

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17015

研究課題名（和文）高出力赤色LEDを用いた歯周組織再生治療戦略の構築

研究課題名（英文）Development of periodontal tissue regeneration treatment strategy using high-power red LED

研究代表者

山内 伸浩（Yamauchi, Nobuhiro）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60823507

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）：歯周治療における抗菌的光線力学療法の光源である赤色LEDを用いて、歯周組織再生療法への応用を目的に研究を行っている。この領域はPhotobiomodulationと呼ばれ発展してきた。本研究ではメカニズムの一つとしてミトコンドリア呼吸鎖へ与える影響を検討した。ヒト抜去歯から分離したヒト歯根膜幹細胞へのLED照射によりミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性は有意に促進した。そしてその阻害剤であるシアニ化カリウムによりLED照射による増殖能の増加は有意に抑制された。以上の結果より、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を活性化させることにより、LED照射はヒト歯根膜幹細胞の増殖能を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では高出力赤色LEDによる照射がヒト歯根膜幹細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体を活性化させた。それにより増殖能の促進や抗炎症作用を引き起こす可能性が示唆された。本研究成果より高出力赤色LED照射の細胞活性の作用機序の一つが解明された。

Photobiomodulationは生体組織を変性せず組織細胞を活性化する光刺激作用を利用する。光源としてレーザーを低エネルギーで使用することにより発展してきたが、レーザーより安価で安全に使用でき、大掛かりな装置も必要ないLEDを新たな光源として用いることにより幅広く歯周病治療に応用できるようになると考える。

研究成果の概要（英文）：Red LEDs, the light source for an antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment, are being investigated for application to periodontal tissue regeneration therapy. This field has been called photobiomodulation. In this study, we investigated the effect on mitochondrial respiratory chain as one of the mechanisms. LED irradiation of human periodontal ligament stem cells isolated from extracted teeth significantly enhanced the activity of mitochondrial respiratory chain complex IV. Potassium cyanide, an inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex IV, significantly suppressed the increase in proliferation induced by LED irradiation.

These results suggest that LED irradiation promotes the proliferation of human periodontal ligament stem cells by activating mitochondrial respiratory chain complex IV.

研究分野：歯周病学

キーワード：Photobiomodulation Red LED

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光は生体に様々な影響を与え、医療の場でも応用されている。現在歯周病の治療で、光と色素による光化学反応を利用した抗菌的光線力学療法が応用されており、その光源として過去に様々な波長での検討が行われている。共同研究者は、過去に波長 650nm の高出力赤色 LED を用いて抗菌作用を実証した(Umeda M et al、*J Invest Clin Dent* 2011;2:268-274)。

この光源の幅広い可能性を考え、申請者は抜去歯根面より培養したヒト歯根膜幹細胞に高出力赤色 LED 照射を行うことにより増殖能及び硬組織分化能が促進され、その一端は ERK1/2 経路を活性化することで促進されることを報告した(Yamauchi N et al、*J Periodontol* 2018;89:351-360)。

しかし、未だ高出力赤色 LED 照射がヒト歯根膜幹細胞に及ぼすメカニズムについては明らかにされていない。そのメカニズムの一つとして赤色光と関係の深いミトコンドリアの呼吸鎖複合体に及ぼす影響について検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

細胞を刺激活性化させる光源には現在まで低出力のレーザーが多く用いられており、創傷治癒促進や疼痛緩和、炎症軽減などの効果が報告されている。本研究は、光線力学療法の1つとして用いられてきた光源である LED を用いて宿主細胞を活性化することで歯周組織再生治療へ応用することを目的としている。レーザーと比較して安価で安全である LED は大掛かりな装置も必要なく臨床応用に適している。

本研究では、高出力の赤色 LED を光源として用いることにより、細胞内のミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性について検討し、ヒト歯根膜幹細胞に及ぼす影響のメカニズムの一端を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ミトコンドリアの働きやそのメカニズムの検討では、細胞内部に存在するミトコンドリアを対象とする方法と細胞から単離して細胞外で測定する方法とがある。本研究では、LED 照射による作用がミトコンドリアの呼吸鎖に及ぼす影響を検討することを目的としている為、ミトコンドリア単離後に照射を行い検討した。まずヒト歯根膜幹細胞の分離を行う為、ヒト抜去歯よりメスにて歯根膜組織を採取し、酵素処理を行い、初代培養後 3~5 代目を実験に使用した。そしてミトコンドリアの単離を遠心機での分画遠心法により行なった。その後、単離ミトコンドリアに対し、LED 照射を行い、呼吸鎖複合体 活性の測定を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト歯根膜幹細胞の分離および同定

