

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792031

研究課題名(和文)大豆イソフラボンおよび亜麻リグナンを用いた新規歯髄保存療法の開発

研究課題名(英文)Development of new pulp conservative treatment with soy isoflavones and flax lignans

研究代表者

半田 慶介 (Handa, Keisuke)

東北大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40433429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エストロゲン様作用を有するgenisteinをラット歯髄細胞に添加し、石灰化誘導能を検討し、ラット直接覆髄実験を行った。genistein添加によってラット歯髄細胞はALPaseの活性上昇、アリザリンレッド染色陽性、硬組織形成関連遺伝子群の発現を誘導し、直接覆髄実験では良質な修復象牙質形成と軽微な歯髄反応が観察された。これらの結果から、genisteinは、ラット歯髄細胞の石灰化を誘導し、直接覆髄剤として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the genistein with estrogen-like effect is added to the rat dental pulp cells to be examined mineralization ability. and also reparative dentin inducing ability was tested by rat direct pulp capping experiments. By genistein addition to rat dental pulp cells, ALPase activity, alizarin red staining positive and hard tissue formation associated genes expression was increased. And more high quality reparative dentin formation and minor pulpal response was observed by direct pulp capping experiments. These results indicated genistein induces calcification of rat dental pulp cells, was suggested may be useful as a direct pulp capping agent.

研究分野：保存修復学

キーワード：大豆イソフラボン 歯髄細胞 直接覆髄

1. 研究開始当初の背景

歯髄疾患の原因は、化学的・物理的・細菌学的刺激に分類される。う蝕に罹患した歯質は、これらの複合的な原因によって歯髄感染に至り、痛みを生じると考えられる。う蝕除去中に運悪く歯髄が露出した場合は、その露髄部が新鮮で細菌感染の危険性がないと判断された条件下で、臨床的には水酸化カルシウム製剤を用いた直接覆髄法によって歯髄保存療法が試みられる。しかしながら、水酸化カルシウム製剤を使った直接覆髄では、新生被蓋硬組織の形成をコントロールすることは不可能であり、裂隙や欠損を生じトンネル状欠損や未成熟な象牙質であるため長期的にみると感染経路になる可能性が高く、臨床結果を予見できないのが現状である。大豆イソフラボンは、フラボノイドに分類される食品添加物やサプリメントとして摂取される健康食品であり、構造はエストロゲンと類似しているためエストロゲン様作用を有し、骨組織で優位に発現するエストロゲンレセプターとの高親和性から、組織特異性が高く骨粗鬆症の予防や改善に有効であるといわれている。また、大豆イソフラボンは安全性が高く、ビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬で引き起こされる顎骨壊死等の副作用は報告されていない。同様に亜麻リグナンに含まれるセコイソラリシネシロールジグリコシド(SDG)も、マイルドなエストロゲン様作用を有し、閉経後の女性ホルモン補充療法に利用が期待されている。これら研究を踏まえて、本申請では亜麻リグナンを大豆イソフラボンと併用することによって骨に対するエストロゲン様作用を増強する(2003年日本産婦人科学会発表)ことから、歯髄細胞に含まれる間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化に対する影響および直接覆髄材として応用の可能性を調べることを目的としている。

2. 研究の目的

近年亜麻種子に含まれる亜麻リグナンが大豆イソフラボンの骨粗しょう症予防効果を増強するという報告がされてきた。亜麻リグナンもまた大豆イソフラボンと同様にエストロゲン様作用を示すことから、歯髄に含まれる間葉系幹細胞の象牙芽細胞への誘導能を示す可能性が考えられる。そこで本申請では、亜麻リグナンが象牙芽細胞分化に寄与するかどうか、さらに大豆イソフラボンと組み合わせることで直接覆髄材へ応用可能かどうかを検討することである。

3. 研究の方法

(1)ラット歯髄細胞の採取

北海道医療大学動物実験センターの承認を得て、動物実験基本方針に従って飼育された12週齢雄性 Wistar 系ラット Handa ら (Handa et al., 2002)の方法に従い、両側下顎中切歯歯髄を摘出し、その後、collagenase A を用いて段階的酵素消化法で細胞を採取し

