

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09870

研究課題名（和文）硬組織誘導能と炎症制御能を具備する新規直接覆髄材の開発とその臨床応用への展望

研究課題名（英文）Development of a Novel Direct Pulp Capping Material with Hard Tissue Induction and Inflammation Control Capabilities and Its Prospects for Clinical Application

研究代表者

川島 伸之（KAWASHIMA, NOBUYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60272605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ケイ酸カルシウム系シーラーであるBio-C sealer、Well-Root ST、EndoSequence BC sealerの硬組織誘導能を検討し、これらがカルシウムイオン依存性に骨芽細胞株Kusa-A1細胞の石灰化結節形成を誘導し、硬組織マーカーの一つであるオステオポンチン発現を促進することを示した。また、リポ多糖で刺激された株化マクロファージRAW264.7細胞からの炎症性メディエーター産生を抑制した。試作 surface-reaction-type pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler 含有シーラーにおいても抗炎症能が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体傷害性を示さないだけでなく、硬組織誘導能および炎症制御能といった生物活性を有する歯内療法で使用する様々な材料が近年注目を集めている。今回現在新しく歯内療法に導入されたBio-C sealer、Well-Root ST、EndoSequence BC sealerの硬組織誘導能および炎症抑制能について検討し、どれもが硬組織誘導能および炎症抑制能を示したことから臨床においても良好な成績を示すことが期待される。また試作 surface-reaction-type pre-reacted glass-ionomer filler 含有シーラーにおいても抗炎症能が示され、臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the hard tissue induction ability of calcium silicate sealers, Bio-C sealer, Well-Root ST, and EndoSequence BC sealer. We revealed that they induced mineralized nodule formation of osteoblast-like cell line, Kusa-A1 cells in a calcium ion-dependent manner. They also promoted mRNA expression of osteopontin, one of the osteoblast markers. The same effect was also observed with a surface-reaction-type pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler-containing sealer.

研究分野：歯内療法

キーワード：歯髄 歯内療法材料 硬組織誘導 Bio-C sealer Well-Root ST EndoSequence BC sealer S-PRG 抗炎症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

直接覆髄材として水酸化カルシウムが従来 golden standard として使用されてきたが、近年 mineral trioxide aggregate (MTA) が保険診療に導入され、広く使用されている。MTA の作用メカニズムは基本的には水酸化カルシウムと同様カルシウムイオンの放出であり、放出されたカルシウムイオンにより硬組織形成が誘導されるといわれている。また、MTA より放出されるカルシウムイオンによりマクロファージから放出される炎症性メディエーター産生量が減少することも報告されている。一方、MTA は歯の変色を引き起こすことが知られており、審美性が要求される前歯においての使用は注意を要する。このような現状を踏まえ、硬組織誘導能と炎症制御能を具備する新規歯内療法薬剤の開発を目指す。

2. 研究の目的

骨芽細胞分化を誘導するとともにマクロファージからの炎症性メディエーター産生を抑制するような新規歯内療法薬剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

マウス株化マクロファージである RAW264.7 細胞は非働化ウシ胎児血清を 10% 添加した D-MEM 培地にて培養した。骨芽細胞としての特性を有するマウス骨髄ストローマ細胞由来の Kusa-A1 細胞は、ウシ胎児血清を 10% 添加した MEM にて培養した。Lipopolysaccharide (LPS) は 100ng/ml で使用した。

(2) サンプルの調整

エポキシレジン系シーラーである AH Plus Jet (AHP)、ケイ酸カルシウム系シーラーである Bio-C sealer (BioC)、Well-Root ST (WST)、EndoSequence BC sealer (BC)、試作 surface-reaction-type pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) filler 含有シーラー (SPRG) を添付書類に従い練和し、ポリプロピレンディスク (3 mm × 7.5 mm) に填入後、湿度 100% 37 °C の恒温槽に 48 時間放置し、完全に硬化させた。硬化したこれらのサンプルは 3ml の蒸留水に浸漬し、24 時間振とうした後、浸漬した液を 0.45 μm のディスクフィルターでろ過しサンプル液とした。AHP は、ネガティブコントロールとして使用した。

(3) 細胞傷害性

細胞傷害性の有無は WST-8 Assay (Cell Counting Kit-8, 同仁化学研究所) にて検討した。

(4) カルシウム濃度の測定

Ca²⁺ 濃度は誘導結合プラズマ発光分光法にて測定した (IC-7000、島津製作所)。

(5) 石灰化結節形成

β-glycerophosphate (5 mM), L-ascorbic acid (0.2 mM) および dexamethasone (1 nM) を添加した 10% FBS 含有 MEM 培地を石灰化誘導培地として使用した。

