

ヒト歯髄細胞における異なる波長の半導体レーザーの
硬組織形成におよぼす影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

深井 讓滋

(指導：松島 潔 教授)

<要旨>

保存治療における歯髄の保存は、患歯の予後に大きく影響すると言われている。現在では露髄した面に水酸化カルシウム製剤や Mineral trioxide aggregate (MTA) を用いたカルシウムを主体とした直接覆髄法が臨床応用されている。しかし、従来の直接覆髄法では不均一な象牙質を形成する可能性があるために臨床では抜髄処置に移行することも少なくない。そのため歯髄組織を保存するためには、より確実に硬組織形成を促す必要があると考えられている。また修復象牙質の形成という面から見ても、歯髄において炎症と硬組織形成は密接に関わると考えられている。臨床において覆髄処置が必要となる歯髄は炎症が起こりやすい状態、もしくはすでに炎症が起こっており、今後もさらなる炎症にさらされる可能性があることを考慮しなければならない。そのため臨床において成功率の高い覆髄法を確立するためには、硬組織を形成すると同時に歯髄の炎症をコントロールすることが必須であると考えられる。

近年、出力の低いレーザー光線を生体組織に照射することによって、創傷治癒促進、血流改善、疼痛緩和、神経賦活等の効果を得ることを目的とした低出力レベルレーザー治療 (Low level laser therapy ; LLLT) が注目されている。歯科においても半導体レーザーはその波長特異性を応用し、LLLT による歯周組織の消炎作用、骨や歯髄における硬組織形成促進作用の臨床応用が期待されている。しかしながら、出力条件や照射時間には違いが認められる。そのため硬組織形成能の違いが出力によるものなのか、照射時間によるものなのか、各波長で形成にかかわる因子が違うのかが判別できないと考えられる。そこで本研究では、半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明することを目的として「波長」に焦点を合わせ、同出力条件下における 660 nm または 810 nm の半導体レーザーでの ALP 活性、Osteocalcin (OCN) の mRNA 発現、石灰化結節の染色、Bone morphogenetic protein (BMP) -2 のタンパク質発現について検討を行った。その結果、無照射群に比べ 660 nm 照射群と 810 nm 照射群どちらの群でも ALP 活性の上昇、OCN mRNA 発現量の有意な

増加, von Kossa 染色の染色性の増大が認められた. しかし, BMP-2 の発現に関しては, 660 nm 照射群では control に比べ有意に増加しているが 810 nm 照射群では有意な差が認められないという結果となった.

さらに, 炎症のケミカルメディエーターである prostaglandin E₂ (PGE₂) は修復象牙質形成に関わると考えられており, ヒト歯髄培養細胞 (hDPC) に対し低濃度で刺激することによって硬組織形成が促進され, 高濃度で刺激することによって硬組織形成が抑制されるという二面性の働きを持つという報告がある. BMP の作用や発現は炎症性ケミカルメディエーターにより調整されているとの報告から, BMP の主なシグナルである smad に注目し, hDPC における BMP-2, リン酸化 smad1/5/8 (Phosphorylated smad1/5/8 ; P-smad1/5/8), smad6 発現に対する高濃度 PGE₂ および半導体レーザーの影響を検討した. その結果, 高濃度 PGE₂ を添加した群では von Kossa 染色の染色性の減少が認められたが, 波長 660 nm もしくは波長 810 nm の半導体レーザーを照射した後に PGE₂ を添加した群では, 無刺激群と同程度の染色を認めた. また無刺激群と比べ, 高濃度 PGE₂ 添加群では BMP-2 および smad6 の遺伝子発現量の増加が認められた. 660 nm のレーザー照射後に PGE₂ 添加を行った群では, BMP-2 の遺伝子発現量の増加が認められる一方で, smad6 の遺伝子発現量は無刺激群とほぼ変わらなかった. 810 nm のレーザー照射後の PGE₂ 添加群では, BMP-2 と smad6 の遺伝子発現量は共に無刺激群と同程度であった. 一方, 本レーザー照射での smad6 のタンパク質発現は PGE₂ 添加群と同程度の発現が認められた.

以上より, 出力を一定にした 660 nm, 810 nm の異なる波長の半導体レーザーを用いたとき, 両者の波長で硬組織形成が促進された. また PGE₂ により, 硬組織形成抑制が認められた. 660 nm の半導体レーザーは smad6 を抑制することによって PGE₂ による硬組織形成抑制作用を打ち消すことが示唆された. また, 同出力での 810 nm の半導体レーザーでは PGE₂ による硬組織形成抑制作用を打ち消すものの, BMP-2 と smad6 を介さない別の制御機構をとることが推測された.

