP-2, MMP-3, VEGF の発現量を ELISA と RT-PCR で観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 実験 1. Cell Proliferation : HUVEC に EMD を添加した後に培養を行い、cell proliferation の観察を WST-1 assay を用いて試行した。結果は、EMD を添加して培養した場合の方が、細胞数の増加を認めた ( $P < 0.05$ )。

(2) 実験 2. Migration of HUVEC in a wound closure model : HuMedia EG2 medium で培養された細胞は、24 時間後に wounded を形成した。その後、HUVECEMD を添加して培養した細胞は、露出された創面に移動し、時間の経過と共に創面を補っていった。創面の閉鎖は僅かであるが、EMD を添加した方が早かった (図 1)。



図 1 9 hr EMD 50ug/mL 対物4倍

(3) 実験 3. : HUVEC に EMD を添加して培養を行い、経時的に MMP-2, MMP-3, VEGF の発現量を ELISA と RT-PCR で観察した。すると MMP-2 に関して、12 時間後、24 時間後、48 時間後と発現量の増加が認められた。しかも各段階において Dose response の傾向も示された。しかし、MMP-3 と VEGF の発現量に、変化は認められなかった。ELISA と RT-PCR の結果を図 2 と 3 にそれぞれ示す。

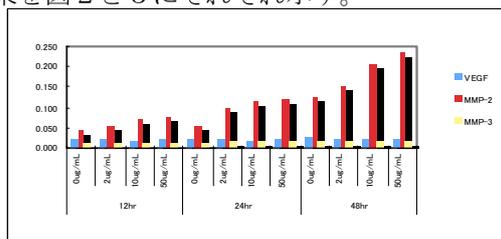


図 2

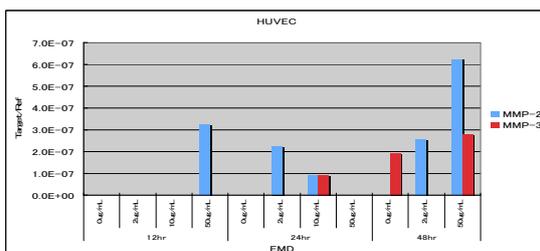


図 3

その他の実験結果 :

本研究は、Enamel Proteins が修復象牙質を形成する新生象牙芽細胞を中心とする硬組織形成細胞に対して直接的に働きかける能力を有していると考え始められた。しかし、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に対する EMD の石灰化に対する影響として、骨芽細胞分化試薬単独に比べ EMD を併用した場合に、石灰化は EMD の濃度依存的に増強されたのみであった。その他は、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対する EMD の細胞増殖への影響を検索したところ、RANKL を添加し破骨細胞へ分化誘導した RAW264.7 細胞において、EMD 添加した細胞群は対象群 (EMD 無添加) と比べて、ほとんど細胞増殖に影響を与えなかった。一方、RANKL を添加しなかった未分化の RAW264.7 細胞に対しては、細胞増殖の抑制傾向を示したのみであった。また、骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) に対する EMD の細胞増殖に対する影響については、EMD 添加後に培養した両細胞群は対象群と比べて、高濃度の EMD 添加で細胞増殖を抑制するにとどまった。

#### 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)

- Contreras RG, Vilchis JRS, Sakagami H, Nakamura Y, Nakamura Y, Hibino Y, Nakajima H, Shimada J.: Type of cell death induced by seven metals in cultured mouse osteoblastic cells. *In Vivo* 24, 507 - 512, 2010.
- 中村裕子, 杉山 僚, 小此木 雄, 関根慧, 牛込瑛子, 高橋慶壮, 小谷依子, 中村幸生 : *Enterococcus faecalis* が形成するバイオフィルムに対する中性電解機能水パーフェクトペリオの抗菌効果に関する基礎的研究; *日歯内療誌* 31, 29-35, 2010.
- Takano A, Hashimoto K, Ogawa M, Koyanagi J, Kurihara T, Wakabayashi H, Kikuchi H, Nakamura Y, Motohashi N, Sakagami H, Yamamoto K, Tanaka A.: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in human tumor cell lines: relationship to electronic structure. *Anticancer Res. Jan*;29(1):455-64, 2009.
- 久野木克典, 中村裕子, 中村幸生 : 複根管を伴った下顎小白歯の根管治療について; *日歯内療誌* 30, 171-176, 2009.
- 小林健二, 小谷依子, 中村幸生 : 再植歯における歯内療法処置の開始時期; *日歯内療誌* 30, 165-170, 2009.
- 小谷依子, 小林健二, 中村裕子, 高橋哲哉, 中村幸生 : 受傷後に Transient Apical Breakdown を生じたと考えられる症例の

