

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592885

研究課題名(和文) 歯髄細胞の smads を誘導するシグナル伝達・転写因子ネットワークマップの作成

研究課題名(英文) Creating a signaling-transcription factor network map that induces smads of dental pulp cells

研究代表者

松島 潔 (Matsushima, Kiyoshi)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：00157306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：BMPなどのTGF-βスーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担うsmadsを歯髄の硬組織形成能の促進・抑制を制御している因子と捉え、特異型smad1,5,8の発現、抑制型smad6,7の発現によって、硬組織形成能の制御していることを見出している。波長660 nmと810 nmのレーザー照射によるメカニカルストレスを歯髄細胞に作用させると、660 nmではsmad1の増加を、810 nmではsmad5の増加を強く認めた。一方、キニンを産生するブラキケインを作用させると硬組織形成を促進するSmad1, 5は時間依存的に増加した。smad6は常に一定の遺伝子発現を認め変化がない。

研究成果の概要(英文)：The smads responsible for TGF-β superfamily of intracellular signaling, such as BMP it's regarded as a factor that controls the promotion and suppression of hard tissue forming ability of the dental pulp. Expression of specific type smad1,5,8, by expression of inhibitory smad6,7, it is found that you have control of the hard tissue forming ability. When mechanical stress by laser with a wavelength of 660 nm or 810 nm to irradiate on pulp cells, an increase in the smad1 660 nm, was observed strongly increased the 810 nm smad5. On the other hand, it is allowed to act the kallikrein to produce kinin to promote hard tissue formation Smad1, 5 was increased in a time-dependent manner. smad6 is there is no change recognized a certain gene expression.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄組織 硬組織形成能 メカニカルストレス レーザー照射 smads BMP

1. 研究開始当初の背景

近年、欠損歯を補う手段としてのインプラントの技術が急速に発展し、さらに安定したインプラントを維持するためには早めの抜歯を望む傾向が現れてきている。しかし、患者の QOL を高めるためには自身の歯で噛み続けることを目標とすることに異論はないと考えている。根尖性歯周炎や歯根破折は歯を失う原因として高い割合を占めており、これらの疾患の多くは歯髄を失うことに起因している。一方、臨床では不可逆性歯髄炎として抜髄に至り、歯髄を失うことになる。そこで歯内療法学、保存学としては抜髄などの歯髄除去療法の適応症を減らし、歯髄保存療法の適応範囲を拡大するために新たなアプローチが必要である。

BMP などの TGF-beta スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担う smad を歯髄の硬組織形成能の促進・抑制を制御している因子と捉え、歯髄組織の硬組織形成能における調節機構と考えている。

申請者らは今までに低出力半導体レーザーを、歯髄培養細胞に照射することによる硬組織形成能の増大を報告、半導体レーザー照射による歯髄硬組織形成能促進にレーザー照射によって発生したヒドロキシラジカルが大きく関与していることを報告し、また、炎症とのかかわりについては歯髄培養細胞の Prostaglandin E₂ (PGE₂) による硬組織形成能の分化促進と Insulin-like Growth Factor との関わりについて報告してきた。同様に炎症性サイトカインの一つである TNF-α が ALP 活性に与える影響を観察の中で、骨形成誘導タンパク質 (BMP) などの TGF-β スーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担う smads のうち smad7 が炎症性サイトカインによる転写因子とされる NF-κb によって調節され、smad7 の発現によって、硬組織形成能を有する細胞に分化した指標となる ALP 活性を抑制し、また NF-κb の阻害剤を添加し、TNF-α を作用させると有意に ALP 活性の上昇がみられ、促進に関与する smad と抑制に関与する smad によって調節されていることを報告した。

2. 研究の目的

歯髄に加わる種々の刺激、すなわち炎症性の刺激 (ケミカルメディータ、炎症性サイトカイン) や硬組織形成能促進を目的とした半導体レーザー照射などのメカニカルフォースが、特異型 smad あるいは抑制型 smad を発現するまでのシグナル伝達・転写因子の動態を検索し、歯髄細胞が硬組織形成能を有する制御機構を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

半導体レーザー照射や炎症に関わるタンパク質などを歯髄培養細胞に作用させ、smad の発現、硬組織形成を観察する。

(1) 異なる波長の半導体レーザーが歯髄培養細胞の硬組織形成に及ぼす影響

培養細胞 健全歯第三大臼歯から取り出した歯髄を 5~8 代継代させて歯髄培養細胞として、研究に供した。日本大学松戸歯学部倫理委員会承認 (承認番号:EC12-010) 培地は継代培養中: α-MEM, 10 %FCS, Antibiotics、レーザー照射後: 境内培養の培地, 2 mM b-glycerophosphoric acid, 50 mg/ml ascorbic acid

