

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791851

研究課題名（和文） 歯髄細胞の硬組織形成細胞への分化に及ぼすメカニカルストレスの影響

研究課題名（英文） Effects of mechanical stress on the differentiation into hard tissue formation cells from dental pulp cells

研究代表者

白川 哲（SHIRAKAWA SATOSHI）

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50460176

研究成果の概要（和文）：ラット歯髄由来細胞株 RPC-C2A はメカニカルストレスを加えることで硬組織形成細胞への分化の指標である ALP 活性は低下した。また、ヒト歯髄由来細胞にメカニカルストレスを加えることで、同様に ALP 活性は低下した。これらのことから、歯髄由来細胞にメカニカルストレスを加えると硬組織形成細胞への分化は抑制されることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：The alkaline phosphatase activity, that shows the differentiation into hard tissue formation cells, on RPC-C2A cells was suppressed by mechanical stress. Also, alkaline phosphatase activity on human dental pulp cells was similarly suppressed by mechanical stress. These results show mechanical stress may suppress hard tissue formation cell.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |

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：歯内療法学、メカニカルストレス

### 1. 研究開始当初の背景

象牙質は発生学的に歯髄と同様に外胚葉性間葉系の歯乳頭の細胞由来である。象牙質はその形成細胞を歯髄に持った特殊化した結合組織であり、組織学的にも同一であり、象牙質と歯髄を合わせて象牙質・歯髄複合体（dentin-pulp complex）としてみなされている。

象牙質・歯髄複合体の細胞は刺激に対しては防御的・修復的に象牙質を形成・添加し、歯髄組織の恒常を保とうと働くと考えられる。そのため、歯髄が象牙質を形成す

るメカニズムに対し多くの研究がなされている。*in vivo* や *in vitro* での成長因子による象牙質形成や石灰化、再生療法の試み、ヒートストレスなどの刺激による歯髄細胞の動態をみる研究もなされ多く報告されている（Ishimatsu *et al.*, *J Endod*, 2009; Nakashima *et al.*, *J Endod*, 2005; Kitamura *et al.*, *J Cell Biochem*, 2006）。

ところで、生体では石灰化を起こさないヒトの歯根膜組織において、その組織由来の細胞（ヒト歯根膜由来細胞）は *in vitro* の静置培養条件下で高い alkaline

phosphatase (ALP) 活性を有し、石灰化物の形成を起こす。そのため、歯根膜細胞は線維芽細胞様の形態を示すが、骨芽細胞様線維芽細胞と考えられている。しかしながら、*in vitro* において *in vivo* を模した動的環境下でヒト歯根膜由来細胞に周期的伸展によるメカニカルストレスを与えると ALP 活性は低下し、その細胞特性を示す遺伝子 (Periostin) 発現は増強した (白川, 日歯周誌48巻2号;113-122, 2006)。あるいは、メカニカルストレスを用いることで、通常の静置培養条件下では得られない知見が報告されている。間葉系幹細胞の骨芽細胞への変化 (Haung et al., *J Cell Biochem*, 2009)、ES細胞の血管平滑筋細胞への分化促進 (Shimizu et al., *J Appl Physiol*, 2008)、骨芽細胞の遺伝子発現の変動 (Lin et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2006) 等の報告があり、メカニカルストレスは各研究分野において注目され、用いられている。

## 2. 研究の目的

象牙質・歯髄複合体は刺激に対し防衛的・修復的に象牙質を形成し、歯髄組織の恒常を保とうと働く。歯髄細胞の硬組織形成に対するメカニズム解明のために、*in vitro*、*in vivo* の研究がなされ、多く報告されている。従来の研究では成長因子等を添加するのみの静置培養系といえるが、近年メカニカルストレスを細胞に応用する動的培養系が注目され、静的条件とは違う知見が得られている。

そこで本研究では、予備的検討から得たデータを元に、メカニカルストレスをラット歯髄細胞株 RPC-C2A およびヒト歯髄由来細胞に応用し、硬組織形成能に与える影響を分子生物学的手法を用い検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 細胞培養

矯正学的理由から便宜的に抜歯を必要とし本研究の趣旨を説明し同意の得られた患者より歯を提供してもらった。提供された歯は頬舌的に割断し内部より歯髄組織を採取した。採取した歯髄組織は 0.04mg/ml dispase、0.03mg/ml collagenase を含む PBS リン酸緩衝液中にて 30 分間酵素処理をした。その後、遠心分離を行い細胞を回収し、10%牛胎児血清を添加した  $\alpha$ -MEM を用い 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。歯髄由来の細胞は 4~5 代継代培養し、本研究に供した。また、供与を受けたラット歯髄由来細胞株 RPC-C2A も本研究に用いた。