- 臨床的検討；日外傷歯誌 5:72-78, 2009.
7. 大橋英夫, 高森一乗, 渡辺 茂, 中村幸生 : 齶蝕診断用のレーザーならびに光学機器について；日レ歯誌 20, 142-146, 2009.
  8. Sakagami H, Amano S, Kikuchi H, Nakamura Y, Kuroshita R, Watanabe S, Satoh K, Hasegawa H, Nomura A, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Taniguchi S, Oizumi T.: Antiviral, antibacterial and vitamin C-synergized radical-scavenging activity of Sasa senanensis Rehder extract. In Vivo 22, 471-476, 2008.
  9. Liu Y, Sakagami H, Amano O, Kikuchi H, Nakamura Y, Ishihara M, Kanda Y, Kunii S, Zhang W, Yu G. : Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by peplomycin in oral squamous cell carcinoma cell lines. Anticancer Res 28, 2197-2204, 2008.
  10. Murayama H, Miyahara K, Wakabayashi H, Kurihara T, Hashimoto K, Amano O, Kikuchi H, Nakamura Y, Kanda Y, Kunii S, Motohashi N, Sakagami H.: Tumor-specific cytotoxicity and type of cell death induced by benzocycloheptoxazines in human tumor cell lines.: Anticancer Res 28, 1069-78, 2008.
  11. Yamada Y, Hossain M, Shimizu Y, Kimura Y, Masuda Y, Nakamura Y, Matsumoto K. : Analysis of surface roughness and microleakage of fissure sealants following organic debris removal with Carisolv. J Dent 36, 130-137, 2008.

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 中村幸生 : シンポジウム I 「Enamel Proteinsの歯科保存領域における応用を考える」 Enamel Proteinsを用いた修復象牙質の形成誘導について. 第133回日本歯科保存学会 岐阜 2010年 8月.
2. 高橋哲哉, 牛込瑛子, 小林健二, 呉 崇史, 中村幸生: 新たな根管照射用レーザーマニピュレーターの開発. 第133回日本歯科保存学会 岐阜 2010年 8月.
3. 高橋哲哉, 牛込瑛子, 小林健二, 呉 崇史, 中村幸生: 薬液を応用した NiTi ファイル破折片の除去に関する研究 — 腐食した ProTaper\_の 3次元表示による観察— 第132回日本歯科保存学会 熊本 2010年 6月.
4. Takahashi T, Kobayashi K, Kotani Y, Kure T, Nakamura Y: Possibility of

removing Broken NiTi File using solution. The 15<sup>th</sup> Asian Pacific Endodontic Confederation. Tokyo April, 2009.

5. 中村裕子, 久野木克典, 林田千代美, 谷 暁子, 中村有良, 中村幸生 : 中性電解機能水パーフェクトペリオによる根管洗浄および抗菌効果について. 第130回日本歯科保存学会 札幌 2009年 6月.
6. 中村幸生 : 「初心者に必要な根管形成法を教えてください」と尋ねられたら、何と答えますか? — 歯内療法学の基礎実習から根管形成を考える— 日本歯内療学会 関東甲信越静岡支部 第4回ウインターセミナー. 2009年2月15日, 東京.
7. 久野木克典, 中村裕子, 杉山僚, 小此木雄, 林田千代美, 中村幸生 : 複根管を伴った下顎小臼歯の根管治療. 第130回日本歯科保存学会 札幌 2009年 6月.
8. 中村幸生 : エキシマレーザーは、歯科臨床の扉を開くことができるか? 第8回日本歯科用レーザー学会. 新歯科医師会館, 東京. 2008年9月
9. 小林健二, 小谷依子, 高橋徹哉, 牛込瑛子, 関根慧, 中村幸生 : 上顎側切歯にみられたOehlersのType I と Type III の歯内歯に対する治療. 第131回日本歯科保存学会 仙台 2009年 10月.
10. 牛込瑛子, 高橋徹哉, 小林健二, 小谷依子, 呉崇史, 関根慧, 中村幸生 : 薬剤を応用したNiTiファイル破折片の除去に関する研究. — 薬液温度の影響について — 第131回日本歯科保存学会 仙台 2009年 10月.
11. 中村幸生 : 損傷された歯髄に対する Enamel Proteinsを用いた新たな治療法の開発をめざして. シンポジウム II : 外傷歯に対する学際的対応 — 基礎・臨床の各分野から —, 第8回 日本外傷歯学会 学術大会 琉球大学, 沖縄. 2008年11月

〔図書〕(計 1 件)

中村幸生, 永末書店, 第3版エンドドンティックス. : 2010年, p51-p77.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 幸生 (NAKAMURA YUKIO)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：40207931

### (2) 研究分担者

橋本 研 (HASHIMOTO KEN)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号：70343457

### (3) 連携研究者

なし