< 諸言 >

保存治療における歯髄の保存は、患歯の予後に大きく影響すると言われている。歯髄は自らが作り出した硬組織、すなわち象牙質で覆われることが望ましい。現在では露髄した面に水酸化カルシウム製剤や Mineral trioxide aggregate (MTA) を用いるカルシウムを主体とした直接覆髄法が臨床応用されている^{1,2)}。しかし、水酸化カルシウム製剤を用いた直接覆髄法では、その強い塩基性のため歯髄組織に炎症をきたし、壊死層を形成することや不均一な修復象牙質を形成するために成功率は高くないことが報告³⁾されている。また、MTA セメントは、Linu らによって ProRoot MTA と Biodentine を用いた直接覆髄法の治療経過の追跡調査を行った報告³⁾があり、全体の成功率が 88.5%と高い数値で報告されているが、表層に限局されず点在した石灰化も少なからず存在すると報告³⁾されている。また歯髄において炎症と硬組織形成は密接に関わると考えられており、臨床において覆髄処置が必要となる歯髄に硬組織形成を促すためには歯髄の炎症をコントロールすることが必須である。

炎症のケミカルメディエーターである prostaglandin E₂ (PGE₂) は修復象牙質形成に関わると考えられており、ヒト歯髄培養細胞に対し低濃度で刺激することによって硬組織形成を促進し、高濃度で刺激することによって硬組織形成が抑制されるという二面性の働きを持つことが報告⁴⁾されている。さらに Bone morphogenetic protein (BMP) の作用や発現もまた、炎症性ケミカルメディエーターにより調整されているとの報告⁵⁾がある。BMP は生理活性物質の中で最も強い骨形成を示す因子の一つと報告⁵⁾され、骨芽細胞の分化、骨の発生、成長、再生に深く関与しており、特に BMP-2 は強力な骨形成促進作用を有するといわれ、MC3T3-E1 細胞に BMP-2 を作用させることで ALP 活性が促進し硬組織形成能が増加したという報告がされている⁶⁾。また BMP-2 は、歯髄における未分化細胞の象牙芽細胞への分化に関与し硬組織形成を促進するものと考えられている⁵⁾。BMP のシグナル伝達には主に smad が関与しているとされ、smad1, 5, 8 はそれぞれ BMP レセプタ

一によりリン酸化され転写調節を行い, smad6, smad7 は, BMP シグナル伝達を抑制すると報告されている⁷⁻¹³⁾. 安達らにより, 1 μ M PGE₂ が smad6 の発現を促進し, smad1, 5, 8 のリン酸化を阻害することによって, BMP シグナル伝達を抑制し, 硬組織形成を阻害するとの報告¹⁴⁾がある. このことからヒト歯髄培養細胞 (hDPC) における高濃度 PGE₂ による硬組織形成の抑制には smad6 が関与していると報告されている.

一方, 近年では出力の低いレーザー光線を生体組織に照射することによって, 創傷治癒促進, 血流改善, 疼痛緩和, 神経賦活等の効果を得ることを目的とした低出力レベルレーザー治療 (Low level laser therapy ; LLLT) が注目されている¹⁵⁾. レーザーは発生物質によって, 固体レーザー, 気体レーザー, 液体レーザーや半導体レーザーなどに分類される. 現在, 直接覆髄法への応用にレーザーを用いる研究が数多くなされている. 半導体レーザーは波長特異性, すなわち水分および血中ヘモグロビンの吸収係数が低いことを利用して, 生体内深部組織までエネルギーが到達する組織透過性レーザーとして知られている¹⁶⁾. 歯科においても半導体レーザーはその波長特異性を応用し, LLLT による歯周組織の消炎作用^{17, 18)}, 骨や歯髄における硬組織形成促進作用¹⁹⁻²¹⁾の臨床応用が期待されている. 國松ら²²⁾は, ヒト歯髄細胞に半導体レーザー (810 nm) を 1.0 W で 10 秒照射することによって, ALP, type I collagen (Coll-1), dentin sialoprotein (DSP) の発現が亢進し, 石灰化結節の形成が増大したと報告し, 810 nm 波長のレーザー照射を行うことで石灰化物形成促進効果の有効性を報告している. また, Theocharidou²³⁾は, ヒト歯髄幹細胞に半導体レーザー (660 nm) を 140 mW で照射することによって, BMP-2, DSP, Osterix の発現が亢進したことから, 660 nm の LLLT が石灰化物形成促進に有効だと報告している. さらに小峯ら²⁴⁾によって, 660 nm (20 mW) と 810 nm (1.0 W) の半導体レーザーにてヒト歯髄培養細胞 (human Dental pulp cells : hDPC) に照射を行い, 660 nm では BMP-2 の, 810 nm では BMP-2, 4 発現量が増加し, 硬組織形成を促進させたという報告がある. 以上より, 歯内療法分野において, 660 nm あるいは 810 nm の半導体レーザーを hDPC に照射することで,

硬組織形成能が促進されることがわかる。しかしながら、これまでの研究はレーザーの出力条件や照射時間に差があり硬組織形成能の違いが出力によるものなのか、照射時間によるものなのか、各波長で形成にかかわる因子が違うのか判別する研究は行われていない。それゆえに、波長以外の条件を限りなく合わせることで、半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明する上で必要となると考えられる。

