

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21073

研究課題名(和文) Oxytocinを応用した新たな歯髄再生療法を探る

研究課題名(英文) Establishment of new method of regeneration therapy using Oxytocin

研究代表者

加藤 邑佳 (KATO, Yuka)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：10906697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞にはOxytocin(OT)の受容体が発現しており、OTがこの受容体を介し、Wntシグナルを通して象牙質形成を亢進させることをこれまでの研究で明らかにしてきた。一方、歯科用レーザー照射では歯髄培養細胞でのOT受容体の発現亢進がみられたことから、OTとレーザーを利用した新たな歯髄再生療法の開発を試みた。培養歯髄細胞に低出力の半導体レーザーを照射するとOT受容体の発現が亢進し、石灰化象牙質形成が亢進することを発見した。さらにOT受容体の発現に及ぼす照射条件を調べるために歯髄組織以外にも骨組織を利用して波長の異なる各種レーザーを用いて骨形成に及ぼす作用を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会における歯髄保護療法は健康寿命に対して重要な役割を果たす。すなわち自分の歯で咬合機能を維持するための保存療法の開発は我が国においても急務の課題と言える。本研究における幸せホルモンであるOTと臨床において多く使用されているレーザーに着目したことは、学術的にもユニークであり、本課題で得られた研究成果は、歯髄保存療法の開発に対して、OTとレーザーを応用するという新たなアイデアを投入することができ、今後の歯髄保護療法の開発に大いに貢献するものと考え、社会的な意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Previous our studies have shown Odontoblasts express Oxytocin (OT) receptors, and OT promotes dentin formation via Wnt signaling pathway. On the other hand, laser irradiation increased the expression of OT receptors in cultured rat dental pulp cells. We attempted to develop a new vital pulp regeneration therapy using OT and laser irradiation. We found that the diode laser (LLLT) irradiated for cultured rat dental pulp cells increased the expression of OT receptors and accelerated the formation of dentin-like mineralized nodule. Furthermore, in order to determine the irradiation conditions that influence on the expression of OT receptors, we used bone tissue as well as dental pulp tissue and examined the effects of the laser irradiations on osteogenesis using various lasers with different wavelengths.

研究分野：保存治療学分野、歯内療法学

キーワード：Oxytocin Odontoblast Dentinogenesis Dental pulp cell Laser Wnt signal

1. 研究開始当初の背景

(1)これまでに我々の研究室では、すでに確立した象牙芽細胞用細胞の培養方法を用いて Oxytocin が象牙質形成を促進することを報告した。そのメカニズムの詳細が不明ではあるものの、象牙質形成を調節できる Oxytocin は将来新しい覆髄材として応用可能なのではないかとこの仮説のもと、Oxytocin による象牙質形成促進のメカニズムを解明することとした。

(2)これまでにレーザー照射によって骨組織などの硬組織形成を認めたという報告がある。しかしながらそのメカニズムは、詳細には明らかにされていない。そこで、象牙芽細胞様細胞にレーザー(半導体)を照射することにより、石灰化メカニズムを明らかにすることを試みた。また、同じ硬組織である骨組織にもレーザーを照射することにより、石灰化組織形成のメカニズムを明らかにしようと試みた。

2. 研究の目的

(1) Oxytocin による象牙質形成促進作用のメカニズムはどのようなものであるか。

そして Oxytocin は歯科治療で用いる新たな薬剤として応用可能であるのか。

(2)レーザー照射による硬組織形成のメカニズムはどのようなものであるのか。

また、レーザー照射は、硬組織形成のコントロールに臨床応用可能であるのか。

3. 研究の方法

(1)Oxytocin を象牙芽細胞様細胞に添加した(OT 群)、Oxytocin 受容体を Crispr/Cas9 を用いて KnockOut (KO) した KO 群、KO 群に Oxytocin を添加した KO-OT 群を作成し、石灰化結節形成の挙動を調べるとともに象牙質形成を担う Wnt シグナルカノニカル経路の挙動について Real-TimePCR を用いて象牙質マトリックスタンパクおよび Wnt シグナル因子である各種マーカーを解析した。また、同じく象牙芽細胞に対してレーザー照射を行い、象牙質形成を担う Wnt シグナルカノニカル経路の挙動について Real-TimePCR を用いて象牙質マトリックスタンパクおよび Wnt シグナル因子、さらに Oxytocin 受容体の各種マーカーを解析した。

