

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：32622  
 研究種目：基盤（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592429  
 研究課題名（和文） 歯髄の修復象牙質産生機序へ血管系が及ぼす影響  
 研究課題名（英文） The effect of endothelial cells to the reparative dentine process of pulp.  
 研究代表者  
 増田 宜子（MASUDA YOSHIKO）  
 昭和大学・歯学部・講師  
 研究者番号：10297038

研究成果の概要（和文）：培養血管内皮細胞にレーザーによって無菌的に広範囲に損傷を与え、損傷を受けた血管内皮細胞の歯髄細胞に与える影響を調べたところ、血管に刺激が加えられた5日後に、歯髄細胞を含む血管内皮細胞においてのみ TGF- $\beta$ 1、osteocalcin 遺伝子の発現が認められた。遊走した歯髄細胞がこれらを発現している、もしくは共培養することによって発現が促進されたと推測された。さらに損傷を受けた血管内皮細胞と歯髄細胞の TGF- $\beta$ 1 の発現を免疫組織学的に検討した結果レーザー照射8日後の血管内皮細胞において 緑色（AcGFP1）で標識された歯髄細胞にて TGF- $\beta$ 1 の発現が認められた。

研究成果の概要（英文）：The dental pulp is a microcirculation-rich tissue. The abundant vascular network may influence the process of the tertiary dentin formation. we investigated the effects of the injured endothelial cells on rat cultured dental pulp cells using the Nd:YAG laser irradiation. After 5 days, *tgf- $\beta$ 1* expression was detected clearly in the laser irradiated RAOEC with pulp cells though the expression was weak without pulp cells. These findings suggest that after laser irradiation, the *tgf- $\beta$ 1* expression is enhanced rapidly by the migrated pulp cells or the co-culture of both cells. Immunohistochemical examination showed that after 8 days, the AcGFP1 labeled-pulp cells in endothelial cells expressed TGF- $\beta$ 1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	70,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯髄細胞、血管、修復象牙質

### 1. 研究開始当初の背景

歯髄にくまなく広がる血管ネットワークが歯髄細胞の修復象牙質形成に影響を及ぼしている可能性が Mathieu らによって示唆された。(参考文献; Mathieu S. *et al.*, 2005, Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. Arch. Oral Biol. 50:109-113) Mathieu らは血管内皮細胞にメスによって損傷を与え、歯髄細胞が損傷を受けた血管内皮細胞上に遊走してくることを報告した。

### 2. 研究の目的

培養血管内皮細胞にレーザーによって無菌的に広範囲に損傷を与え損傷を受けた血管内皮細胞の歯髄細胞に与える影響を調べることとした。

### 3. 研究の方法

5週齢の雄性 Wister ラット4匹の下顎切歯より歯髄組織を摘出し、Collagenase、trypsin、EDTA を含む酵素液にて細胞を分離し5%CO<sub>2</sub> 条件下にてα-MEM 培地に10% FBSを加え培養した。一方ラット大動脈内皮細胞(凍結細胞)(旭硝子)をラット内皮細胞成長培地(旭硝子)にて培養した。それぞれコンフルエントになったら1 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の濃度で6 well plate (Transwell®, Corning Inc.)の上段に歯髄細胞、下段に血管内皮細胞を継代した。上段の底は直径8.0μmの孔のポリカルボネートの膜で覆われている。下段の血管内皮細胞には、Nd:YAG レーザーを0.5 w, 20 pps, 30秒照射し細胞に損傷を与えた。37℃、5%CO<sub>2</sub>にて培養し5、12日後に下段の遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞のTotal RNAを調整しcDNAを合成しosteocalcin、TGF-β1の遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた。コントロールとして上段に歯髄細胞を培養しないレーザーを照射した血管内皮細胞を用いた。さらに歯髄細胞にAcGFP1蛍光蛋白質ベクターを導入し標識し免疫組織染色によってTGF-β1タンパクの発現を調べた。レ

ーザー照射8、14日後に下段の遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞を10%ホルマリンにて固定した。免疫組織学染色には、1次抗体として500倍希釈のウサギ抗ヒトTGF-β1抗体(Santa Cruz Bio, Inc.)を用いた。2次抗体として500倍希釈のCy3-ヤギ抗ウサギIgG抗体を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。コントロールとして上段に歯髄細胞を培養せずレーザーを照射した血管内皮細胞と上段に歯髄細胞を培養しレーザーを照射しない血管内皮細胞を下段に培養したもの、血管内皮細胞のみを培養したのものを用いた。

### 4. 研究成果

RT-PCRの結果5、12日の遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞においてTGF-β1、osteocalcin遺伝子の発現がわずかに認められた。12日では、TGF-β1、osteocalcinの遺伝子の発現がコントロールにおいても認められた。)レーザー照射8日後の血管内皮細胞において緑色(AcGFP1)で標識された歯髄細胞にてTGF-β1の発現が認められた。血管内皮細胞においてもTGF-β1の発現がわずかに認められた。コントロール群では、TGF-β1の発現は認められなかった。レーザー照射14日後では、TGF-β1の発現が認められる血管内皮細胞の数が増加した。コントロール群では、レーザー照射血管内皮細胞、上段に歯髄細胞を培養した血管内皮細胞においてTGF-β1の発現が認められた。