以上より本研究では、半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明することを目的として、同出力下における「波長」の相違に焦点を合わせ、hDPC に対する半導体レーザーの硬組織形成能を評価した。さらに、半導体レーザーの持つ抗炎症作用を検討する目的で、半導体レーザーを hDPC に照射し、高濃度 PGE₂ を刺激した状態での硬組織形成能について解析した。

<材料と方法>

1. 細胞培養

細胞は、研究のインフォームドコンセントを十分に行って同意を得た、20 歳の患者の矯正学的理由により抜去された第三大臼歯の歯髄組織を無菌的に取り出し、10%ウシ胎児血清 (FBS) , 100 µg/ml penicillin G (明治製菓株式会社, Japan) を添加した α-MEM を通常培地として用いて CO₂ インキュベータ中にて outgrowth させ、6-8 代継代させた細胞を hDPC として実験に用いた (承認番号 : EC15-009 日本大学松戸歯学部倫理審査委員会)。

2. 照射条件

本実験では、異なる波長の半導体レーザーを使用している。すなわち、波長 660 nm (Osada Lightsurge Square 試作機, Osada, Japan) と 810 nm (Osada Diotrron 1000V, Osada, Japan) を刺激として使用した。なお、本研究のレーザーの照射条件については、二つのレーザー装置の出力を 300 mW に統一し、約 10 cm 上方から照射範囲を直径 35 mm として 600 秒間の照射を行った。照射をする際は、細胞を 35 mm dish に播種した後、照

射開始 24 時間前に FBS 濃度を 2 %にして、照射直前に培養液を Phosphate buffered saline (PBS) に交換し照射を行った。照射後、通常培地に β -glycerophosphate (2 mM) と アスコルビン酸 (50 μ g/ml) を含む培地 (石灰化誘導培地) にて 3 日ごとに培地交換を行い、最大 30 日間培養を行った (Fig. 1)。

3. PGE₂による hDPC の処理

レーザー照射が与える hDPC の硬組織形成に対する炎症の影響を解析するために、レーザー照射を行った後の培地に 10 μ M PGE₂ (Cayman Chemical, USA) を添加し培養を行った。

4. ALP 活性

ALP 活性の測定は Oshima ら²⁵⁾の方法に従って行った。すなわち、35 mm dish にて 1~19 日間培養を行った細胞を PBS にて 2 度洗浄し、0.1 M glycine-NaOH buffer, 基質として 8 μ M p-nitrophenylphosphate を加え、37°C, 30 分間インキュベートし、0.1 M 水酸化ナトリウムを加え反応を停止させ、波長 415 nm における吸光度を測定した。酵素活性は 1 分間に遊離した p-nitrophenol 1 μ mole を 1 munit とした。

5. Von Kossa 染色

照射後 30 日間培養した歯髄細胞における石灰化結節形成の確認を von Kossa 染色を用いて行った。すなわち、30 日目の歯髄細胞に対して、10%ホルマリン溶液 (Wako, Japan) にて 30 分間固定し、固定後蒸留水にて洗浄、5%硝酸銀液にて 1 時間放置後、蒸留水にて洗浄し、5%チオ硫酸ナトリウム液で 3 分間還元固定させ、流水下にて洗浄後、calcified nodule の形成を観察した。

6. Real-time PCR 解析

total RNA を鋳型に、One Step SYBR[®] Primescript[™] RT-PCR KIT II Perfect Real Time (Takara, Japan) を用いて逆転写後、Thermal Cycler Dice[®] Real-Time System (Takara, Japan) にて Real-Time PCR 解析を行った。本解析には Osteocalcin (OCN) , BMP-2, smad6,

GAPDH 各プライマー (Table 1)^{14, 26-28)} を使用した。42°C5分, 95°C10秒で逆転写を行い, 95°C10分で熱変性させ, アニーリングおよび伸長反応を 60°Cで 30秒の 2ステップ法で 50 cycle 行った。定量法は, GAPDH をコントロールとし $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて計算した。

7. ELISA 法

照射 72 時間後の細胞上清を採取し, BMP-2 のタンパク質量の測定を Quantikine ELISA Kit[®] (R&D Systems, USA) を用いて micro plate reader (MTP-450 Lab, Corona Electric, Japan) にて行った。

8. Western blot 法

35 mm culture dish で培養後, 刺激 24 時間前に 2%FBS を含む α -MEM に培地交換した。刺激後の hDPC を 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.2 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) , 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含有する Cellytic M Cell Lysis reagent (Sigma Aldrich, USA) にて溶解した。

Bradford 法にて, タンパク質量の調整を施したのち sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (New England Biolabs, USA) を加え 5 分間煮沸した後, 15,000 rpm で 1 分間遠心分離した後の上清をサンプルとした。7.5%の SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 用ゲル (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad, USA) にて電気泳動後, 転写装置 (日本エイドー社, Japan) を使用してニトロセルロース膜 (Bio-Rad, USA) へ転写した。その後 skim milk (Becton Dickinson, New Jersey, USA) にて室温で 30 分ブロッキングを行い, 一次抗体を室温で 2 時間振盪反応させ, 二次抗体を室温で 90 分間同様に反応させた。一次抗体として, 抗 Phosphorylated (P-) smad1/5/8 抗体 (1/1,000) , 抗 smad6 抗体 (1/1,000) , または抗 β -actin 抗体 (1/2,000) を供した。二次抗体として, HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を供した。ECL prime Western Blotting detection system (GE Healthcare, England) を用いて化学発光を行い, X 線フィルム (Hyperfilm, GE Healthcare, England) 上に感光させて発現量を確認した。

8. 統計処理

得られた測定値は平均値±標準偏差 (SD) で示した. 有意差の検定には Tukey test を用い, 有意水準 1%および 5%で検定した.