幹細胞マーカーに対し蛍光免疫染色を行なった。染色された細胞の画像は、オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Corp) を用いて撮影した。CD35 と CD45 に対しては陰性であり、CD73、CD90、CD105 および STRO-1 に対しては陽性であった (図 1)。ヒト抜去歯から分離培養した細胞が間葉系幹細胞であることを同定した。

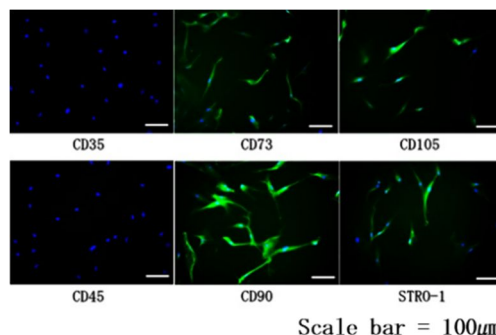


図 1 蛍光免疫染色

#### (2) 増殖能への検討

高出力赤色 LED 照射のエネルギー量は照射時間を変えることにより調節した。

細胞を播種して 24 時間後に照射を行い、ヒト歯根膜幹細胞の増殖能について検討した。エネルギー量を調整することで、ヒト歯根膜幹細胞の増殖能を促進させた (図 2)。

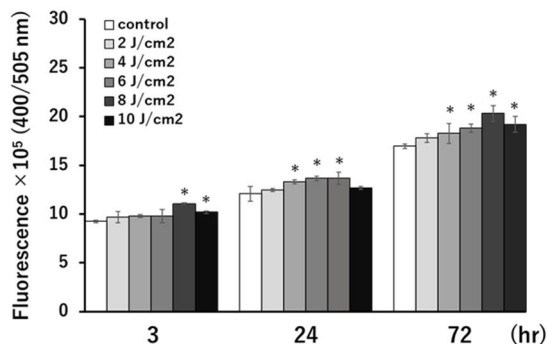


図 2 増殖能

(3) ATP レベルおよび乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性の測定

LED 照射して 24 時間後の ATP レベルと細胞毒性として LDH 活性の測定を行なった。LED 照射により ATP レベルは有意に増加した(図 3)。LDH 活性は 10J/cm<sup>2</sup> 以上のエネルギー量で有意に増加した(図 4)。

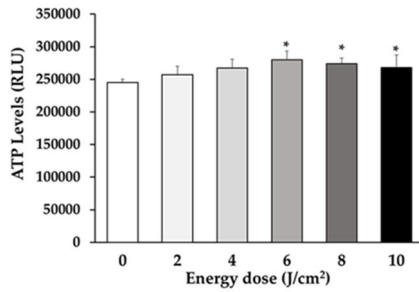


図 3 ATPレベル

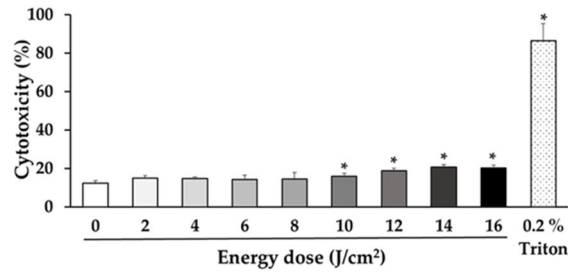


図 4 細胞毒性

(4) ミトコンドリア呼吸鎖複合体 の活性測定  
単離ミトコンドリアに対して LED 照射を行い、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 であるチトクロム C オキシダーゼの活性を測定した。

LED 照射によりヒト歯根膜幹細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体 の活性が有意に増大した(図 5)。

