

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670805

研究課題名(和文) 低出力超音波パルスを基軸とした象牙質形成制御理論と非侵襲性歯内療法への展開

研究課題名(英文) Development of non-invasive dentin regeneration therapy based on LIPUS.

研究代表者

根本 英二 (NEMOTO, EIJI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40292221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕で失われた歯(象牙質)を再生することは現代歯科医療において最大の目標の1つである。低出力超音波(LIPUS)を発生する装置を用いてマウス歯髄細胞およびヒト歯髄細胞を刺激したところ、骨形成誘導能を有することで知られるBone morphogenetic protein-2の発現が誘導された。さらに、LIPUS刺激は硬組織形成分化マーカーであるオステオポンチンの発現も誘導した。その発現誘導は、LIPUS照射によって細胞外に放出されたATPが同細胞のプリン受容体を介する機構であることが明らかとなった。これらの知見から、LIPUS照射は象牙質の再生誘導に有効な治療手段となりうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is one of the big aims of dentistry to regenerate a tooth substance (dentin), which is lost by dental caries. We demonstrated that LIPUS exposure to dental pulp cells induces the expression of BMP-2, which is known to be a powerful osteogenic growth factor. Moreover, the expression of osteopontin, an osteogenic differentiation marker, was enhanced by LIPUS, where extracellular ATP released from cell acts on purinergic receptors on dental pulp cells. These findings suggest that LIPUS exposure can be an effective and non-invasive endodontic therapy for dentin regeneration.

研究分野：医歯薬 歯学 保存治療系歯学

キーワード：歯内療法 低出力超音波パルス 歯髄細胞 オステオポンチン

1. 研究開始当初の背景

露出歯髄に対して修復象牙質の形成を促す(歯髄直接覆髄)方法は、水酸化カルシウムが臨床で広く用いられている。本薬剤は高アルカリによる象牙芽細胞壊死の誘導と、その壊死層直下への未分化歯髄細胞の遊走により修復象牙質の形成を促すとされているが、安定した治療法とは言えない。一方、Mineral Trioxide Aggregateは水酸化カルシウムと比較して炎症を起こしにくい新しい覆髄剤として着目されているが、その薬理作用の機序は未だ明らかではない。象牙芽細胞の分化機序の解析が進む中、Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2がその分化を強く促進することが明らかにされており、その臨床応用に期待が高まっている。しかし、動物実験における生体内での半減期の短さや生理的濃度をはるかに越えた蛋白量の必要性などが指摘されており、未だ象牙質形成誘導法に関する学術基盤は整っていない。低出力超音波パルス(Low intensity pulsed ultrasound; 以下LIPUS)療法は、1980年代に骨折治癒促進効果が証明されて以来、国内においては1995年に難治性骨折超音波骨折治療法の保険適応が新設され、現在整形外科領域における理学療法として広く用いられている。また、近年LIPUS照射は培養歯根膜細胞の分化を促進することも報告されている。しかしながら、歯髄組織領域におけるLIPUSの治癒促進作用に研究報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LIPUSによる歯髄細胞の分化誘導の分子制御メカニズムを解明し、LIPUSによる象牙質形成制御理論を確立するとともに、非侵襲性象牙質形成誘導法を展開するための基盤を構築することである。

- (1) ヒト抜去歯を用いて、LIPUS音波の歯質透過特性及び歯髄に対する伝播特性を

解析する。

- (2) 培養ヒト歯髄細胞を用いた *in vitro* の実験系を用いて、LIPUSが細胞分化に与える影響およびその分子制御メカニズムを明らかにする。
- (3) マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、LIPUSで変動するシグナル経路の同定し、歯髄細胞の分化誘導との関連を検討する。

3. 研究の方法

本研究はLIPUS刺激に基づくヒト歯髄細胞の分化制御におけるシグナル伝達経路を *in vitro* の実験系を用いて明らかにする。

- (1) 細胞:インフォームドコンセントを得た患者の抜去歯からヒト歯髄細胞を分離する。
- (2) LIPUS刺激:LIPUS(SAFHS®4000J)照射条件は、周波数1.5MHz、繰り返し周波数1.0kHz、超音波強度30mW/cm²、パルス幅200m秒とする。
- (3) LIPUS刺激によるヒト歯髄細胞の象牙芽細胞分化誘導能の検討:象牙芽細胞特異的抗原(象牙質シアロリン蛋白)を含むosteogenic分化抗原の発現を経時的にリアルタイムPCR法およびウェスタンブロット法で解析する。
- (4) LIPUSによる分化誘導の分子制御メカニズム

インテグリンシグナル経路:

LIPUS刺激によるFocal Adhesion KinaseおよびIntegrin Linked Kinaseのリン酸化の状態をそれぞれの抗体を用いてウェスタンブロット法で解析を行い、インテグリン経路の活性化について解析する

Integrin Linked Kinase 活性阻害剤およびFocal Adhesion Kinase 活性阻害剤を用いて、LIPUS刺激による細胞分化誘導能を前項の実験と同様にリアルタイムPCR法で解析する。

Adenosine triphosphate (ATP)シグナル経路:

LIPUS 照射後の培養上清中の細胞外 ATP の濃度を、市販検出キットを用いて測定する。

プリン受容体阻害剤および各受容体特異的アンタゴニストを用いて、LIPUS 刺激により誘導された分化マーカーの発現を指標としてリアルタイム PCR 法で解析する。これにより本分化に関与する受容体を同定する。

同定した受容体に対する siRNA 法を用いて LIPUS の分化誘導能に対する阻害効果をリアルタイム PCR 法で検証する。

同定した受容体に対する特異的アゴニストで細胞を刺激することによって LIPUS の分化誘導能が模倣されることをリアルタイム PCR 法で検証する。

4. 研究成果

- (1) LIPUS 照射による細胞増殖能に与える影響を解析したところ、マウスおよびヒト歯髄細胞を LIPUS 照射後、培養 24 時間後および 72 時間後において LIPUS 照射群とコントロール群には有意差を認めなかった。また、細胞遊走能においても両群に明らかな有意差は認めなかった。
- (2) LIPUS 照射により、マウスおよびヒト歯髄細胞において 72 時間後にオステオポンチンと BMP-2 の遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に増加した。
- (3) LIPUS 照射により培養上清中の ATP 量は LIPUS 照射後 30 分後まで有意差は認めなかったが、50 分後の ATP 量は約 8 倍、60 分後では約 15 倍に増強された。
- (4) ヒト歯髄細胞を 1 μ M ATP および ATP γ S で 72 時間刺激することによりオステオポンチンおよび BMP-2 の遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に増加した。しかし、ADP, AMP,あるいはアデ

ノシンを添加しても有意な変化は見られなかった。

- (5) これらの誘導反応は ATP 受容体阻害剤により有意に抑制された。

LIPUS 照射のマウスおよびヒト歯髄細胞に与える影響について検討した結果、LIPUS 照射により細胞外の ATP 量が有意に増加し、それに引き続きオステオポンチンおよび BMP-2 の遺伝子発現量が有意に増加した。また、マウスおよびヒト歯髄細胞を ATP で刺激することによりオステオポンチンおよび BMP-2 の遺伝子発現量が増加したことから、LIPUS 照射によって細胞外に放出された ATP が OPN の発現誘導に関与している可能性が示唆された。これらの知見は、修復象牙質の形成誘導において LIPUS 照射が有効に作用する可能性を示唆するものと考えられる。

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 12 件)

Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. Tamura, M., E. Nemoto. Jpn. Dent. Sci. Rev. 印刷中 2016 (査読あり)
Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. Nemoto, E., Y. Sakisaka, M. Tsuchiya, M. Tamura, T. Nakamura, S. Kanaya, M. Shimonishi, H. Shimauchi. J. Periodontal Res. 51(2):164-174, 2016 (査読あり)
doi: 10.1111/jre.12294.
Periodontal disease is associated with insomnia among victims of the great east Japan earthquake: A panel study initiated three months after the disaster. Tsuchiya, M., J. Aida, Y.

Hagiwara, Y. Sugawara, Y. Tomata, M. Sato, T. Watanabe, H. Tomita, E. Nemoto, M. Watanabe, K. Osaka, I. Tsuji. *Tohoku J. Exp. Med.* 237 (2), 83-90, 2015 (査読あり)

doi: 10.1620/tjem.237.83.

Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. Sakisaka, Y., M. Tsuchiya, T. Nakamura, M. Tamura, H. Shimauchi, E. Nemoto. *Exp. Cell Res.* 336 (1): 85-93, 2015 (査読あり)

doi: 10.1111/jre.12294.

Calcium Phosphate Particles Induce Interleukin-8 Expression in Human Gingival Epithelial Cell Line via Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway. Sakai, Y., E. Nemoto, S. Kanaya, M. Shimonishi, H. Shimauchi. *J. Periodontol.* 85(10):1464-1473, 2014 (査読あり)

doi: 10.1902/jop.2014.130709.

Cyclic tensile force up-regulates BMP-2 expression through MAP kinase and COX-2/PGE2 signaling pathways in human periodontal ligament cells. Suzuki, R., E. Nemoto, H. Shimauchi. *Exp. Cell Res.* 323(1): 232-241, 2014 (査読あり)

doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.013.

Extracellular ATP inhibits IL-1-induced MMP-1 expression through the action of CD39/nucleotidase triphosphate dephosphorylase-1 on human gingival fibroblasts. E. Nemoto, K. Gotoh, M. Tsuchiya, Y. Sakisaka, H. Shimauchi. *Int Immunopharmacol.* 17: 513-518, 2013 (査読あり)

doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.014.

Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. Shimauchi,

H., E. Nemoto, H. Ishihata, M. Shimomura. *Jpn Dent Sci Rev.* 49: 118-130, 2013 (査読あり)

doi:10.1016/j.jdsr.2013.05.001

Calcium-mediated increased expression of fibroblast growth factor-2 acts through NF- κ B and PGE2/EP4 receptor signaling pathways in cementoblasts. Kanaya, S., E. Nemoto, Y. Sakisaka, H. Shimauchi. *Bone.* 56 (2), 398-405, 2013 (査読あり)

doi: 10.1016/j.bone.2013.06.031.