Table 1. Real-time PCR 法に用いた各プライマーの塩基配列

Primer		Sequence	Size
OCN	Forword	5'-CCCAGGCGCTACCTGTATCAA-3'	112 bp
	Reverse	5'-GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'	
BMP-2	Forword	5'-CTGGCTGATCATCTGAACTCCACT-3'	94 bp
	Reverse	5'-TCGGGACACAGCATGCCTTA-3'	
smad6	Forword	5'-GAGTACAAGCCACTGGATCT-3'	104 bp
	Reverse	5'-ATGCTGGCGTCTGAGAAT-3'	
GAPDH	Forword	5'-AGGCTAGCTGGCCCGATTTC-3'	123 bp
	Reverse	5'-TGGCAACAATATCCACTTTACCAG-3'	

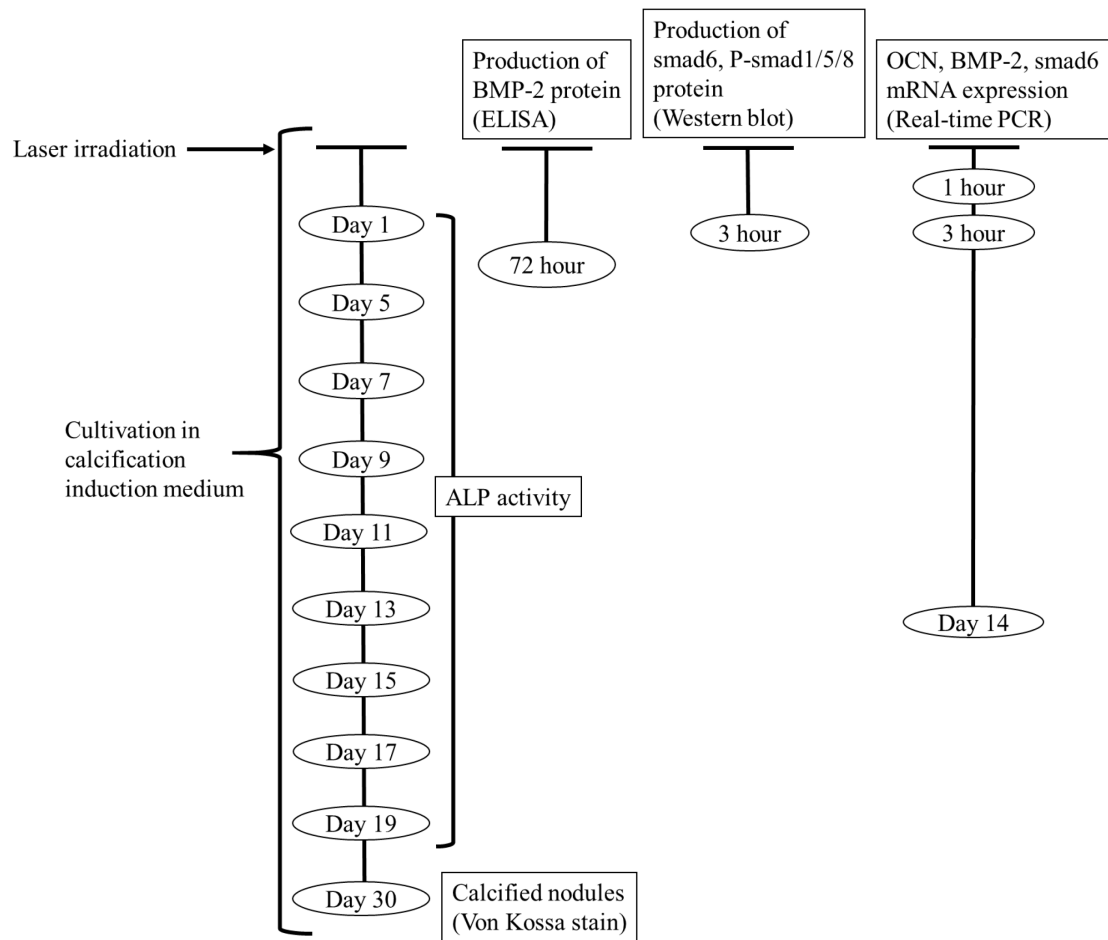


Fig. 1 実験概要

<結果>

1. 半導体レーザー照射が及ぼす hDPC の ALP 活性への影響

ALP 活性はレーザー照射後すべての群において経時的に上昇が見られ、13 日目をピークとした後下降した (Fig. 2A).