(2)ラット脛骨にデンタルバー(スチールバー)で欠損を作成した群(bar 群)、炭酸ガスレーザーを非注水で照射した群(非注水群)、注水下で照射した群(注水群)を作成し、1週間後にサンプリングを行った。試料は、H-E 染色、IHC 染色(sclerostin)、 μ CT を撮影し、解析ソフトウェア amira を用いて、新生骨量を 3D 解析した。

4. 研究成果

(1)Oxytocin が Wnt シグナルを介して象牙質形成を行う(Kato Y, Yokose S. J Endod. 2021 Apr;47(4):592-599.)メカニズムを調べるために、Wnt シグナルの挙動に着目した。まず、ラット臼歯の Wnt10a, Ectodin 発現を免疫組織化学的染色で探索した結果を示す。(図1)それぞれ、歯髄組織にその発現を認めた。

(2)我々はすでに象牙芽細胞様細胞の培養を確立している。すなわち、ラット下顎切歯より歯髄組織を摘出し酵素処理法にてラット歯髄培養細胞を単離し、実験に使用した。また、Crispr/Cas9 を用いたゲノム編集技術を使用し、Wnt シグナルカノニカル経路のリガンドの1つである Wnt10a を KnockOut (KO) した Wnt10aKO 歯髄培養細胞

(Wnt10aKO 群)、Wnt シグナルカノニカル経路のアンタゴニストである Ectodin を KO した EctodinKO 歯髄培養細胞(EctodinKO 群)、対照群として Cont 群を作成した。1, 3週間後にサンプリングを行い、Wnt10a, Ectodin の発現を検索し(図2)、Wnt10aKO 歯髄培養細胞および EctodinKO 歯髄培養細胞の作成に成功したことを確認した。また、興味深いことに、Wnt10a を KO した場合、Ectodin の発現も有意に減少し、Ectodin の KO を行なった場合、Wnt10a の発現も有意に減少することを発見した。これにより、Wnt10a と Ectodin の間には何らかの相互作用が存在しており、象牙質形成をコントロールしていることが示唆された。

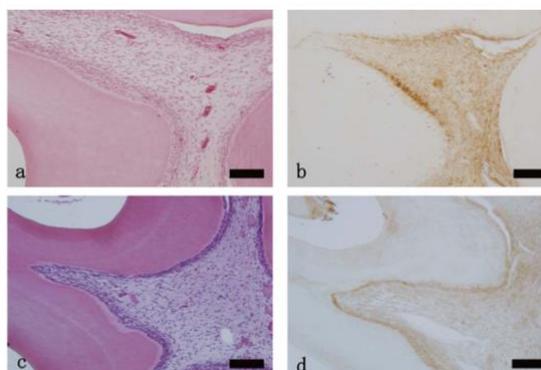


図 1. ラット下顎臼歯 H-E 染色(a, c)と抗 Ectodin 抗体を用いた IHC(b)抗 Wnt10a 抗体 IHC(d)を示す。Bar:100 μ m

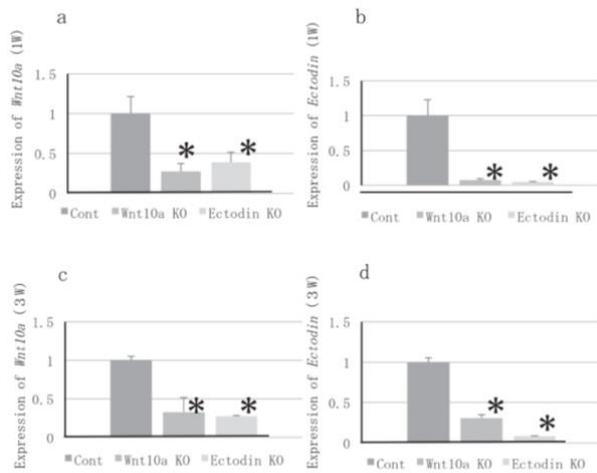


図 2. 培養 1 週間目の Wnt10a (a), Ectodin (b), 培養 3 週間目の Wnt10a (c), Ectodin (d) の発現量を示す。

