

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792197

研究課題名(和文)レーザーによる歯髄細胞分化の解明

研究課題名(英文)Elucidation of dental pulp cell differentiation by laser

研究代表者

竹内 撰 (TAKEUCHI, Osamu)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70548320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてヒト歯髄由来線維芽細胞におけるTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 刺激によるMMPs産生はERK1/2経路が関与することが明らかにできた。またレーザー照射の影響についても検討を行った。半導体レーザー照射後の細胞増殖について観察した。照射時間を15, 30秒, 1, 3, 5分, 出力を0.5, 1, 2, 5, 10Wとした。0.5, 1, 2, 5Wでは細胞増殖に影響は認められなかった。10W3分では細胞数の減少が認められ、10W10分ではすべての細胞がレーザー照射により死滅した。高出力半導体レーザーでは今後、歯の表面の温度上昇や歯髄に及ぼす熱障害の危険性についてもさらなる検討を行うべきである。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp inflammation associated with the progression of dental caries facilitates the production of inflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs), in the pulp tissue, resulting in tissue destruction. The results of this experiment suggest that MEK1/2 and ERK1/2 pathways were involved in the MMP-3 production enhanced by IL-1 $\beta$  stimulation in HPFs.

These samples consisted of 25 experimental group samples with 15 and 30-second, and 1, 3, and 5-minute irradiation times, and 0.5, 1, 2, 5, and 10-W irradiation outputs, and one control group sample without irradiation. However, for 0.5 - 10-W high-energy Semiconductor lasers, a decrease in the cell number due to cell death was observed after 3-minute irradiation, and no cell adhesion to the plate surface immediately after cell seeding was noted after 5-minute irradiation with the 10-W laser.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学保存治療系歯学

キーワード：細胞・組織 炎症 レーザー 再生医学 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

平成 17 年度厚生労働省による最新の歯科疾患実態調査では、20 歳以上のう蝕保有率は 90%を上回ったとされている。う蝕が進行すると、歯髄組織に炎症性サイトカインが産生され、免疫担当細胞が浸潤する。その過程で歯髄炎が惹起され、さらに炎症が進行すると組織が破壊され歯髄壊死へと移行する。

現在の歯科治療における偶発露髄に対して、水酸化カルシウム製剤を用いて、硬組織形成を促進させることにより、歯髄を保存する方法が広く行われている。しかし、水酸化カルシウム製剤の強いアルカリ性が歯髄に炎症反応を惹起させてしまい、必ずしも高い臨床効果を得ていない現状がある。

歯科臨床に広く使用されている CO<sub>2</sub> レーザーは、表層において組織を蒸散し、深部では創傷治癒を促進する活性化層を形成すると考えられている。また骨芽細胞に対する石灰可能促進についても研究され、殺菌作用とともに炎症抑制作用があることも知られており、知覚過敏、歯周炎の軽減など広く使用されている。

マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs) は線維芽細胞、炎症性細胞などから分泌される。MMPs は気質特異性などからいくつかのグループに分類され、細胞外マトリックス分解酵素の一つであることや、活性化することにより相互作用し他の MMPs を活性化することで組織のリモデリング・再生に深く関与していると報告されている。

私は、炎症性サイトカイン刺激によりヒト歯髄由来線維芽細胞は、MMPs を産生し、活性化機序を解明することにより、歯髄組織を破壊する過程を明らかにした。そこで、ヒト歯髄由来線維芽細胞における炎症性サイトカイン刺激による炎症波及経路のさらなる研究と CO<sub>2</sub> レーザー照射による MMPs 産生に対する影響を明らかにすることにより、歯髄組織再生機序を明らかにしたいと考える。

## 2. 研究の目的

歯を長期間保存するために、Minimal Intervention だけでは不十分であり、歯髄の再生が必要不可欠である。現在の歯科治療においての偶発露髄に対して、水酸化カルシウム製剤による歯髄保存方法が広く行われている。しかし、必ずしも高い臨床効果を得られておらず、多くの問題点や改善点が指摘され、解決されていない点が多くある。そこで、高い抗炎症作用、組織活性化をもつ CO<sub>2</sub> レーザーを用いることで、歯髄組織の炎症だけでなく、歯髄組織再生機序を解明し、さらには歯の保存につなげることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)炎症性サイトカイン刺激による MMPs 産生

の解明：採取したヒト歯髄由来線維芽細胞を用いて炎症性サイトカイン刺激を行う。MMP-3 による他の MMPs 活性を確認し、ウエスタンブロットングおよびゼラチン・ザイモグラフィーにより産生を検討する。