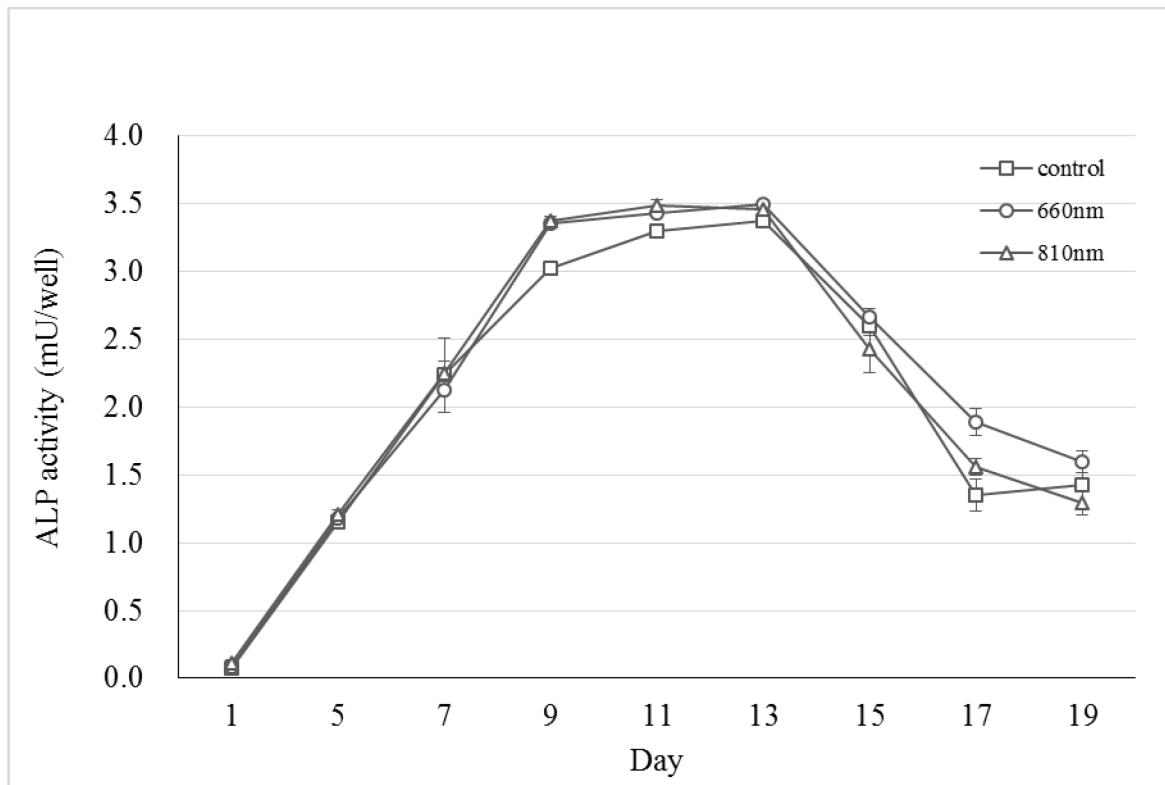


Fig. 2A 半導体レーザー照射後の ALP 活性の時間変化

9日, 11日, 13日のALP活性において, どちらのレーザー照射群も, コントロール群との間に有意な活性上昇を認めた. 9日, 11日, 13日どの日においても2つのレーザー照射群の間において有意な差は認められなかった (Fig. 2B).

