

平成 22 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791390

研究課題名（和文） アディポカインの象牙質再生医療への応用

研究課題名（英文） Dentin regeneration by dental pulp stem cells with adipokine

研究代表者

安田 善之（YOSHIYUKI YASUDA）

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：80405670

研究成果の概要（和文）：

アディポネクチン(AD)は脂肪細胞より豊富に分泌される血中ホルモンで、AD 受容体 1 (AR1) および 2 (AR2) を介して血糖値の調節に重要な役割を果たすことで知られている。本研究では、AD の歯髄保存療法剤としての有用性を調べる目的で、ラット歯髄細胞における AD の機能を検討した。RT-PCR の結果、歯髄細胞において AR1 と AR2 のいずれの発現も認められた。さらに、ウエスタンブロット法により歯髄細胞において AR1 のタンパク質発現が見られた。AD の石灰化能への影響をアリザリンレッド染色により検討したところ、培地中への 10  $\mu$ g/ml AD 添加により 12 日後の石灰化結節の形成は有意に促進された。また、歯髄細胞の AD 処理により象牙質形成関連遺伝子である DSPP 発現が 8 日目に誘導されたが、コントロールの細胞では発現が検出できなかった。以上の結果より、AD は歯髄細胞の DSPP 発現を誘導することで石灰化を亢進する働きがあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Adiponectin is a blood hormone that is abundantly secreted by adipocytes, and is known to play an important role in the regulation of blood glucose levels through the mediation of adiponectin receptors 1 and 2 (AR1 and AR2, respectively). In this study, to evaluate the usefulness of adiponectin as a dental pulp-conserving agent, we investigated the function of adiponectin in dental pulp cells. RT-PCR analysis showed the expression of both AR1 and AR2 in dental pulp cells. Western blot analysis revealed AR1 protein expression in dental pulp cells. Alizarin Red staining showed that after the addition of 10  $\mu$ g/ml of adiponectin to the culture medium, the formation of mineralized nodules was significantly increased on Day 12. Treatment of dental pulp cells with adiponectin induced the expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene on Day 8. These results indicate that adiponectin promotes mineralization by inducing DSPP expression in dental pulp cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：象牙質再生、歯髄細胞、アディポネクチン、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 日常臨床において深在性う蝕に遭遇した際、安易に抜髄はせず極力歯髄を保護する目的で歯髄保存療法を行うのが望ましい。これは、歯髄喪失が機械的脆弱化による歯の破折、根管治療の不確実性による根尖性歯周炎の罹患、歯の感覚機能の喪失、う蝕抵抗性の低下や修復組織形成能の喪失などに繋がるためである。現在では、歯髄保存療法剤として水酸化カルシウム製剤を使用して、露髄面に硬組織形成を促進させる直接覆髄法が広く行われている。しかし、その高いアルカリ性のため生体局所での炎症反応や形成された被蓋象牙質の質や形成に要する期間などを考えた場合、改善すべき点は多い。したがって、象牙質・歯髄複合体の自己修復能力を最大限に利用して積極的に象牙質形成を誘導し、かつ生体親和性の高い歯髄保存療法剤の開発が望まれている。

(2) DSPPは象牙芽細胞に特異的に発現し、歯髄細胞から象牙芽細胞への分化マーカーとして知られている。また、DSPP遺伝子産物であるPPは、象牙質の非コラーゲン性タンパク質の50%を占める高リン酸化タンパク質である。これまでに我々は、PPと象牙質コラーゲンとの複合体が、*in vitro*の再石灰化実験系において高い石灰化誘導活性を示し、象牙質の石灰化において主要な役割を果たしていることを明らかとしてきた。つまり、歯髄細胞にDSPP発現を誘導することが、速やかな修復象牙質形成および確実な歯髄保存療法に繋がると考えられる。

(3) ADは脂肪細胞より豊富に分泌される血中ホルモンで、インスリン感受性を亢進させることで血糖値の調節において重要な役割を果たす。その作用は、筋肉と肝臓にそれぞれ著明に発現しているAD受容体1 (AR1)および2 (AR2)を介して、AMPキナーゼやPPAR $\alpha$ を活性化し、脂肪酸の酸化や骨格筋でのグルコースの取り込みを促進することによる。近年、ADとAR1が初代培養骨芽細胞にも発現し、ADがその増殖や分化を促進することが報告された。

2. 研究の目的

われわれは、ADの細胞分化促進作用に着目し、新規の歯髄保存療法剤としての有用性を検討する目的で、歯髄細胞の石灰化過程におけるADの機能を検討した。さらに、ADのDSPP発現に与える影響についても解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

4週齢ラット歯髄組織からコラゲナーゼ処理により歯髄細胞を調製し、10%ウシ胎児血清 (FBS, Sigma, USA) 含有 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。24 ウェルプレートに細胞を 5 x 10<sup>4</sup> cells / well 播種し、10% FBS 含有 DMEM で 24 時間培養後、無血清培地に交換し 24 時間血清飢餓状態に置いた。その後、培地を 2% FBS、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸、10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸含有 DMEM に交換し、組換え型ラットアディポネクチン (R&D systems, USA) を 0 (control 群), 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml の濃度で添加した。