(3) 3 週間培養した後、サンプリングし、アルカリフォスファターゼ (ALP) と von Kossa 染色を行い石灰化形成を確認した。(図 3) Cont 群と比較して、Wnt10aKO 群および EctodinKO 群では顕著に石灰化結節形成が抑制された。

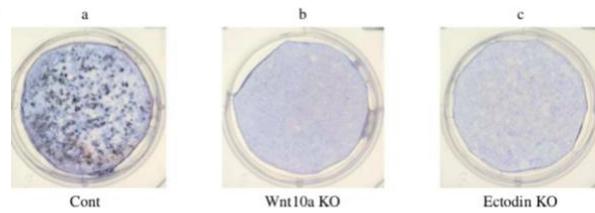


図 3. 培養 21 日目の ALP, von Kossa の染色を示す。Cont 群 (a) Wnt10aKO 群 (b) EctodinKO 群 (c) を示す。

(4) Real-TimePCR にて Wnt シグナルのマーカーである Axin2, Lef-1, Sonic Hedgehog (SHH), Runx2, 象牙質マトリックスタンパクのマーカーである Dspg, Bgp の mRNA 発現量を検索したところ、図 3 に示す石灰化結節形成を反映する様に、Cont 群と比較して Wnt10aKO 群および EctodinKO 群では Wnt シグナルのマーカーである Axin2, Lef-1, Sonic Hedgehog (SHH), Runx2, 象牙質マトリックスタンパクのマーカーである Dspg, Bgp の mRNA 発現量は有意な減少を示した。

(松本勝利, 加藤 昌佳 et al. 明海歯学; 50 (2), 137-145, 2021 参照)

以上より、Wnt10aKO 群および EctodinKO 群は Cont 群と比較して、形態学的、生化学的に石灰化形成が減少することを確認した。また、Wnt10a を KO すると、Ectodin の発現も有意に減少し、Ectodin の KO では、Wnt10a の発現も有意に減少することから Wnt10a と Ectodin は象牙芽細胞の分化を調節し、その相互作用により象牙質形成を調節することが示唆された。

(5) 我々の研究室ではラット歯髄培養細胞に半導体レーザーを照射すると石灰化結節形成が亢進することをすでに確認している。このメカニズムを解析するために、レーザーを照射した歯髄培養細胞をサンプリングし、mRNA を解析したところ各種 Wnt シグナルマーカーが増加し、また Oxytocin 受容体が増加していることを確認した。また、レーザー照射の硬組織形成作用として、骨組織が挙げられる。すでに、レーザー照射によって骨形成促進作用があるという報告はたくさんなされているが、そのメカニズムは不明である。そこで、象牙質と同様に生体硬組織である骨組織のレーザー照射による新生骨形成メカニズムを明らかにするために、ラット脛骨にデンタルバー (スチールバー) で欠損を作成した群 (bar 群)、注水機能搭載型炭酸ガスレーザーを非注水で照射した群 (非注水群)、注水下で照射した群 (注水群) を作成した。(図 4)



レーザー照射条件：
25W、照射時間 2ms、
照射距離 1.5-2cm、
移動スピード 15cm/20s

図 4. 左より、デンタルバーを用いて骨欠損を作成したモデル、非注水で炭酸ガスレーザーを照射したモデル、注水下でレーザーを照射したモデルを示す。

(6) 1 週間後にサンプリングを行った。すなわち、脛骨を摘出後、直ちに 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、70%エタノールで脱脂を行い、EDTA にて脱灰を行なった。エタノール系列で脱水を行なったのち、パラフィン包埋を行なった。パラフィンブロックはマイクロームを用いて、厚さ 4 μm の連続切片を作成し、以降の染色に使用した。H-E 染色、IHC 染色 (一次抗体: ウサギ抗ラット sclerostin 抗体ポリクローナル抗体 PAC864Ra01, Cloud-Clone Corp、二次抗体: ビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体、発色: DAB 発色) の各種染色を行なった。(図 5, 6)