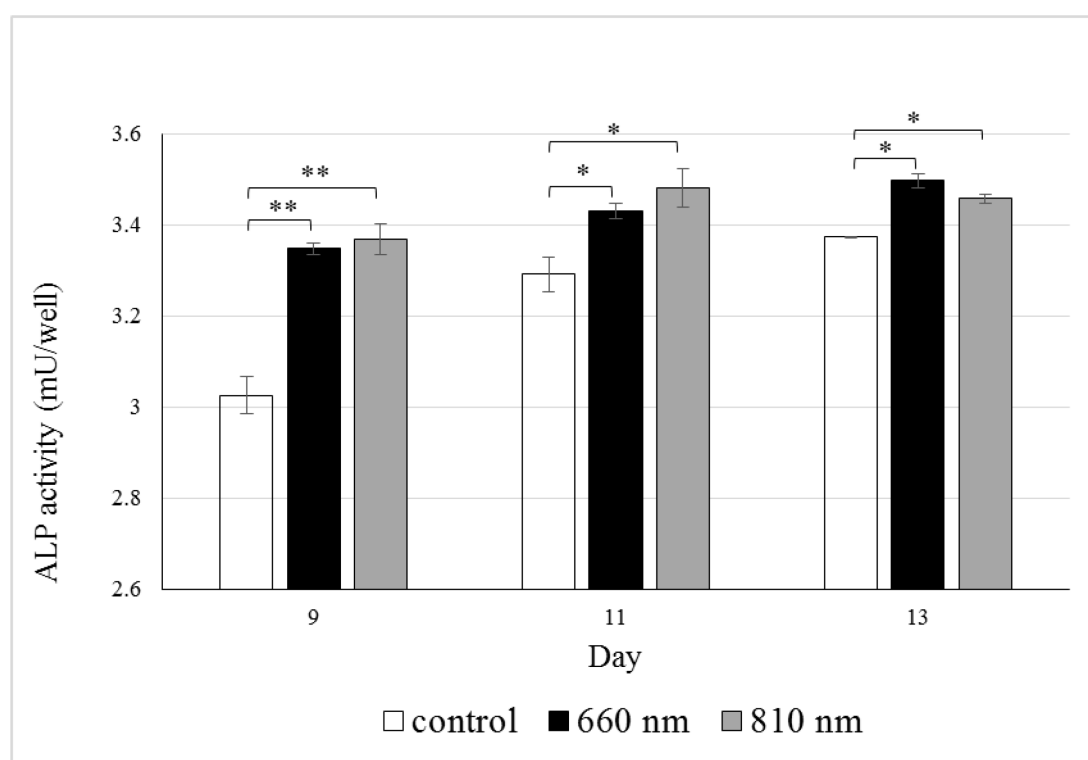


Fig. 2B 半導体レーザー照射後9日, 11日, 13日のALP活性への影響
値は平均値±標準偏差 (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$).

2. 半導体レーザー照射が及ぼす hDPC の OCN mRNA 発現量への影響

照射 14 日後の細胞群において、コントロール群と比べ、660 nm 照射群、810 nm 照射群共に mRNA 発現量の有意な増加が認められた。2 つのレーザー照射群において有意な差は認められなかった (Fig. 3)。

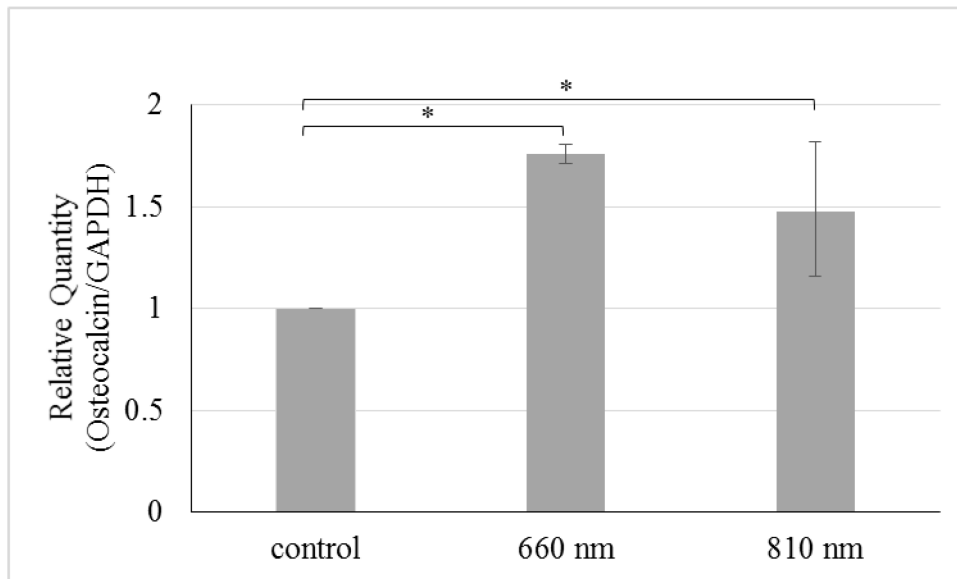


Fig. 3 半導体レーザー照射が及ぼす hDPC の OCN mRNA 発現量への影響

半導体レーザー照射後 14 日後の hDPC における OCN mRNA 発現量の比較を Real-time PCR 法により行った (* $p < 0.05$).

3. 半導体レーザーを照射された hDPC による石灰化物の染色

レーザー照射から 30 日目の von Kossa 染色において、レーザー照射群どちらにもコントロール群と比べて、染色性の増大が認められた。レーザーの波長の違いについて、視覚的な差は認められなかった (Fig. 4)。

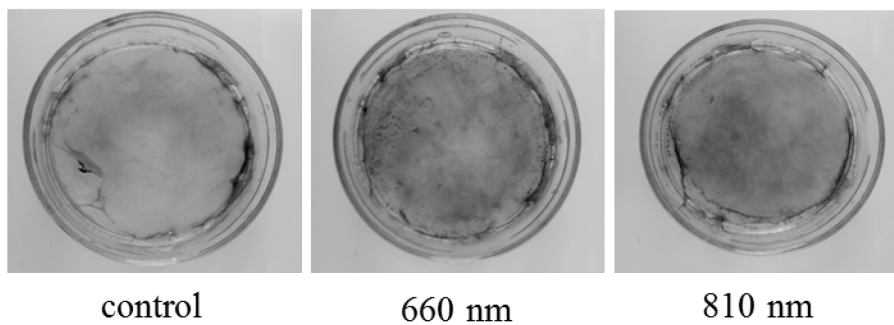


Fig. 4 半導体レーザーによる石灰化物形成への影響

半導体レーザー照射後培養 30 日目の hDPC に対して von Kossa 染色を行った。

4. 半導体レーザー照射が及ぼす hDPC の BMP-2 タンパク質発現量への影響

BMP-2 産生量は、照射 72 時間後の細胞上清において、660 nm 照射群はコントロール群と比較し有意なタンパク質量の増加を認めた。コントロール群と 810 nm 照射群との間において有意なタンパク質量の増加は認められなかった (Fig. 5)。

