

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 山川 駿次郎(東京都)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第 493 号
学位授与年月日 平成 31 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Effects of Er:YAG and Diode Laser Irradiation on Dental Pulp Cells and Tissues
(歯髄細胞と組織に対する Er:YAG レーザーならびに半導体レーザーの影響について)
International Journal of Molecular Sciences 2018,19,2429 doi:10.3390/ijms19082429
平成 30 年 8 月 17 日発行
論文審査委員 主査 教授 奥 村 敏
副査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 細 矢 哲 康

内容の要旨

【研究目的】

歯科治療において Er:YAG レーザーおよび半導体レーザーは様々な用途で使用されている。歯内治療においては露髄面にレーザーを照射することで歯髄組織に賦活作用をもたらすが、その作用機序についてはまだ不明な点が多い。本研究では、それら 2 種のレーザーを歯髄細胞に照射し、惹起される物質を比較することを目的とした。

【材料と方法】

生後約 5 か月のブタ永久切歯歯髄から分離して作製した不死化細胞 (PPU-7 細胞) と第二大臼歯歯胚から採取した歯髄組織に対して、Er:YAG レーザー (50 mJ, 10 PPS, 10 秒, 距離 2 cm) および半導体レーザー (1 W, 10 sec, 連続モード, 距離 2 cm) を照射して下記の実験を行った。また、レーザー未照射群をコントロールとした。

① 96well プレート上の細胞の増殖能ならびに増殖速度を MTS アッセイを用いて調べた。

② 1 日および 3 日間培養した両レーザー照射群と未照射群の PPU-7 細胞のアポトーシスの割合を調べるために、カスパーゼ 3 抗体を用いて免疫染色を行った。

③ 両レーザー照射群と未照射群の PPU-7 細胞から total RNA を調製し、2 種類の象牙質シアロリントンパク質 (DSPP) スプライスバリエント (DSPPv1 および DSPPv2) とマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP2 および MMP20), II 型コラーゲン (Col II), Runx2, オステオカルシン (OC), トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β 1, 2, 3) の遺伝子発現を定量 PCR (qPCR) 法を用いて調べた。

④ 両レーザー照射群と未照射群の PPU-7 細胞の硬組織系細胞への分化を ALP 活性を測定することで比較した。

⑤ レーザー照射による PPU-7 細胞の石灰化への影響をアリザリンレッド S 染色による石灰物の観察および石灰物中のカルシウム含有量から評価した。

⑥ レーザー照射群と未照射群のブタ歯髄組織を用いて SDS-電気泳動およびザイモグラフィを行って、タンパクバンドおよびプロテアーゼ活性の変化について調べた。

⑦ レーザー照射による TGF- β の活性化を調べるため、リコンビナント潜在型 TGF- β (Latant TGF- β) に直接レーザー照射を行い、ヒト歯根膜培養細胞 (PDL 細胞) を用いて TGF- β 活性を調べた。

【結果および考察】

① MTS アッセイでは、半導体レーザー照射群での増殖速度は未照射群と比較して増殖速度は同じであり、照射直後に影響を及ぼした。対照的に、最初の Er:YAG レーザー照射群の増殖速度は、半導体レーザー照射群の約半分であり、2日目に細胞に影響を及ぼした。3日目に、半導体レーザー照射群と未照射群は同じ速度で細胞増殖は減少したが、Er:YAG レーザー照射群は徐々に減少傾向を示した。

② ヘマトキシリン・エオジン染色ならびにカスパーゼ3を標的とした免疫染色を用いて、1、3日間培養を行った照射群ならびに未照射群の PPU7 細胞のアポトーシス小体の割合を観察したところ、未照射群と比較して両照射群はアポトーシスの割合が有意に高かった。

③ 遺伝子発現は、Er:YAG レーザー照射群では、MMP2 が有意に上昇を示した。一方、半導体レーザー照射群では未照射群と比較して DSPP-v1, v2, MMP20 が有意に上昇した。両照射群とも Runx2, TGF- β 1, 2, 3 の発現は減少を示した。また、Er:YAG レーザー照射群は Col II も減少を示した。

④ PPU7 細胞の硬組織系細胞への分化は、未照射群と比較して、両レーザー照射群は3日間培養を行った PPU-7 において、ALP が有意に上昇を示したことより硬組織系細胞への分化傾向が示唆された。