## (2) 遺伝子発現の検討

サンプルとしてラット歯髓細胞を使用した。TRIzol Reagent (Invitrogen, USA)を用いて細胞回収後、Acid guanidinium-phenol-Chloroform (AGPC) 変法により total RNA の抽出を行った。RNA 量を吸光度計にて測定し、Oligo(dT)プライマー (Invitrogen)を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA より、Taq DNA polymerase (Invitrogen)と特異的プライマーを用いた PCR 法によりアディポネクチン、アディポネクチン受容体である AR1 および AR2 各遺伝子発現を検討した。Control としては、グリセロアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (G3PDH) を採用した。なお遺伝子増幅のための PCR 装置は GeneAmp PCR system9700 (Applied Biosystems)を用い、条件は 94°C で 5 分間反応させた後、94°C, 30 秒、55°C, 30 秒、74°C, 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、最後は 74°C で 10 分間反応させた。2% アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線下にて PCR 産物を検出した。

## (3) 石灰化の定量

アディポネクチン処理 8 日後に細胞を 70% エタノールにて 4°C, 1 時間固定後十分水洗した。40 mM アリザリンレッド S (pH4.2) 染色液で 10 分間染色し、蒸留水と PBS でそれぞれ 3 回洗浄後、光学顕微鏡下で石灰化結節を観察した。また、石灰化物の定量は 10% cetylpyridinium chloride による溶出液をマルチプレートリーダーの波長 570 nm で測定した。

## (4) ウェスタンブロット

0.02% トリプシン/EDTA 処理により細胞を回収した。可溶化バッファー (100 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X100) に懸濁後、氷上での超音波処理 (20 秒間) によって組織・細胞を破碎した。各サンプルのタンパク量を 20  $\mu$ g に調整し、2 $\times$ サンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 30% Glycerol, 0.01% Bromophenol blue, 2% SDS) を加え、100°C で 5 分間処理をした。得られたサンプルを 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、その後ニトロセルロース膜に 20V、30 分間の条件により転写した。膜を 10% Bovine Serum Albumin 含有 PBS で 30 分間ブロッキングした後、抗 AR1 抗体 (1000 倍希釈、Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) に反応させた。0.5% Tween 20 含有 PBS にて洗浄後、Horse Radish Peroxidase 結合抗ウサギ IgG

抗体 (2000 倍希釈、Sigma) と反応させ、ECL (Amersham Biosciences, USA) を用いてシグナルを検出した。

## (5) 統計処理

実験結果のすべての数値は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。また、得られたデータは統計ソフト (GraphPad Prism 4) を用いて分散分析とポストホックテストにより、有意水準 5% における有意差検定を行った。

## 4. 研究成果

(1) ラット歯髓細胞における AD 受容体である AR1 と AR2 の遺伝子発現を RT-PCR にて調べた結果、いずれの発現も認められた。さらに、ラット歯髓細胞における AR1 のタンパク質発現を抗 AR1 特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により解析したところ、ポジティブコントロールであるラット心臓抽出液と同様に約 40 kDa の分子量を持つバンドが検出された。また、AR2 のタンパク質発現も歯髓細胞において検出された。

(2) 歯髓細胞の石灰化能に与える AD の役割を調べるために、石灰化結節の形成をアリザリンレッド染色にて光学顕微鏡下で観察した。10  $\mu$ g/ml AD 添加群では 12 日後の石灰化結節の形成は明らかに増加した。さらに、石灰化量をマイクロプレートリーダーにより定量したところ、10  $\mu$ g/ml AD 添加群はコントロールに比べて約 1.6 倍と有意に増加した。しかし、0.1 および 1  $\mu$ g/ml AD 添加群ではコントロールとの間に有意な差は認められなかった。さらに、10  $\mu$ g/ml の AD 添加により、4 日後では DSPP の発現はコントロールと同様に認められなかったが、8 日後では DSPP の発現はコントロールに比べて著しく増加した。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Y. Yasuda, E. Ohtomo, T. Tsukuba, K. Okamoto, T. Saito. Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells. Int Endod J, 42, 940-946, 2009 査読有

② Y. Yasuda, T. Koike, T. Kawamorita. Adiponectin induces dentin sialophosphoprotein in rat dental pulp cells: an in vitro study. J Endod 34, 679-683, 2009 査読有

〔学会発表〕(計4件)

①安田善之ら、MTA セメントは歯髄細胞の BMP-2 発現を誘導する。アジア歯内療法学会 平成21年4月25日 東京

②安田善之ら、ヒト象牙質フォスフォオリン由来ペプチドを用いた新規骨再生材料の開発 日本骨代謝学会 平成21年7月23日 大阪

③安田善之ら、象牙質フォスフォオリン由来ペプチドのヒト間葉系幹細胞の石灰化に与える影響 日本歯科基礎医学会 平成21年9月10日 新潟

④安田善之ら 象牙質フォスフォオリン由来ペプチドの石灰化への影響について 日本再生歯科医学会 平成21年9月12日 小倉

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安田 善之 (YOSHIYUKI YASUDA)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：80405670