(6) RT-PCR

RNA 抽出には QuickGene RNA 抽出キット (Fujifilm) を使用し、相補的 DNA 作成には PrimeScript 逆転写酵素キット (TaKaRa) を使用し、RT-qPCR には GoTaq qPCR Master Mix (Promega) および特異的プライマーを用い CFX-96 (Bio-Rad) にて解析した。内部標準としては β actin を用い、相対遺伝子発現値は CT 法を使用して求めた。

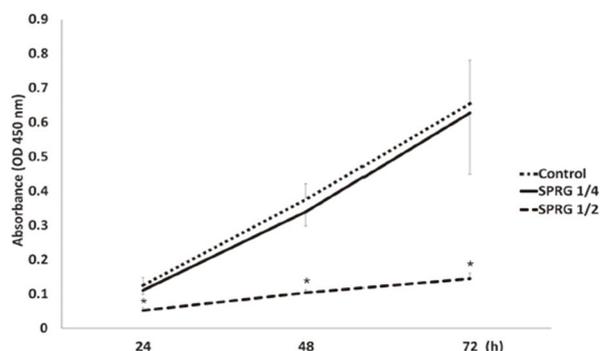
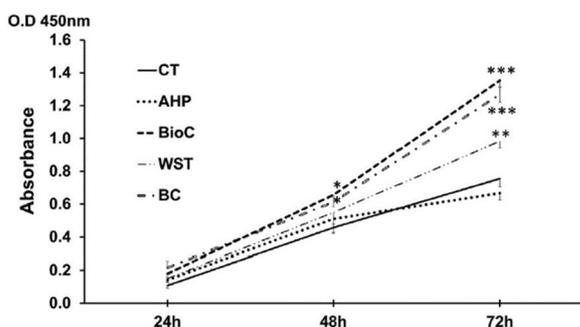
(7) 統計

グループ間の比較は、One-way ANOVA および Tukey-Kramer test にて検討し、有意水準は $p < 0.05$ に設定した。

4 . 研究成果

(1) 細胞傷害性

Kusa-A1 を用いて、AHP、BioC、WST、BC に対する細胞傷害性を検討した。その結果 AHP、BioC、WST、BC 抽出液の 4 倍溶液は、どれも細胞傷害性を示さなかった。逆に、BioC、WST、BC は細胞増殖を促進した。また S-PRG の 2 倍溶液は、RAW-264.7 において細胞傷害性をしめしたが、4 倍希釈溶液には細胞傷害性は認められなかった。(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, *** : $p < 0.005$)



(2) カルシウム濃度

AH からのカルシウム放出はほとんど認められなかったが、BioC、WST、BC からは高い Ca^{2+} リリースが確認された。

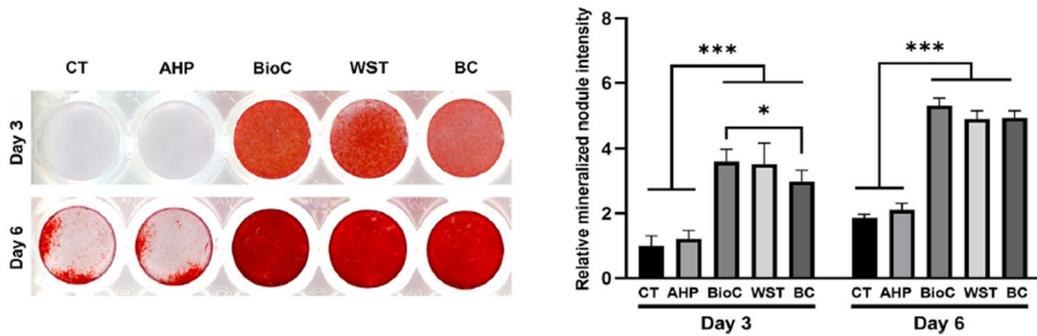
Table 3 Ca^{2+} concentration in the sealer extracts.