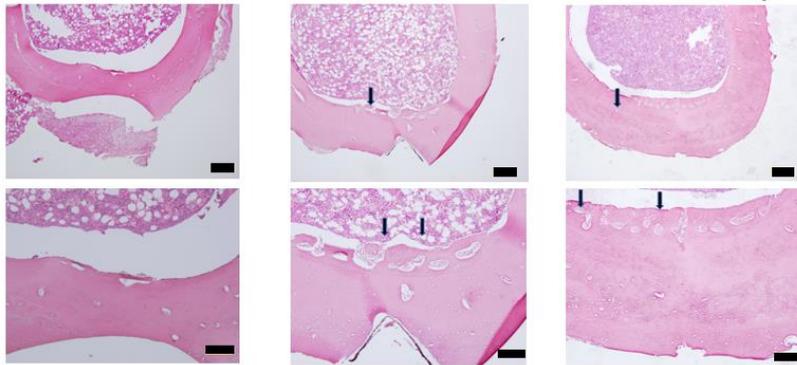


図 5. H—E 染色を示す。
左より、bar 群、非注水群、注水群を示す。矢印は新生骨を示す。
上段：Bars200 μ m
下段：Bars100 μ m

H-E 染色より、デンタルバーで切削した bar 群では、骨欠損部の骨髄側には骨形成をほとんど認めなかった。一方で、Laser を照射し、骨欠損を作成した非注水群、及び注水群では骨髄側に新生骨の形成を認めた。(矢印で示す。)

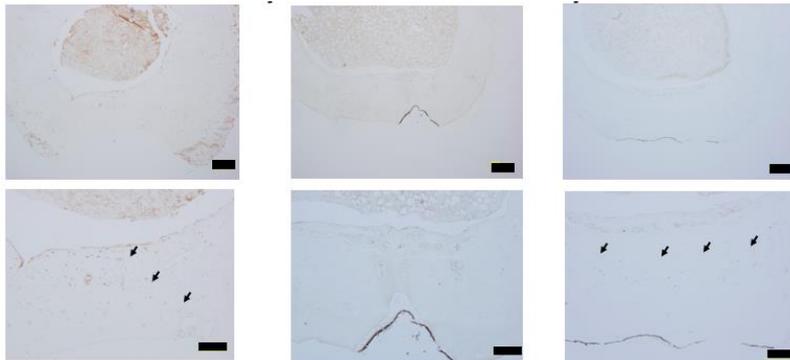


図 6. IHC 染色(抗 sclerostin 抗体)を示す。
左より、bar 群、非注水群、注水群を示す。矢印は染色された骨細胞を示す。
上段：Bars200 μ m
下段：Bars100 μ m

IHC の結果から、非注水群では、骨組織の骨細胞から分泌される sclerostin の発現が抑制されたが、これは H-E 染色の結果より、骨細胞の消失を認めることからレーザー照射の影響により、レーザー照射された直下の骨細胞がダメージを受けたと考えられる。一方、注水群では深部には sclerostin 陽性骨細胞を認めた。したがって、注水により骨細胞へのダメージを抑えられたと考えられる。

(7) また、サンプリングした脛骨の μ CT を撮影し、解析ソフトウェア amira を用いて、新生骨量の 3D 解析を行なった。(図 7)