ラット歯髄細胞 (Rat Dental Pulp cells ; 以下 RDP)を得た。

(2)RDP に各種濃度の genistein を添加し、以下の石灰化能を測定した。

ALPase 活性の測定

各種濃度の genistein を添加し培養後機械的に細胞を剥離回収し、遠心分離によって得られた上清を LabAssay ALP kit (和光純薬)を用いて、吸光度を測定した。

アリザリンレッド染色

genistein 添加 30 日後に RDP を 2% Alizarin red S (和光純薬)を用いて 20 分間染色した。

遺伝子発現の解析

細胞から Isogen を用い total RNA を抽出し、cDNA を合成した。その後骨芽細胞および象牙芽細胞の分化成熟過程で発現する Runt-related transcription factor 2 (以下 Runx2), Osteocalcin (以下 OCN), Dentin sialophosphoprotein (以下 DSPP), Dentin matrix protein 1 (以下 DMP-1), を Real time PCR 法により定量した。

OCN の定量

RDP から培養液中に放出された総 OCN タンパク量を ELISA 法によって測定した。

(3)ラット直接覆髄実験

8 週齢雄性 Wistar 系ラットの上顎第一大臼歯近心咬頭より切削し、人工露髄面を形成し、genistein を覆髄剤として用い直接覆髄を行った。

(4)抗炎症効果のメカニズム解析

10ug/ml のリポタイコ酸(LTA)を含む培地で 12 時間培養後、ゲニステインを 1 または 10μM (以下 G1、G10) 添加し、サンプルを回収した。その後プロスタグランジン Prostaglandin E2(PGE2)活性を ELISA 法で測定した。

total RNA を抽出し、炎症に関連する遺伝子群(IL-1β, IL-6, COX-2, TNF-α, CXCL10) の mRNA 発現量を Real time PCR 法により定量した。

4. 研究成果

石灰化能の判定

genistein 添加によって RDP の石灰化が誘導され、genistein 添加群の ALPase 活性は、培養 10 日目では Control とほぼ同等の活性であったが、培養 17 日目以降に活性の上昇が観察された(図 1)。

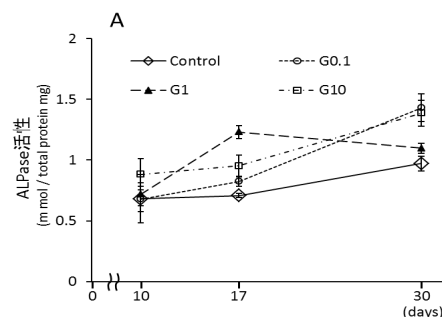
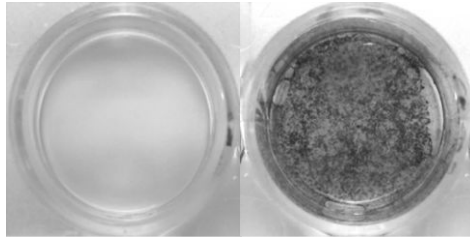


図 1

さらにアリザリンレッド染色では、培養 30 日目に石灰化結節の形成が認められた(図 2)。



w/o genistein genistein

図 2

また,Real time PCR 法による mRNA 発現量の定量では, genistein 添加群で Runx2, DSPP, DMP-1, OCN の mRNA 発現量が Control と比較して約 2 倍以上増加していた(図 3)。