Samples	Ca^{2+} (mg/L)
Distilled water	0
AHP	13 ± 12
BioC	917 ± 46
WST	293 ± 45
BC	990 ± 58

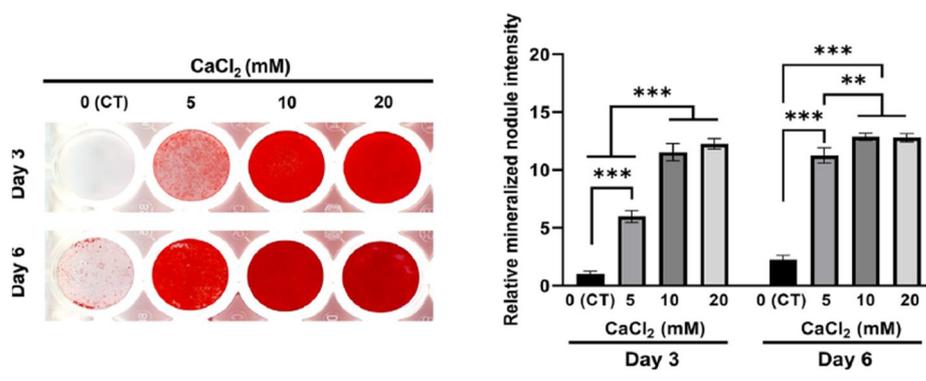
Data are shown as the mean ± SD (n = 3). AHP: AH Plus Jet, BC: EndoSequence BC sealer, BioC: Bio-C sealer, WST: Well-Root ST.

(3) 石灰化結節形成

AHP はほとんど石灰化結節誘導能を示さなかったが、BioC、WST、BC は有意に Kusa-A1 の石灰化結節を誘導した (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.005$)。



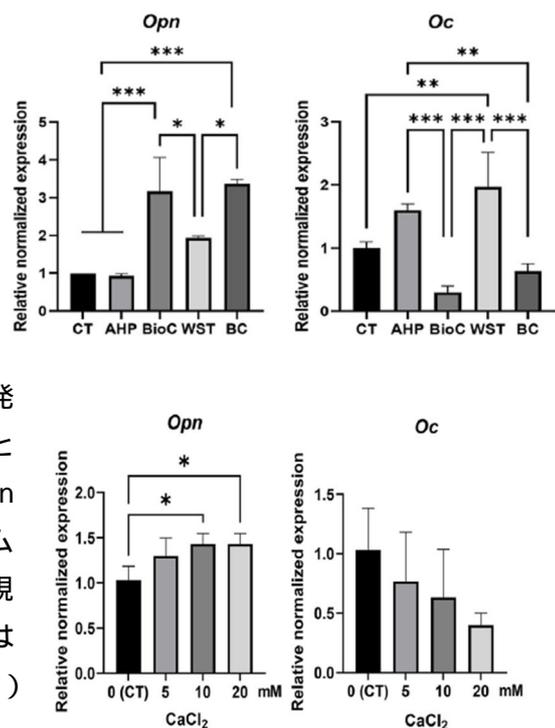
BioC、WST、BC から放出されたカルシウムイオンのモル濃度は 7.3-22mM に相当する。塩化カルシウム溶液を作成し、5, 10, 20mM/L の石灰化結節誘導能を検討したところ、有意に高い石灰化結節誘導能が確認された(**:p<0.01, ***:p<0.005)。以上の結果は、BioC、WST、BC による石灰化結節誘導が、それらから放出されるカルシウムイオンに依存している可能性が高いことを示している。



(4) RT-PCR

AHP は代表的な骨芽細胞マーカーであるオステオポンティン(*Opn*)およびオステオカルシン(*Oc*)発現を誘導しなかったが、BioC、WST、BC は *Opn* 発現を有意に誘導した。また WST は *Oc* 発現を有意に誘導した。(*: p<0.05, **: p<0.01, ***:p<0.005)