(考察及び結論)血管に刺激が加えられた5日後に、歯髄細胞を含む血管内皮細胞においてのみTGF-β1、osteocalcin遺伝子の発現が認められることから遊走した歯髄細胞がこれらを発現している、もしくは共培養することによって発現が促進されたと推測される。早期にosteocalcin遺伝子の発現が認められることからレーザーの出力が強すぎると考えられるため出力を調整する必要がある。血管に刺激が加わると早期に遊走した歯髄細胞にてTGF-β1が発現し血管内皮細胞

における TGF- $\beta$ 1 の発現も高められていた。遊走した歯髄細胞が TGF- $\beta$ 1 を発現し共培養することによって TGF- $\beta$ 1 の発現が促進されたと推測される

#### 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 14 件)

- ① 木村裕一、田辺理彦、山崎信夫、木下潤一郎、大場崇史、山田嘉重、増田宜子、渡辺治爾、松本光吉  
DIAGNOdent® による歯根破折の診断に関する基礎的研究  
日本歯科保存学雑誌、第 5 2 巻第 1 号、P 1 2 - 1 9、2 0 0 9
- ② Kimura Y, Tanabe M, Amano Y, Kinoshita JI, Yamada Y, Masuda Y  
“Basic study of the use of laser on detection of vertical root fracture.”  
J Dent, 37, 909-912, 2009
- ③ Masuda, M. Y., Kobayashi M, Wang, X., Yamada Y, Kimura Y, Hossain, M., Matsumoto, K.  
“Effect of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells.”  
Acta Histochemica, 452-458, 2010.
- ④ Xingzhe Yin, Gary Shun-pan Cheung, Chengfei Zhang, Yoshiko Masuda, Yuichi Kimura, Koukichi Matsumoto  
Micro-computed tomographic comparison of nickel-titanium rotary versus traditional instruments in c-shaped root canal system  
J Endod,36(4)708-712, 2010.
- ⑤ 増田宜子、大場崇史、山田嘉重、藤島昭宏、宮本洋一、木村裕一、上條竜太郎  
磁場下プログラムフリーザーを用いた歯髄細胞の凍結保存に関する研究  
日本歯科保存学雑誌、第 5 3 巻第 3 号、P 2 7 4 - 2 8 0, 2 0 1 0
- ⑥ Masuda, M. Y., Kobayashi M, Wang, X., Yamada Y, Kimura Y, Hossain, M., Matsumoto, K.  
Effect of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells.  
Acta Histochemica, 112, 452-458, 2010.
- ⑦ Xingzhe Yin, Gary Shun-pan Cheung, Chengfei Zhang, Yoshiko Masuda, Yuichi Kimura, Koukichi Matsumoto  
Micro-computed tomographic comparison of nickel-titanium rotary versus traditional instruments in c-shaped root canal system  
J Endod,36(4)708-712, 2010.
- ⑧ Masuda YM, Wang X, Yokose S, Yamada Y, Kimura Y, Okano T, Matsumoto K.  
Effect of glypican-1 gene on the pulp cells during the reparative dentine process.  
Cell Biol Int., 34, 1069-1074, 2010.
- ⑨ Yoshishige Yamada, Mozammal Hossain, Yuichi Kimura, Yoshiko Masuda, Jayanetti Asiri Jayawardena, Yuya Nasu.  
Removal of organic debris from

occlusal fissures: advantage of carisolv system over sodium hypochlorite.

J Clin Pediatric Dent., 35, 75-79, 2010.

- ⑩ 山田嘉重, 増田宜子, 川中岳雄, 木村裕一, 真鍋厚史, 久光久, 藤島昭宏, 宮崎隆  
ブロメラインとオレンジオイルを用いた試作齶蝕象牙質除去剤に対する評価  
日本歯科保存学雑誌、第 54 巻第 2 号、  
P142-152, 2011.
- ⑪ 木村裕一, 今井啓全, 佐藤穂子, 佐藤 克, 山崎信夫, 山田眞義, 天野義和, 増田宜子, 山田嘉重, 亀田歩, 木庭健次  
各種漂白剤の漂白効果と歯に及ぼす影響.  
日本歯科保存学会雑誌 第 54 巻第 3 号、  
P162-168, 2011.
- ⑫ 増田宜子  
マイクロスコープを使用した根管治療  
Dental Medicine Research 31(2):  
169-173, 2011
- ⑬ 宮崎隆, 高橋浩二, 高橋敏, 阿部有吾, 内田圭一郎, 増田宜子, 石田圭吾, 小野寺正則, 桑澤美希, 岡野友宏  
東日本大震災に派遣された昭和大学医療救援隊における歯学部職員・大学院生の活動報告  
Dental Medicine Research 31(2):185-199, 2011.
- ⑭ Yuichi Kimura, Michihiko Tanabe, Hiroaki Imai, Yoshikazu Amano, Yoshiko Masuda, Yoshishige Yamada  
Histological examination of experimentally infected root canals

after preparation by Er:YAG laser irradiation.