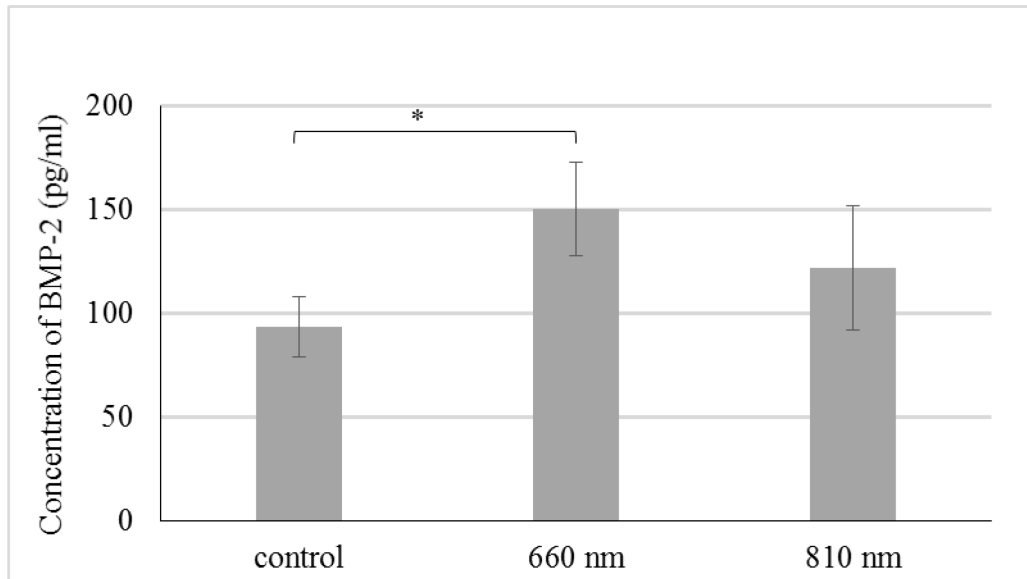
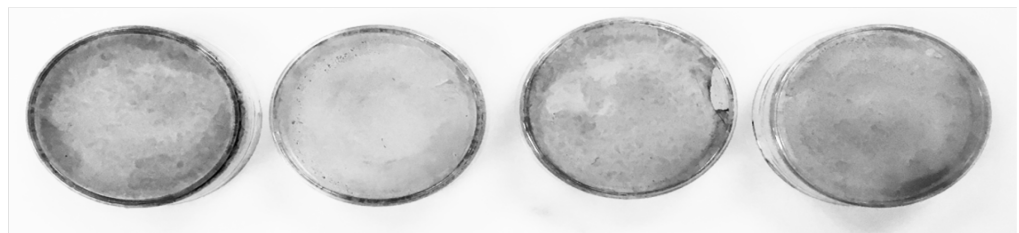


Fig. 5 半導体レーザー照射が及ぼす hDPC の BMP-2 タンパク質発現量への影響

半導体レーザー照射後 72 時間後の hDPC における BMP-2 タンパク質発現量の比較を ELISA 法により行った (* $p < 0.05$).

5. 半導体レーザーおよび PGE₂ による石灰化物染色への影響

刺激 30 日後の von Kossa 染色において, control 群と比べ 10 μ M PGE₂ を添加することによって染色性の減少が認められた. しかしレーザーを照射することによって PGE₂ 添加群に比べ染色性の増大を認めた. レーザーの波長の違いについて, 視覚的な差は認められなかった (Fig. 6).



10 μ M PGE ₂	—	+	+	+
660 nm	—	—	+	—
810 nm	—	—	—	+

Fig. 6 半導体レーザーおよび PGE₂ による石灰化物染色への影響

半導体レーザー照射および 10 μ M PGE₂ 刺激後培養 30 日目の hDPC に対して von Kossa 染色を行った.

6. 半導体レーザーおよび PGE₂ の BMP-2 mRNA 発現量に与える影響

照射 1 時間後の hDPC において, control 群, 波長 810 nm のレーザーを照射した後 PGE₂ を添加した群 (810 nm+PGE₂ 群) に比べて, PGE₂ 添加群, 波長 660 nm のレーザーを照射した後 PGE₂ を添加した群 (660 nm+PGE₂ 群) の 2 群で BMP-2 発現の有意な増加が認められた (Fig.7).