レーザー照射 発生装置 Diode laser (OSADA, JAPAN) DIOTRON 1000V (810 nm, 300 mW) : 18.71 J/cm² と OSADA LIGHTSURGE SQUARE 試作機 (660 nm, 300 mW) : 18.71 J/cm² の 2 波長のレーザー照射器を用いた。レーザー照射中の培地は、PBS に交換。レーザー照射器は細胞面から 10 cm 離し、細胞面では直径 35 mm の照射になるように設定し、600 秒照射した。

遺伝子発現の観察 (RT-PCR) osteocalcin, BMP2, BMP4, smad-1, 5, 6, 7

タンパク質量の測定 (ELISA) osteocalcin, osteopontin

活性の測定 ALP

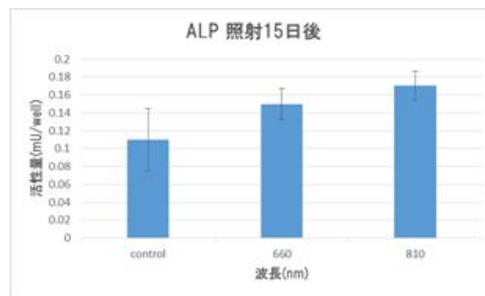
石灰化物の産生の測定 von Kossa 染色

(2) kallikrein による歯髄培養細胞の smads の遺伝子発現に与える影響

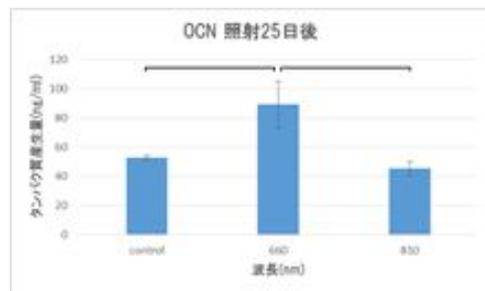
細胞培養は (1) と同様

培養細胞に kallikrein 作用後に RNeasy® Mini (QIAGEN) を用いて total RNA の抽出を行った。total RNA, DNA primer, QIAGEN® One Step RT-PCR KIT (QIAGEN) を用いて RT-PCR を行った。

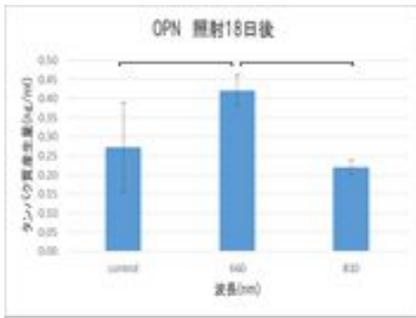
4. 研究成果



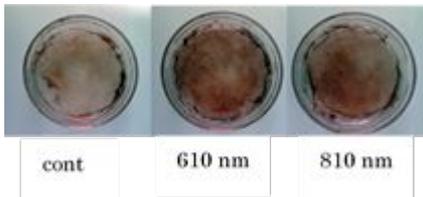
(1) 照射後の ALP 活性



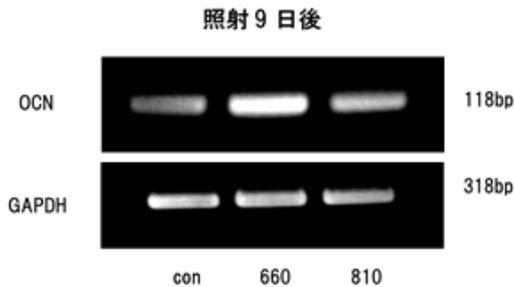
(1) 照射後の Osteocalcin のタンパク質量



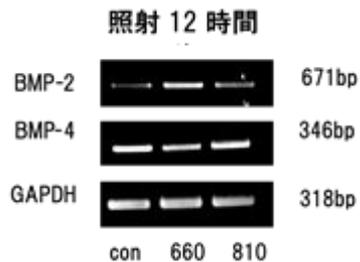
(1) 照射後の osteopontin タンパク質量の測定



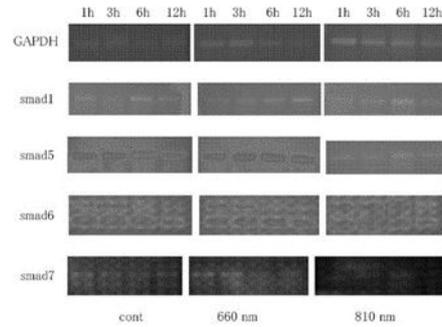
(1) von Kossa 染色による石灰化物の観察



(1) RT-PCR による Osteocalcin の遺伝子発現の観察



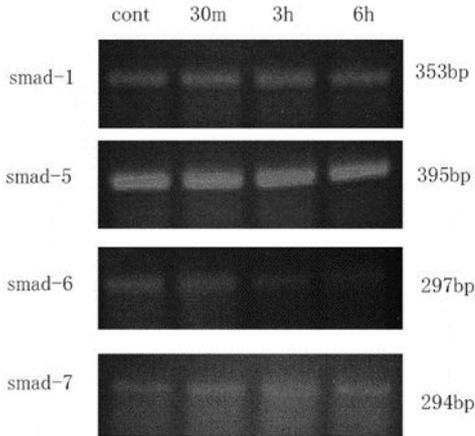
(1) RT-PCR による BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現の観察