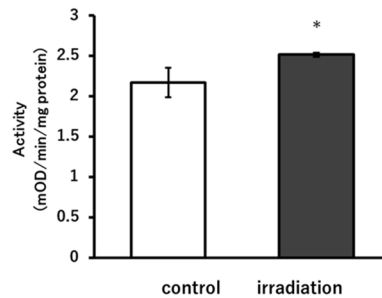


図 5 ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの活性

(5) 呼吸鎖複合体 の活性阻害

真核生物のミトコンドリア内の呼吸鎖複合体 の阻害剤としてシアン化カリウム(KCN)(和光純薬工業社製)を使用し、ATP 合成を阻害した。

KCN 濃度が 100 μM 以上で、LED 照射により促進されたヒト歯根膜幹細胞の ATP 合成を有意に阻害した(図 6)。

また KCN により、LED 照射で誘導されたヒト歯根膜幹細胞の増殖は有意に阻害された(図 7)。

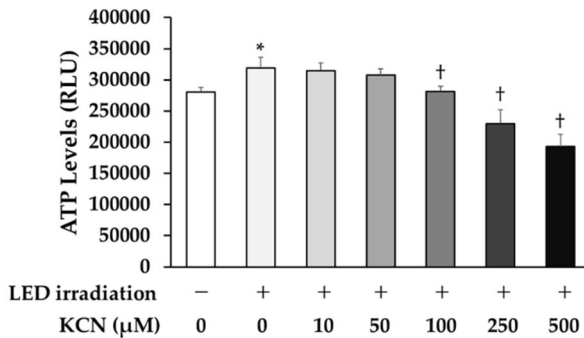


図 6 呼吸鎖複合体IVの阻害剤によるATPレベルへの影響

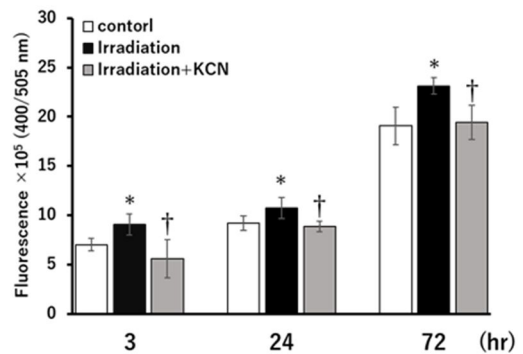


図 7 呼吸鎖複合体IVの阻害剤による増殖能への影響

さらに tumor necrosis factor- により惹起されたヒト歯根膜幹細胞の Interleukin (IL)-6 および IL-8 産生に対する LED 照射の抑制効果は、KCN により有意に阻害された(図 8)。

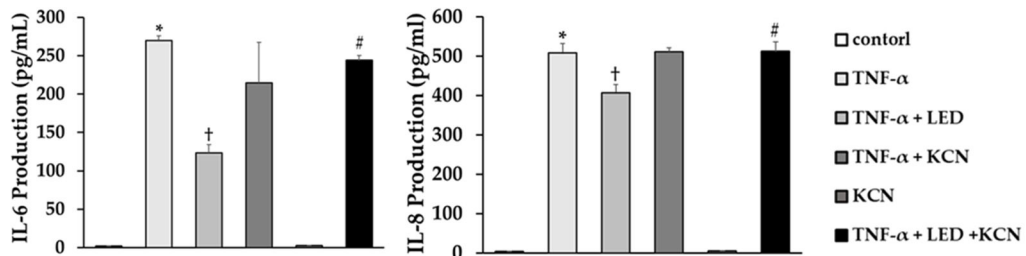


図 8 呼吸鎖複合体IVの阻害剤による炎症性サイトカイン産生量への影響

以上の結果より、高出力赤色 LED 照射はミトコンドリア呼吸鎖複合体 を活性させることによりヒト歯根膜幹細胞の増殖能および抗炎症作用を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamauchi Nobuhiro, Minagawa Emika, Imai Kazutaka, Kobuchi Kenjiro, Li Runbo, Taguchi Yoichiro, Umeda Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 High-Intensity Red Light-Emitting Diode Irradiation Suppresses the Inflammatory Response of Human Periodontal Ligament Stem Cells by Promoting Intracellular ATP Synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 736 ~ 736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12050736	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内 伸浩, 田口 洋一郎, 皆川 咲佳, 万代 千晶, 神田 智子, 吉村 公博, 秋本 秀樹, 梅田 誠
2. 発表標題 高出力赤色LED照射はヒト歯根膜幹細胞の炎症反応 を抑制する
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 皆川 咲佳, 山内 伸浩, 田口 洋一郎, 文元 智優, 中村 百合香, 神田 智子, 榎 にい菜, 柏谷 幸翔, 山脇 勲, 梅田 誠
2. 発表標題 高出力赤色LED照射はヒト歯根膜幹細胞のミトコンドリア呼吸鎖を活性する
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------