(2)ヒト歯髄由来線維芽細胞におけるレーザー照射による影響：ヒト歯髄由来線維芽細胞に対し、為害作用を示すことのない照射条件にて、炎症性サイトカインの産生、シグナル伝達が行われる炎症状態のない条件を確立する。細胞増殖のマーカーを用いて細胞増殖活性、運動能活性についても検討する。

(3) レーザー照射によるヒト歯髄由来線維芽細胞の活性化：細胞活性シグナルを用いてレーザー照射条件を確立する。細胞増殖マーカーを用いて細胞増殖能促進を含めて、照射条件を確立する。

(4)Lentiviral miR RNAi Expression System による RNAi を行う。

各種 miRNA を発現するレンチウイルスを精製し、MMPs 発現あるいは炎症伝達に関与する歯髄細胞に添加し、stable なクローンを分離する。これを用いて、transmigration assay を行い、目的分子をノックダウンし transmigration における役割を検討する。

歯髄細胞に transient な transfection を行い、目的分子のノックダウンによる影響を検討する。

stable なクローンに wild type の分子を再発現させることによるレスキュー実験を行う。また、目的分子の mutant を発現した際の細胞の挙動を検討し、重要なアミノ酸配列を検討する。

(5)炎症性サイトカイン刺激によるレーザー照射の有効性の検討：炎症性サイトカインを用いて炎症刺激し、炎症状態にある細胞に対して、確立した照射条件によりレーザー照射を行う。これらの刺激により、遺伝子発現が亢進する分子、あるいは、活性化する細胞内シグナル伝達分子を RT-PCR、ウエスタンブロット、FACS などで検討する。また、炎症抑制効果についても検討する。

(6) レーザー照射による象牙芽細胞分化促進の検討：確立した条件の下で検討する。

## 4. 研究成果

本研究はヒト歯髄由来線維芽細胞を用いて、炎症性サイトカイン刺激が MMPs 産生にどのような影響を及ぼすかを検討し、炎症伝達経路の解明及び象牙芽細胞分化について検討する。さらに炎症伝達経路に対する阻害剤を用いることによる影響を検討する。

本研究で炎症性サイトカインであ

る TNF- $\alpha$  , IL-1 刺激による MMP-3 の炎症伝達経路は MEK1/2-ERK1/2 経路の関与することが明らかにすることができた。

また、半導体レーザー照射におけるヒト歯髄線維芽細胞に及ぼす影響についても検討を行った。

歯 90mm dish に細胞を播種しコンフルエントな状態まで培養し、trypsin-EDTA にて細胞を剥離回収し、各種条件下にてレーザー照射を行った。レーザー照射後 24-well plate に細胞を播種、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  条件下にて培養し、24, 48, 72 時間後の細胞増殖を観察した。照射時間を 15, 30 秒, 1, 3, 5 分, 照射出力を 0.5, 1, 2, 5, 10W の 25 サンプル, コントロールとして非照射群の計 26 サンプルとした。

象牙質透過性については、照射出力を 0.5, 1.0, 2.0W と増していくと、透過するエネルギーも同様に増す傾向が認められた。厚さ 1.0mm の象牙質ならば約 30~40% の透過率で、厚さ 3.0mm の象牙質ならば 10~20% の透過率であることが確認された。

細胞への影響については、コントロールに対し 0.5, 1, 2, 5W 半導体レーザー照射群では細胞増殖に影響は認められなかった。半導体レーザー 10W, 3 分照射群では細胞の死滅による細胞数の減少が認められ、照射後 24, 48 時間では細胞数は少なかった。10W, 5 分照射群ではすべての歯髄細胞がレーザー照射により死滅し、培養 24, 48, 72 時間後における顕微鏡下での観察で細胞の確認はできなかった。

レーザー照射が適度な場合はレーザーが象牙質を透過して歯髄の活性化や疼痛緩和効果などを与えることができるが、限度を超えて過度のエネルギーを与えてしまうと不可逆的な変化、すなわち歯髄壊死をおこしてしまう可能性がある。Arrastia らの報告では、40mW GaAlAs 半導体レーザーの 180 秒間照射による歯表面の温度上昇は 2.5 $^{\circ}$ C であり、歯髄に対する熱障害の危険がないことを裏づけている。したがって、低出力半導体レーザーにおいては保護鏡の装置や照射時間の限度を 180 秒とするなどの原則を守って使用すれば危険はないと報告されている。しかし 0.5~10W の高出力半導体レーザーについては今後、歯表面の温度上昇や歯髄に対する熱障害の危険についても検討すべきである。