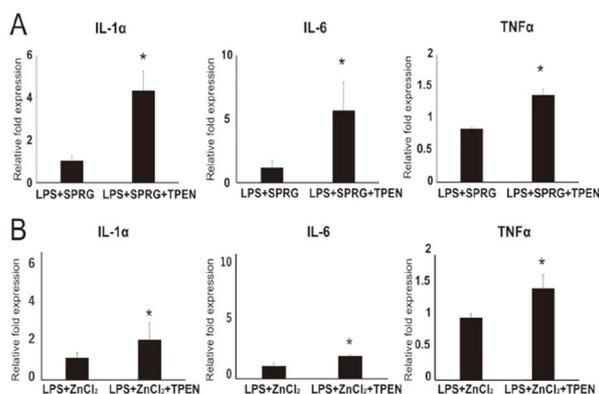
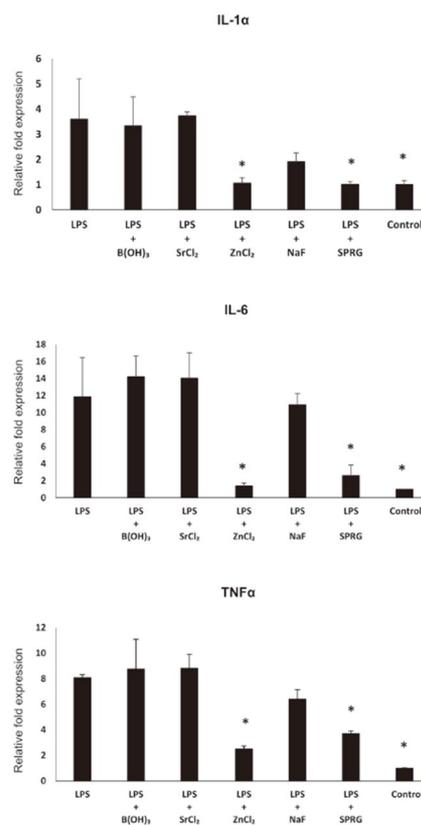
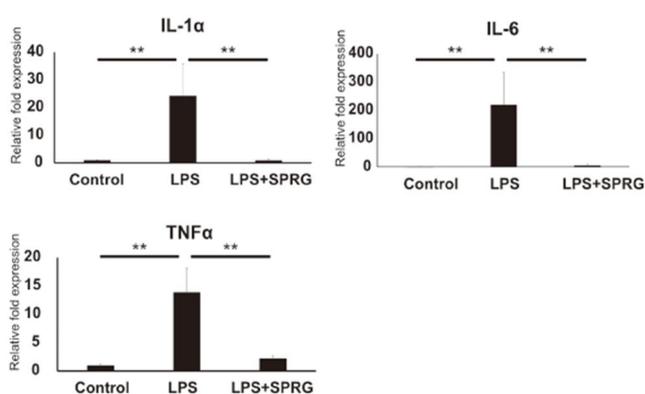
塩化カルシウム 10 および 20mM は *Opn* 発現を有意に誘導した。しかし、*Oc* 発現はほとんど影響しなかった。BioC、WST、BC の *Opn* 発現誘導は、それらから放出されるカルシウムイオンによるものと推察される。一方 *Oc* 発現におけるカルシウムイオンの影響については今後さらに検討が必要と思われる。(*: p<0.05)



LPS 刺激により RAW264.7 から炎症性メディエーター IL1a、IL6、TNFa の mRNA 発現が誘導されたが、それらは SPRG により抑制された。

SPRG から放出される各種イオンが LPS により誘導された IL1a、IL6、TNFa 産生を抑制したと推察される。次にホウ酸 (B)、ストロンチウム (Sr)、亜鉛 (Zn) およびフッ素 (F) の溶液を

作成し炎症性メディエーター産生への影響を検討したところ、亜鉛 (Zn) により、IL1a、IL6、TNFa の mRNA 発現が有意に抑制された。さらに Zn²⁺ のキレート剤 PTEN を添加したところ、SPRG および Zn²⁺ にて誘導された抑制効果が解除された。以上の結果より、SPRG による炎症性メディエーター産生抑制効果は、SPRG に含まれる亜鉛イオンによるものと推察された。 (*: p<0.05)



BioC、WST、BC の結果は、Journal of Dental Science 誌に (1)、SPRG の結果は Dental Materials Journal 誌 (2) に発表した。