Lasers in Medical Science 26:749-754, 2011.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 大場崇史, 山田嘉重, 木下潤一郎, 増田宜子, 川中岳雄  
レーザーを用いた根管形成についての基礎的研究  
(第 130 回) 日本歯科保存学会 2009 年 6 月 11、12 日
- ② 仲田泰治, 山田嘉重, 増田宜子, 那須祐弥, 清水由子, 玉置幸道, 藤島昭宏  
種々の薬剤を用いた科学的齶蝕除去効果の検討  
(第 131 回) 日本歯科保存学会 2009 年 10 月 29、30 日
- ③ 増田宜子, 山田嘉重  
レーザー照射血管内皮細胞がラット培養歯髓細胞へ与える影響について  
(第 131 回) 日本歯科保存学会 2009 年 10 月 29、30 日
- ④ 大場崇史, 増田宜子, 山田嘉重, 藤島昭宏, 宮本洋一, 上條竜太郎  
CAS プログラムフリーザーを用いた歯髓の凍結保存について  
(第 131 回) 日本歯科保存学会 2009 年 10 月 29、30 日
- ⑤ 小林未歩, 増田宜子, 山田嘉重, 玉置幸道  
META/MMA-TBB resin 添加 MTA の物理的強度の測定  
(第 131 回) 日本歯科保存学会 2009 年 10 月 29、30 日

- ⑥ 増田宜子、木村裕一、木下潤一郎、山田嘉重  
 DIAGNOdent® による歯根破折の診断に関する基礎的研究—界面活性剤が及ぼす影響—  
 昭和大学歯学部ハイテク・リサーチ・センター平成21年度研究成果発表会  
 2010年3月6日
- ⑦ 山田嘉重、増田宜子、川中 岳雄、真鍋厚史、久光 久、藤島 昭宏、宮崎隆  
 ブロメライン酵素とオレンジオイル併用による齲蝕除去歯面にたいする接着性の評価 日本歯科保存学会（第132回）2010年6月4日
- ⑧ 川中 岳雄、山田嘉重、増田宜子、玉置 幸道、宮崎 隆  
 レーザーと次亜塩素酸ナトリウムによる組み合わせによる塩素ガス発生への検討  
 （第二報—距離の違いによる測定）  
 日本歯科保存学会（第132回）2010年6月4日
- ⑨ 山田嘉重、増田宜子、川中 岳雄、真鍋厚史、久光 久、藤島 昭宏、宮崎隆  
 BO 試薬と Nd:YAG レーザー併用による齲蝕除去効果に関する検討  
 日本歯科保存学会（第133回）2010年10月29日
- ⑩ 亀田歩、増田宜子、大塚玲美、山田嘉重、東光照夫、玉崗慶鐘、久光久  
 歯面処理材及び歯面コート材による漂白エナメル質再着色への影響
- 日本歯科保存学会（第133回）2010年10月29日
- ⑪ 増田宜子、山田嘉重、宮本洋一、上條竜太郎  
 レーザー照射血管内皮細胞がラット培養歯髓細胞へ与える影響について  
 日本歯科保存学会（第133回）2010年10月29日
- ⑫ 山田嘉重、増田宜子  
 ラットにおけるアメロジェニン遺伝子の発現様式への検討  
 —PCRによる基礎的解析—  
 エナメル質比較発生学 懇話会 2010年7月10, 11日
- ⑬ 鈴木重紀、増田宜子、山田嘉重、渡辺治爾、川中岳雄、岡野友宏、宮崎隆  
 昭和大学歯科病院歯内治療科における臨床統計（2010年1月から6月まで）  
 昭和歯学会例会（第30回）2010年12月4日
- ⑭ 大塚玲美、増田宜子、山田嘉重、宮崎隆  
 根管洗浄剤が歯科用充填剤に及ぼす影響  
 日本歯科保存学会（第134回）2011年6月9, 10日
- ⑮ 高橋浩二、阿部有吾、内田圭一郎、増田宜子、石田圭吾、桑澤実希  
 昭和大学医療救援隊としての歯科救援活動—M9.0 大震災後の災害歯科支援—  
 昭和歯学会例会（第31回）2011年7月2日

⑩ 増田宜子、山田嘉重、宮本洋一、上條竜太郎

血管内皮細胞がラット培養歯髓細胞へ与える影響について

日本歯科保存学会（第135回）2011年10月20、21日

⑪ 山田嘉重、増田宜子、木村裕一

BO 試薬による根管拡大・形成時の操作性向上の可能性に対する検討

日本歯科保存学会（第135回）2011年10月20、21日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 宜子 (MASUDA YOSHIKO)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：10297038

### (2) 研究分担者

山田 嘉重 (YAMADA YOSHISHIGE)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：40360127

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：