次に炎症性サイトカインである IL-1 がヒト歯髄由来線維芽細胞の MMP-3 産生にどのような影響を与えるかを検討した。MMP-3 の産生は、0, 1, 2, 5, 10 ng/ml の IL-1 刺激で濃度依存的に増強した。MMP-9 の産生は認められなかった。一方、MMP-2 の産生は認められたが IL-1 刺激の影響はなかった。

IL-1 刺激により MMP-3 の産生は増強した。また ERK1/2 のリン酸化は経時的に増強し、15 分でピークがみられた。0, 1, 2, 5, 10 ng/ml の IL-1 で刺激したところ、ERK1/2 のリン酸化を検討したところ、IL-1 の濃度依存的に増強した。

MEK1/2 の阻害剤である U0126 を用いて、IL-1 刺激による MMP-3 産生能の変化について検討した。IL-1 刺激により増強した MMP-3 の産生は、U0126 により明らかに抑制された。一方、MMP-2 産生には U0126 の影響は認められなかった。

今後、さらなる歯髄炎の発症機序を解明するためには、その他の炎症性サイトカイン刺激による MMPs 産生に関する研究を行うことが必要である。また、MMPs はマトリックス代謝に関与する一連のプロテアーゼ群であり、複雑なネットワークを形成していることから、さらに歯髄の炎症における他の MMPs の調節機構についても検討するとともに細胞分化に関連し検討していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

竹内 撰, 合田征司, 吉川一志, 堂前英資, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生の影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 57 巻, 2014, 1-8.

Domae E, Ogawa Y, Takeuchi O, Ujii Y, Kato Y, Kawasaki T, Hayashi H, Komasa R, Domae N, Goda S, Ikeo T. The Effect of lysenin on the differentiation into osteoclast cells. J Oral Tissue Engin, 査読有, 9 巻, 2011, 3-9.

Tanaka Y, Takeuchi O, Goda S, Yoshikawa K, Yamamoto K. Effect of GaAlAs semiconductor laser irradiation on the permeability of dentin and survival of dental pulp cells. J Osaka Dent Univ, 査読有, 45 巻, 2011, 7-16.

〔学会発表〕(計 8 件)

小正玲子, 合田征司, 吉川一志, 竹内 撰, 堂前英資, 三木秀治, 小正紀子, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における MMP-3 産生に及ぼす small G protein の影響. 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2013.10.17. 秋田県総合生活文化会館 (アトリオン) (秋田市).

小正玲子, 竹内 撰, 合田征司, 堂前英資, 谷本啓彰, 三木修治, 野村雄司, 池尾 隆,

山本一世．ヒト歯髄由来線維芽細胞における MMPs 産生におよぼす small G protein の影響．日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会(第 138 回)．2013.6.28．福岡国際会議場(福岡市)．

竹内 撰,合田征司,小正玲子,宮地秀彦,松田有之,小松首人,藤原秀樹,池尾 隆,山本一世．ヒト歯髄由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生への影響．日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会(第 137 回)．2012.11.22．広島国際会議場(広島市)．

吉川一志,竹内 撰,田中芳人,鈴木康一郎,保尾謙三,廣田陽平,魯 灵,畑下芳史,三木秀治,山本一世．半導体レーザーが歯髄細胞に及ぼす影響について．日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会(第 137 回)．2012.11.22．広島国際会議場(広島市)．

魯 灵,小正玲子,黄地智子,廣田陽平,恩田康平,竹内 撰,西田尚敬,鈴木康一郎,山本一世．二酸化チタンを併用した歯の漂白システムによる漂白効果の検討．第 22 回日本歯科医学会総会．2012.11.10．大阪国際会議場(大阪市)．

Yasuo K, Yokota K, Matsuda T, Takeuchi Q, Iwata N, Hattori Y, Yoshikawa K, Yamamoto K. Application of various lining materials to dental hard tissues irradiated by Er:YAG laser. 2012 Sino-Japan Dental Conference. 2012.4.27. Chengdu, China.

加藤 侑,合田征司,小正玲子,竹内 撰,山本一世,池尾 隆,林 宏行．ヒト歯髄由来線維芽細胞の MMP-3 産生に及ぼす MAP kinase の影響．日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会(第 135 回)2011.10.20-21.大阪国際交流センター(大阪市)．

川崎俊也,合田征司,竹内 撰,氏井庸介,林 寛,小正玲子,加藤 侑,林 宏行,山本一世,池尾 隆,松本尚之．PDGF-bb はヒト歯肉由来線維芽細胞において MMP-1 産生を増強する．第 9 回日本再生歯科医学会学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪市)．

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

竹内 撰(TAKEUCHI, Osamu)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：70548320