Nanohydroxyapatite increases BMP-2 expression via a p38 MAP kinase dependent pathway in periodontal ligament cells. Suto, M., E. Nemoto, S. Kanaya, R. Suzuki, M. Tsuchiya, H. Shimauchi. *Arch Oral Biol.* 58:1021-1028, 2013 (査読あり)

doi:10.1016/j.archoralbio.2013.02.014

Extracellular -NAD⁺ inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 expression on human gingival fibroblasts. Gotoh, K., E. Nemoto, S. Kanaya, H. Shimauchi. *Connect Tissue Res.* 54(3):204-9, 2013 (査読あり)

doi: 10.3109/03008207.2013.782013.

口腔再生医学の確立を目指した歯・歯周組織関連細胞の分化制御の分子機構 (総説) 根本英二日歯周誌、55(3), 239-248, 2013 (査読あり)

<http://doi.org/10.2329/perio.55.239>

[学会発表](計 15件)

Metabotropic glutamate receptor 1 promotes cell proliferation of cementoblasts via MAP kinase signaling pathways. S. Kanaya, E. Nemoto, H.

Shimauchi. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai, Japan

Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. Y. Sakisaka, M. Tsuchiya, T. Nakamura, M. Tamura, H. Shimauchi, E. Nemoto. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai, Japan

Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. E. Nemoto, Y. Sakisaka, M. Tsuchiya, M. Tamura, T. Nakamura, S. Kanaya, H. Shimauchi. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai, Japan

Low-intensity pulsed ultrasound enhances osteopontin expression in human dental pulp cell. M. Suto, S. Kanaya, H. Shimauchi, E. Nemoto. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai, Japan

Berberine induces cell proliferation of human periodontal ligament cells with decrease in alkaline phosphatase expression. S. Ikeno, S. Kanaya, E. Nemoto, M. Suto, Y. Sakisaka, H. Shimauchi. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai, Japan

ヒト歯髓細胞への低出力超音波(LIPUS)はオステオポンチンの発現を誘導する須藤瑞樹、金谷聡介、島内英俊、根本英二、第

143回日本歯科保存学会総会 2015年11月12, 13日、東京

ベルベリンはヒト歯根膜細胞アルカリフォスファターゼを抑制し細胞増殖を誘導する.池野修功、金谷聡介、根本英二、須藤瑞樹、向阪幸彦、島内英俊. 第143回日本歯科保存学会総会.2015年11月12, 13日、東京

ナノハイドロキシアパタイトによる歯小囊細胞の Wnt/ β -catenin シグナル誘導. 向阪幸彦、金谷聡介、須藤瑞樹、田村正人、島内英俊、根本英二. 第58回秋季日本歯周病学会.2015年9月11日, 12日, 浜松

代謝型グルタミン酸受容体 1 (mGluR1)はMAP キナーゼを介してセメント芽細胞の増殖を促進する.金谷聡介、根本英二、島内英俊. 第58回秋季日本歯周病学会.2015年9月11日, 12日, 浜松

歯小囊細胞における Wnt/ β -catenin シグナルによる Osterix 発現誘導への p38 MAP キナーゼの関与.向阪幸彦、根本英二、金谷聡介、田村正人、島内英俊. 第58回春季日本歯周病学会.2015年5月15日, 16日, 千葉

セルフケアの確立が歯周基本治療の成功につながった広汎性重度慢性歯周炎の1症例. 宍戸敦子、金谷聡介、佐々木和美、佐藤明美、北村智美、根本英二、島内英俊. 第58回春季日本歯周病学会.2015年5月15日, 16日, 千葉

CANONICAL WNT SIGNALING INDUCES ALKALINE PHOSPHATASE EXPRESSION OF DENTAL FOLLICLE CELLS. H. Shimauchi, Y. Sakisaka, S. Kanaya, E. Nemoto. 100th American Academy of Periodontology Annual Meeting. September 19-22, 2014, San Francisco

Wnt5a attenuates canonical Wnt-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. Y. Sakisaka,

M. Tsuchiya, T. Nakamura, M. Tamura, M. Suto, S. Kanaya, H. Shimauchi, E. Nemoto.
93rd International Association for Dental Research. March 11-14, 2015, Boston, Mass., USA

Non-Canonical WNT がセメント芽細胞の分化に与える影響. 向阪幸彦、根本英二、須藤瑞樹、金谷聡介、田村正人、島内英俊.
第 140 回日本歯科保存学会総会. 2014 年 6 月 19, 20 日、大津

Wnt/ β -catenin シグナルによる歯小囊細胞アルカリフォスファターゼの発現誘導.
向阪幸彦、根本英二、金谷聡介、田村正人、島内英俊. 第 57 回春季日本歯周病学会. 2014 年 5 月 23 日-5 月 24 日、岐阜

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

根本 英二 (NEMOTO EIJI)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

(2) 研究分担者

石幡 浩志 (ISHIHATA HIROSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40261523

土谷 昌宏 (TSUCHIYA MASAHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60372322

金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80375097