< 引用文献 >

- 1 . J Dent Sci. 2023 Oct;18(4):1731-1739. doi: 10.1016/j.jds.2022.12.019.
- 2 . Dent Mater J. 2022 Feb 1;41(1):150-158. doi: 10.4012/dmj.2021-139.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Alchawoosh Aseel, Hashimoto Kentaro, Kawashima Nobuyuki, Noda Sonoko, Nozaki Kosuke, Okiji Takashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Hydraulic calcium silicate-based root canal sealers mitigate proinflammatory cytokine synthesis and promote osteogenesis in?vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1731 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2022.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Han Peifeng, Sunada-Nara Keisuke, Kawashima Nobuyuki, Fujii Mayuko, Wang Shihan, Kieu Thoi Quoc, Yu Ziniu, Okiji Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 MicroRNA-146b-5p Suppresses Pro-Inflammatory Mediator Synthesis via Targeting TRAF6, IRAK1, and RELA in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Dental Pulp Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7433 ~ 7433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24087433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zaw Zar Chi Thein, Kawashima Nobuyuki, Kaneko Tomoatsu, Okiji Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Angiogenesis during coronal pulp regeneration using rat dental pulp cells: Neovascularization in rat molars in?vivo and proangiogenic dental pulp cell-endothelial cell interactions in?vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2022.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Yamato, Kawashima Nobuyuki, Noda Sonoko, Murano Hiroki, Han Peifeng, Hashimoto Kentaro, Kaneko Tomoatsu, Okiji Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 VEGFA promotes odonto/osteoblastic differentiation in dental pulp stem cells via ERK/p38 signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2022.08.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Orikasa Shion, Kawashima Nobuyuki, Tazawa Kento, Hashimoto Kentaro, Sunada-Nara Keisuke, Noda Sonoko, Fujii Mayuko, Akiyama Tetsu, Okiji Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor 1 induces osteo/odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells via Wnt/ -catenin transcriptional cofactor BCL9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04453-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kieu Thoai Quoc, Tazawa Kento, Kawashima Nobuyuki, Noda Sonoko, Fujii Mayuko, Nara Keisuke, Hashimoto Kentaro, Han Peifeng, Okiji Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Kinetics of LYVE-1-positive M2-like macrophages in developing and repairing dental pulp in vivo and their pro-angiogenic activity in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08987-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kunlanun Dumrongvute, Sherif Adel, Takahiro Wada, Nobuyuki Kawashima, Chinalai Piyachon, Hiroshi Watanabe, Tohru Kurabayashi, Takashi Okiji and Motohiro Uo	4. 巻 15
2. 論文標題 Distrontium Cerate as a Radiopaque Component of Hydraulic Endodontic Cement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials (Basel)	6. 最初と最後の頁 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15010284.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yadanar Su PHYO*, Kentaro HASHIMOTO, Nobuyuki KAWASHIMA, Masashi KURAMOTO and Takashi OKIJI	4. 巻 40
2. 論文標題 Evaluation of the cytocompatibility of methacrylate resin-based root canal sealers with osteoblast-like cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 942-948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2020-335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kieu Thoai Quoc, Tazawa Kento, Kawashima Nobuyuki, Noda Sonoko, Fujii Mayuko, Nara Keisuke, Hashimoto Kentaro, Han Peifeng, Okiji Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Kinetics of LYVE-1-positive M2-like macrophages in developing and repairing dental pulp in vivo and their pro-angiogenic activity in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08987-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Adel Sherif, Hashimoto Kentaro, Kawashima Nobuyuki, Wada Takahiro, Uo Motohiro, Okiji Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Biocompatibility and pro-mineralization effect of tristrontium aluminate cement for endodontic use	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jds.2021.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Alchawoosh A, Hashimoto K, Kawashima N, Okiji T.
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of hydraulic calcium silicate based endodontic sealers on lipopolysaccharide stimulated macrophages.
3. 学会等名 第43回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Alchawoosh A, Hashimoto K, Kawashima N, Nozaki K, Okiji T.
2. 発表標題 Extracts from hydraulic calcium silicate-based endodontic materials promoted mineralization in murine osteoblastic cells.
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2022年度秋季学術大会 (第157回)
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Thoai KQ, Tazawa K, Kawashima N, Noda S, Fujii M, Sunada-Nara K, Hashimoto K, Han P & Okiji T.
2 . 発表標題 LYVE-1+ M2-macrophages: identification in dental-pulp and their pro-angiogenic activity in-vitro.
3 . 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Wang S, Sunada-nara K, Kawashima N, Han P, Thoai KW, Yu Z, Okiji T.
2 . 発表標題 MicroRNA-27a downregulates proinflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human dental pulp cells.
3 . 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Han P, Sunada-Nara K, Kawashima N, Wang S, Thoai KQ, Yu Z, Okiji T .
2 . 発表標題 MicroRNA-146b suppresses proinflammatory mediators synthesis in lipopolysaccharide-stimulated dental pulp cells.
3 . 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Yu Z, Nara K, Kawashima N, Thoai K, Han P, Wang S, Okiji T.
2 . 発表標題 MicroRNA-27a upregulates osteoblastic markers-expression in human dental pulp cells.
3 . 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawashima.N. and Okiji T.
2. 発表標題 Effects of hypoxic condition on mineralization and inflammation in the pulp tissue
3. 学会等名 Asian Pacific Endodontic Confederation (APEC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Okada Y, Kawashima N, Okiji T
2. 発表標題 Endodontic retreatment of a maxillary first molar with multiple iatrogenic complications
3. 学会等名 Asian Pacific Endodontic Confederation (APEC) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田大樹, 川島伸之, 興地隆史
2. 発表標題 セルロースナノファイバー添加によるMTAセメントの水中硬化性の向上
3. 学会等名 第44回歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	興地 隆史	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授	
	(Okiji Takashi)		
	(80204098)	(12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------