### メカニカルストレスの適用

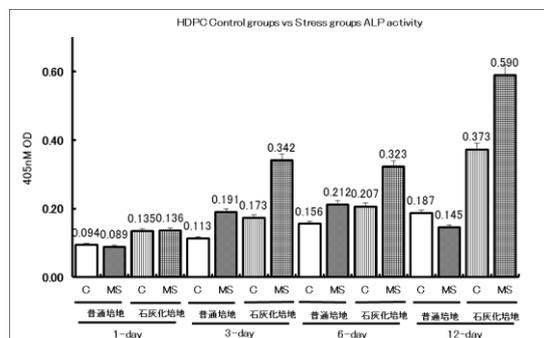
メカニカルストレス (MS) は Flexcell 社の Flexercell を用いて細胞進展率 10%、6 回/分の条件下で適用した。MS 適用時の培地は普通培地 ( $\alpha$ -MEM+2%FBS+2%Pn-St) ならびに石灰化培地 (普通培地+50  $\mu$ M ascorbic acid, 10mM,  $\beta$ -glycerophosphate, 10<sup>-8</sup>M 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D<sub>3</sub>)) とした。MS 適用後 5 ならびに 10 日で assay は行った。

## 4. 研究成果

### (1) 予備的研究の結果

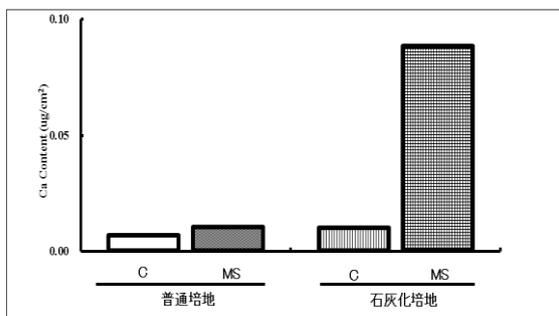
ヒト歯髄由来細胞にメカニカルストレスを与え硬組織形成細胞への分化に関する予備的検討を行った。ヒト歯髄由来細胞を普通培地 ( $\alpha$ -MEM+2%FBS+1%Pn-St) と石灰化培地 (普通培地+50  $\mu$ M ascorbic acid, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate) で培養し、ストレスを与えないグループ (コントロール、以下 C 群) と与えるグループ (メカニカルストレス、以下 MS 群) に分けて assay を行った。

硬組織形成細胞への分化指標である ALP 活性は普通培地の C 群および MS 群に比べ石灰化培地の C 群で経時的に上昇した。一方で、石灰化培地の MS 群では ALP 活性はより上昇した (図 1)。



～ 図 1 ALP 活性～

また Ca 沈着量を測定したところ石灰化培地の MS 群で Ca 沈着量が顕著に亢進した。しかしながら、普通培地の C 群および MS 群より ALP 活性の高かった石灰化培地の C 群では Ca 沈着量において大きな変化は認められなかった (図 2)。



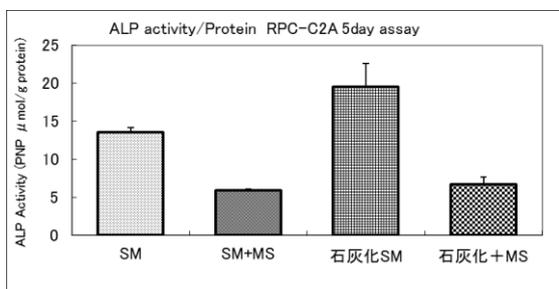
～ 図 2 Ca 沈着量～

これらのことからメカニカルストレスはヒト歯髄由来細胞の osteogenic な細胞への分化を促進する因子と考えられた。

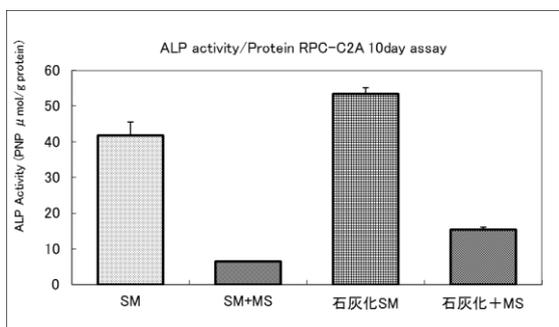
## (2) 本研究の結果

### ①ラット歯髄細胞株 RPC-C2A に対するメカニカルストレスの影響

ラット歯髄細胞株 RPC-C2A にメカニカルストレスを与え、硬組織形成細胞への分化を検討するため、ALP assay を行った。メカニカルストレス適用後 5、10 日目のデータを示す (図 1, 2)。