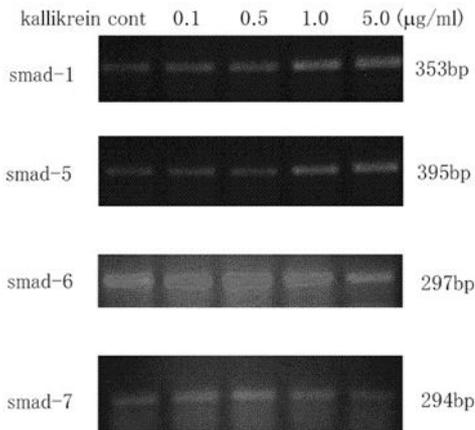
(1) 両波長のレーザー照射による smad-1, 5, 6, 7 の遺伝子発現の観察

ALP 活性と von Kossa 染色より、両波長の半導体レーザーにおいて、硬組織形成の促進が認められた。しかし、mRNA、タンパク質の発現量の結果において、2 波長の間で有意な差が認められた。近年、光生物学分野において細胞内に異なる波長吸収スペクトルをもつ光受容体物質の存在があると言われてしている。Nicolau らは、マウス神経接合部へレーザー照射を行い、655 nm の可視光レーザーでは何の効果も観測されないが、830 nm の近赤外レーザーではシナプス伝達効率の抑制が認められると報告している。このことから hDPC においても同様に異なる波長吸収スペクトルをもつ光受容体物質が存在すること、また hDPC において波長により異なる硬組織形成の機序がとられることが推測された。

非照射の control では、時間経過による変化は認めなかった。660 nm では smad1 は時間経過とともに増加し、smad5 の変化は認めず、smad6 は変化を認めず、smad7 は時間経過とともに減少している。810 nm では smad1 および 5 は 6h でピークを認め、smad6,7 は変化を認めなかった。660 nm および 810 nm とともに弱い傾向であるが、特異型 smad1 または 5 の時間経過とともに上昇を認め、抑制型 smad6,7 の変化は認めなかったことから、660 nm および 810 nm のレーザー照射は硬組織形成を促進することを示唆した。また、660 nm では smad1 の増加を、810 nm では smad5 の増加を強く認めた。660 nm 照射と 810 nm 照射では、異なる経路で smad に関与する可能性を見出した。



(2) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ kallikrein を歯髄培養細胞に作用させ smad-1, 5, 6, 7 の遺伝子発現を観察



(2) kallikrein を歯髄培養細胞にさようさせ、smad-1, 5, 6, 7 の

歯髄培養細胞に 0.5 $\mu\text{g/ml}$ kallikrein を作用させ、smad1 遺伝子発現、smad5 遺伝子発現、smad6 遺伝子発現、smad7 遺伝子発現を観察した。硬組織形成を促進する特異型 Smad1, 5 は時間依存的に増加した。抑制型 smad6 は常に一定の遺伝子発現を認め変化がない。smad7 は、3 時間後にピークを認めるが、顕著な差はない。Kallikrein 濃度依存的 smad1, smad5, smad6, smad7 の遺伝子発現では、smad1, 5, 7 では変化がなく、smad6 において濃度依存的に減少した。

硬組織形成能は smad1, 5 が上昇すると促進、smad6, 7 が上昇すると抑制的に働く。本研究では、kallikrein の直接的な smads の遺伝子発現への影響を観察したが、顕著な影響は認めなかった。プロテアーゼである Kallikrein

が protease-activated receptors (PARs) を介して smads の遺伝子発現を制御すると考えられたが smads には変化が認められなかった。Kallikrein の器質である bradykinin を同時に添加し、産生される kinin による smads の遺伝子発現への影響を観察する必要がある。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

深井 謙滋, 大塚 一聖, 小峯 千明, 松島 潔, 異なる波長の半導体レーザー照射がヒト歯髄培養細胞における硬組織形成能に及ぼす影響、第 26 回日本レーザー歯学会総会・学術大会、2014.12.6、7、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

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

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 潔 (MATSUSHIMA Kiyoshi)

日本大学松戸歯学部・教授

研究者番号：00157306

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：