⑤ 7日間石灰化培地にて培養を行った PPU-7 細胞は、Er:YAG レーザー照射群で半円筒状の剥離が認められたが、カルシウム含有量はすべての群において変化は認められなかった。

⑥ レーザー照射群と未照射群のブタ歯髄組織中のプロテアーゼ活性は未照射群では認められなかったものの、照射群では約 110 kDa, 100 kDa, 65 kDa, 55 kDa のプロテアーゼ活性バンドが検出された。

⑦ Latant TGF- β に対するレーザー照射では、どちらの照射群も Latant TGF- β を直接活性化出来ないことが判明した。

以上の結果より、PPU-7 細胞を用いた本研究では、Er:YAG レーザー照射後に細胞増殖速度が1日目で遅く、細胞集団の倍加時間が増加することを実証した。また、Er:YAG レーザーおよび半導体レーザー照射後の1日目の細胞増殖能は両者で異なっていた。アポトーシスの実験所見を踏まえると、この結果は Er:YAG レーザー照射後の細胞の一部で、細胞増殖の他にアポトーシスに向かって動いていることを示唆している。さらに3日目までの細胞増殖速度が2つのレーザー間で異なっているため、レーザーの種類、照射時間、出力などにより細胞分化の初期の代謝速度に影響を与えることも示唆している。遺伝子発現の結果より、Er:YAG レーザー照射が PPU-7 細胞の MMP2 の mRNA 発現を増強し、一方、半導体レーザー照射は MMP20 の mRNA 発現を増強することを実証した。さらに半導体レーザー照射による2つの DSPP の mRNA 発現の上昇から判断すると、半導体レーザー照射は PPU-7 細胞を象牙芽細胞様細胞に分化誘導させる可能性を秘めているかもしれない。実際に半導体レーザー照射は、Er:YAG レーザー照射よりも PPU7 細胞に対する ALP 活性値を上昇させている。さらに両レーザー照射は、歯髄組織中のプロテアーゼの活性化に関与していることを判明した。これらプロテアーゼは TGF- β の活性化に関与することが報告されている。両レーザー照射が直接 TGF- β を活性化出来なかったことより、組織中の TGF- β は、両レーザーにより惹起されたプロテアーゼを介して活性化されることが示唆された。

本研究により、我々は、レーザー治療中における修復象牙質形成機構の解明に関与する所見を得ることができた。今後は、ヒトの歯髄細胞がレーザーに対して同様に応答するかを立証すると共に、歯髄細胞の象牙芽細胞分化に関与すると思われる TGF- β のシグナル経路を調べる必要がある。

審査の結果の要旨

山川駿次郎氏は歯科治療に用いられる Er:YAG レーザーと半導体レーザーの歯髄細胞に及ぼす影響を解明するため以下の解析を行った。

1) ブタ歯髄細胞 (PPU-7) を用いた解析 :

PPU-7 細胞を用いて、2種類のレーザー照射 (Er:YAG レーザーと半導体レーザー) の 1) 細胞増殖能 (MTS アッセイ)、2) アポトーシス、3) 象牙芽細胞への分化マーカー (MMP2, MMP20, Dspp-v1, Dspp-v2) 発現量、4) 硬組織への分化 (Alp 活性) に及ぼす影響を調べた。

その結果 1) Er:YAG レーザーは照射後2日までの細胞増殖抑制効果を示したが、半導体レーザーは照射後3日以降の細胞増殖抑制効果を示すこと 2) いずれの照射もアポトーシス陽性細胞の割合を増加させたが、その程度は Er:YAG レーザーのほうが約2倍高値を示すこと 3) Er:YAG レーザーは MMP2 の mRNA 発現量増加、半導体レーザーは MMP20, Dspp-v1, Dspp-v2 の mRNA 発現量を増加して分化促進効果を示すこと 4) いずれの照射方法でも Alp 活性を増加させる実験結

果を得た。

2) ブタ切歯より摘出した歯髄組織を用いた解析：

ブタ切歯の歯髄組織を用いて、誘導されるプロテアーゼへの影響をザイモグラフィで調べた。その結果 Er:YAG レーザー照射と半導体レーザーでは異なる分子量のプロテアーゼが発現誘導された。

Er:YAG レーザーと半導体レーザーは異なる機序で歯髄細胞から象牙芽細胞への分化促進効果を示すことを明らかにした基礎研究であり、将来的にレーザーの新しい臨床適応につながることを期待される臨床的にも重要な研究である。

よって本論文は博士（歯学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。