～ 図 3 RPC-C2A ALP assay 5 日目～



～ 図 4 RPC-C2A ALP assay 10 日目～

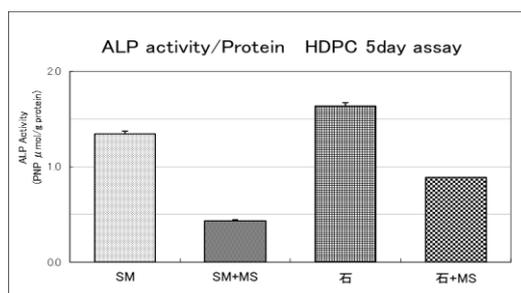
メカニカルストレス適用後、普通培地では 5 日目においてメカニカルストレスを与えていないコントロールと比べ ALP 活性は低く、また、石灰化誘導をかけた培地においてメカ

ニカルストレスを適用した場合においても同様であった。このことから、メカニカルストレスは RPC-C2A の ALP 活性を抑制している可能性が示された。

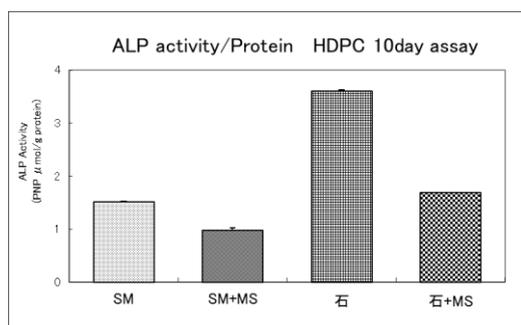
さらに、10 日目においても同様の結果を示した。

### ②ヒト歯髄由来細胞 (HDPC) に対するメカニカルストレスの影響

HDPC にメカニカルストレスを与え、硬組織形成細胞への分化を検討するため、ALP assay を行った。メカニカルストレス適用後 5、10 日目のデータを示す。



～ 図 5 HDPC ALP assay 5 日目～



～ 図 6 HDPC ALP assay 10 日目～

メカニカルストレス適用後、普通培地では 5 日目においてメカニカルストレスを与えていないコントロールと比べ ALP 活性は低く、また、石灰化誘導をかけた培地においてメカニカルストレスを適用した場合においても同様であった。このことから、メカニカルストレスは RPC-C2A の ALP 活性を抑制している可能性が示された。

さらに、10 日目においても同様の結果を示した。

### ③まとめ

ラット歯髄由来細胞株 RPC-C2A ならびにヒト歯髄由来細胞に普通培地あるいは石灰化誘導培地にてメカニカルストレスを与えたところ、硬組織形成細胞への分化の指標である ALP 活性はどちらも抑制された。また、ヒト歯髄細胞に対して生成された Ca 沈着物を

染色するアリザリンレッド染色と Ca 沈着量をメカニカルストレス適用後、測定した。アリザリンレッド染色においては染色はされず、また、Ca 沈着量を測定したところ、沈着はしていないことが確認された（どちらもデータ非公開）。以上の assay を通して硬組織形成細胞への分化は否定的な結果となった。

予備的研究では硬組織形成細胞への分化傾向が確認されたが、1 検体のみの assay であった。今回この実験系では樹立されている cell line を使用し、また、ヒト歯髄由来細胞を使用する場合には検体を毎回変え行った。どの結果においても ALP 活性は抑制されたことから、歯髄細胞へメカニカルストレスを与えると硬組織形成細胞への分化は抑制することが考えられた。

また、メカニカルストレスを与えたことで硬組織形成細胞への分化の抑制と考えるか、あるいは逆に線維芽細胞様細胞への分化を起こしている（促進している）可能性も否定できない。今後は遺伝子レベルにおいてその検討を行っていく次第である。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 哲 (SHIRAKAWA SATOSHI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：50460176