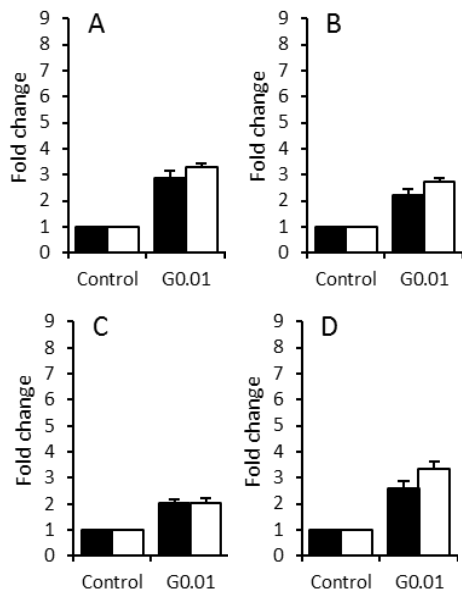


図 3

genistein 添加培地で RDP を 10 日および 17 日間培養後, Runx2 (A), DSPP (B), DMP-1 (C), OCN (D)の mRNA 発現量を Real time PCR 法で定量した。 は 10 日目, は 17 日目を示す。

20 日間 genistein を含む培地で RDP を培養後に骨形成マーカーである OCN タンパク量の定量を行ったところ, Control に比較して genistein 添加群で OCN タンパク量は顕著に増加していた(図 4)。

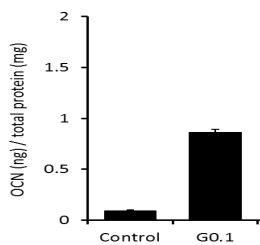


図 4

ラット直接覆髄実験

コントロールである水酸化カルシウム製剤と比較して良好な修復象牙質の形成が genistein 添加群で観察された(図 5)。

水酸化カルシウム genistein

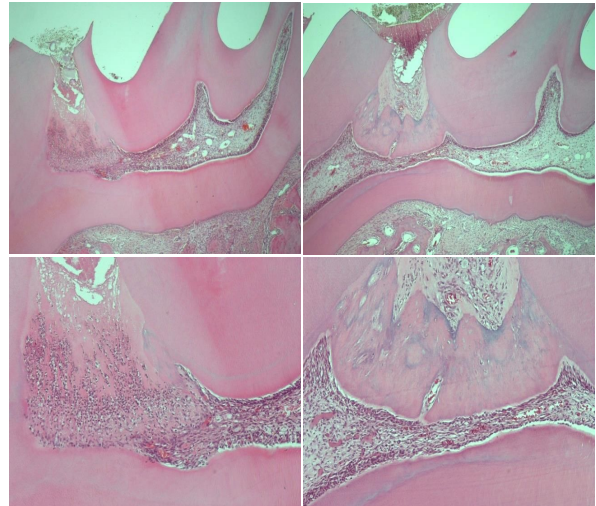
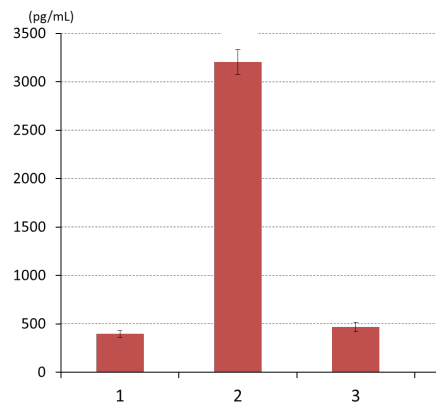


図 5

抗炎症効果のメカニズム解析

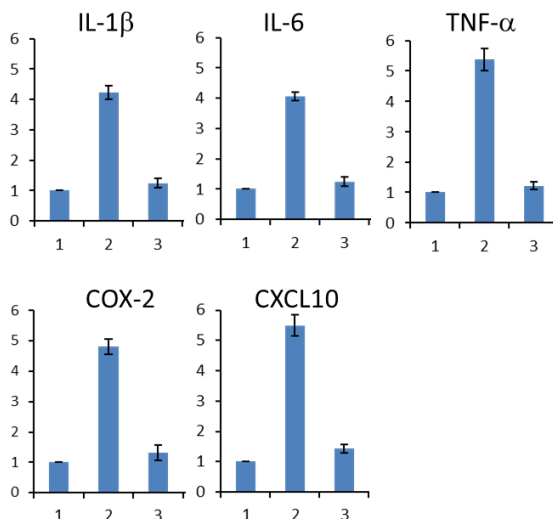
LTA 刺激によって RDP の PGE2 活性が約 6 倍上昇したが、ゲニステイン添加によってその活性はコントロールレベルまで減少した(図 6)。