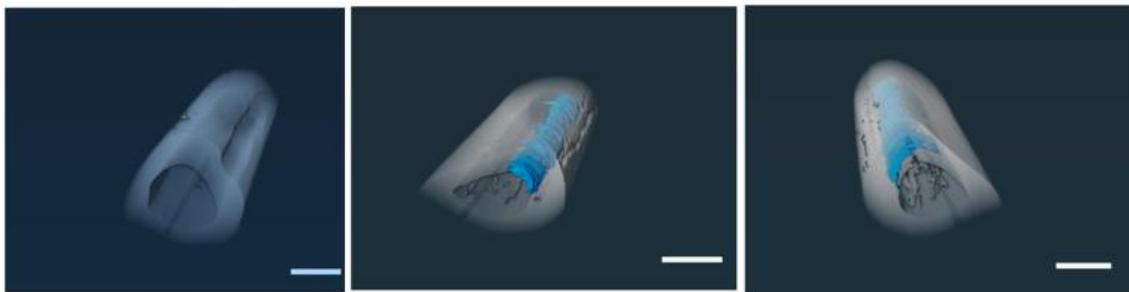


図 7. ラット脛骨における構築した 3 次元解析画像を示す。左より、bar 群、非注水群、注水群を示す。青色は新生骨を示す。
Bars1000 μ m

μ CT 画像からも対照群と比較して、非注水群および注水群では新生骨増加を認めた。以上のことから、注水下でのレーザー照射は炭化層を多く作らずに新生骨形成が可能であることが示された。注水による熱抑制作用が、表層の骨細胞へのダメージを抑制したと考えられ、骨組織へのダメージを少なく、骨形成促進作用を促進するという点においても有用であることがわかった。したがって、注水によるレーザー照射は骨形成促進作用に有用であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 ISHIDA YUI、KATO YUKA、IWAMOTO RINA、UDAGAWA NOBUYUKI、HASEGAWA AKIHIKO、YOKOSE SATOSHI | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Effects of Irradiation by Carbon Dioxide Laser Equipped With a Water Spray Function on Bone Formation in Rat Tibiae | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 In Vivo | 6. 最初と最後の頁 559 ~ 564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.13114 | 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 ISO Eisuke、KATO Yuka、YAMAZAKI Takahide、HASEGAWA Akihiko、YOKOSE Satoshi | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Possibility of Laser application in new Bone Regeneration Therapy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Laser Dentistry | 6. 最初と最後の頁 69 ~ 73 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5984/jjpnsoclaserdent.31.69 | 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 松本 勝利 加藤 邑佳 久野木克典 中込 恵 石田 結 横瀬敏志 | 4. 巻 50(2) |
| 2. 論文標題 Wnt10a 及び Ectodin Knock Out によるラット歯髄細胞における dentinogenesis に対する作用 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 明海歯科医学 | 6. 最初と最後の頁 137-145 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 ISO Eisuke、KATO Yuka、YAMAZAKI Takahide、HASEGAWA Akihiko、YOKOSE Satoshi | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Possibility of Laser application in new Bone Regeneration Therapy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Laser Dentistry | 6. 最初と最後の頁 69 ~ 73 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5984/jjpnsoclaserdent.31.69 | 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9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤 邑佳 |
| 2. 発表標題 レーザーが担う象牙質再生療法の発展 |
| 3. 学会等名 (1)第33回日本レーザー治療学会 総会・学術大会 シンポジウム 6「歯科用レーザーの検査への応用と LLLT 基礎研究」（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤 邑佳 |
| 2. 発表標題 基礎実験から見えてくる骨・象牙質再生療法へのレーザー治療の可能性 |
| 3. 学会等名 (2)第34回日本レーザー歯学会総会・学術大会 シンポジウム 「細胞・組織に対する光線の生物学的効果」（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中込 恵, 加藤 邑佳, 横瀬 敏志 |
| 2. 発表標題 ラット歯髓培養細胞における象牙質形成におけるWnt10aとEctodinの相互作用について |
| 3. 学会等名 特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集157回 Page153(2022.10) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤 邑佳, 横瀬 敏志 |
| 2. 発表標題 Laserを用いた歯髓培養細胞における石灰化結節形成機構の解析 |
| 3. 学会等名 明海歯科医学(1881-4298)51巻2号 Page S28-S29(2022.09) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤 邑佳, 横瀬 敏志 |
| 2. 発表標題 レーザー照射によるラット歯髄細胞における石灰化促進作用 |
| 3. 学会等名 特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集156回 Page78(2022.05) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤邑佳 |
| 2. 発表標題 シンポジウム 「細胞・組織に対する光線の生物学的効果」 |
| 3. 学会等名 第34回日本レーザー歯学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 加藤邑佳 |
| 2. 発表標題 レーザーが担う硬組織再生療法の発展 |
| 3. 学会等名 第33回日本レーザー治療学会 総会・学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤邑佳 |
| 2. 発表標題 レーザー照射によるラット歯髄細胞における石灰化促進作用 |
| 3. 学会等名 日本歯科保存学会2022年度（第156回）春季学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横瀬敏志 加藤邑佳 |
| 2. 発表標題 歯科領域におけるレーザーの診断とLLLT効果応用への可能性 骨再生療法へのレーザー応用の新たな展開 |
| 3. 学会等名 日本レーザー治療学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 加藤 邑佳, 横瀬 敏志 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 日本歯科評論(0289-0909)83巻1号 | |

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 加藤 邑佳, 市村 葉, 久野木 克典, 横瀬 敏志 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 日本歯科評論(0289-0909)83巻2号 | |

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 加藤 邑佳, 横瀬 敏志 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ | 5. 総ページ数 3 |
| 3. 書名 日本歯科評論(0289-0909)83巻3号 | |

〔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 |
|---------|---------|