1. Control; LTA w/o genistein
2. LTA w/o genistein
3. LTA 1uM genistein

図 6

IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインや組織障害性サイトカインの TNF- α 、アラキドン酸カスケードの COX-2 および炎症性ケモカイン CXCL10 の遺伝子発現が上昇するが、ゲニステイン添加によってそれらすべての遺伝子発現が抑制された(図 7)。



1. Control
 2. LTA 処理 w/o genistein
 3. LTA 処理 genistein
 図 7

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 5 件)

Polan MA A, Handa K, Saito T, Dentin Phosphophoryn Promotes Odontoblast Differentiation in vitro and Induction of Mineralized Tissue-like Matrix in vivo, *J. of Oral Tissue Engineering*, 11(3)P201-212, 2014. 査読あり www.jstage.jst.go.jp/article/jarde/11/3/11_201/_pdf

Nakagaki S, Iijima M, Handa K, Koike T, Yasuda Y, Saito T, Mizoguchi I. Micro-CT and histologic analyses of bone surrounding immediately loaded miniscrew implants: comparing compression and tension loading. *Dent Mater J.* 2014;33(2):196-202. 査読あり <http://doi.org/10.4012/dmj.2013-223>

Nakagaki S, Iijima M, Handa K, Koike T, Yasuda Y, Saito T and Mizoguchi I: Micro-CT and histologic analyses of bone surrounding immediately loaded miniscrew implants: Comparing compression and tension loading. *Dent Mater J.* 2014;33(2):196-202. 査読あり <http://doi.org/10.4012/dmj.2013-223>

Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Keijiro Hayashi, Takashi Saito Application of High-frequency Radio Waves to Direct Pulp Capping. *Journal of Endodontics* 2013 ;39(9) :1147-1150. 査読あり doi: 10.1016/j.joen.2013.06.007.

Keijiro Hayashi, Keisuke Handa,

Toshiyuki Koike, Takashi Saito, The possibility of genistein as a new direct pulp capping agent, *Dental materials journal* 2013; 32(6): 976-985. 査読あり <http://doi.org/10.4012/dmj.2013-091>

〔学会発表〕(計 6 件)

半田慶介、林敬次郎、小池俊之、齋藤正寛、齋藤隆史ゲニステインによる抗炎症抑制効果のメカニズムについて、第 141 回日本歯科保存学会、山形テルサ(山形)、2014 年 10 月 29 日(木)~30 日(金)

Hayashi K, Handa K, Koike T, Saito T Effect of Genistein as a new pulp capping agent, The 15th Joint Scientific Meeting of JSCD-KACD, The K Hotel, Gyeongju, Korea, 23-24 November 2013

Handa K, Hayashi K, Koike T, Saito T Genistein inducing the calcification via p38, The 15th Joint Scientific Meeting of JSCD-KACD, The K Hotel, Gyeongju, Korea, 23-24 November 2013

Hayashi K, Handa K, Koike T, Saito T Effect of Genistein on Reparative Dentin Formation, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research -Asia Pacific Region, Plaza Athenee, Bangkok, Thailand, 21-23 August 2013

林敬次郎、半田慶介、小池俊之、Mohammad Ali Akbor Polan、Jia Tang、齋藤隆史、genistein の石灰化誘導メカニズムの解析、第 138 回日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会、福岡国際会議場(福岡)2013 年 6 月 27 日(木)~28 日(金)

林敬次郎、半田慶介、小池俊之、齋藤隆史、ラット歯髄細胞の増殖・分化に及ぼすゲニステインの影響、第 9 回世界歯内療法会議、東京国際フォーラム(東京)、2013 年 5 月 23 日(木)~26 日(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〕
 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田 慶介(HANDA, Keisuke)
 東北大学大学院歯学研究科・講師
 研究者番号: 40433429