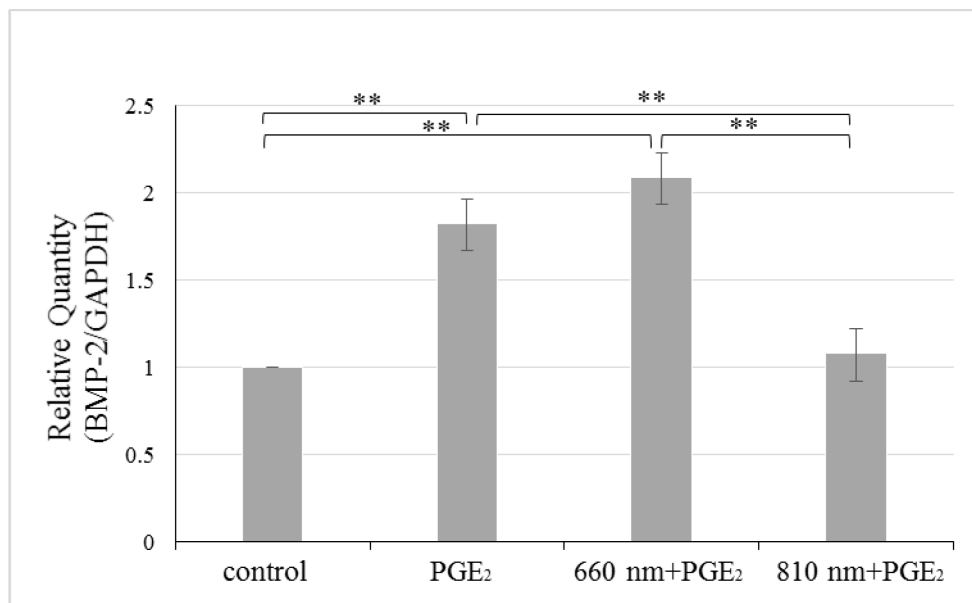


Fig. 7 半導体レーザーおよび PGE₂ の BMP-2 mRNA 発現量に与える影響

半導体レーザー照射および 10 μM PGE₂ 刺激後 1 時間後の hDPC における BMP-2 mRNA 発現量の比較を Real-time PCR 法により行った (**p<0.01).

7. 半導体レーザーおよび PGE₂ の smad6 mRNA 発現量に与える影響

照射 1 時間後の hDPC において, control 群に比べ, PGE₂ を添加することによって smad6 発現の有意な増加が認められた. また PGE₂ 群に比べ, レーザー照射を行ったどちらの群においても control 群と同程度まで smad6 発現の減少が認められた (Fig. 8).

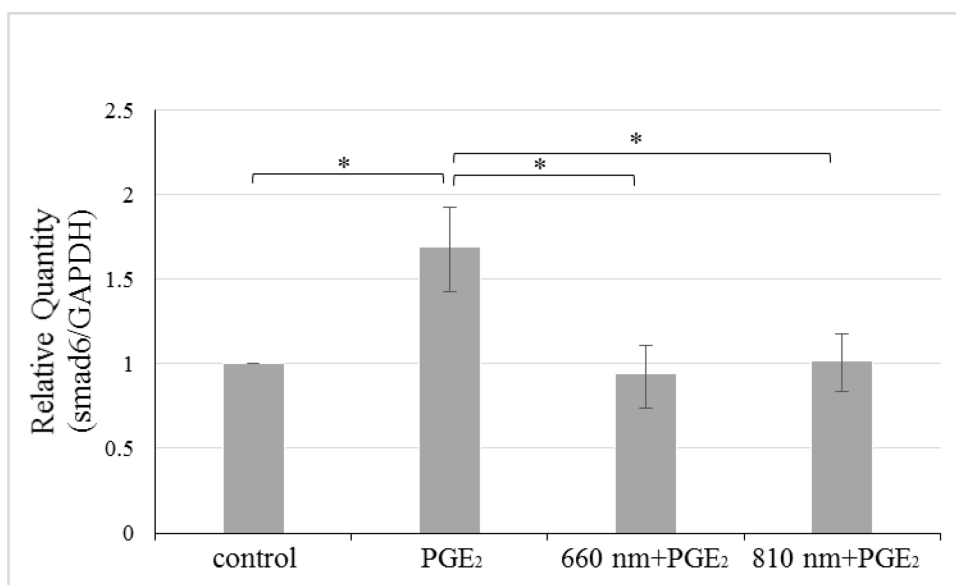


Fig. 8 半導体レーザーおよび PGE₂ の smad6 mRNA 発現量に与える影響

半導体レーザー照射および 10 μM PGE₂ 刺激後 1 時間後の hDPC における smad6 mRNA 発現量の比較を Real-time PCR 法により行った (*p<0.05).

8. 半導体レーザーおよび PGE₂ の smad タンパク質発現に与える影響

照射 3 時間後の hDPC において PGE₂ 添加群では P-smad1/5/8 の発現は認められなかったが、半導体レーザーを照射することによって P-smad1/5/8 の発現が認められた。また、すべての群において、smad6 の発現が認められた。さらに、PGE₂ を添加することによって smad6 発現量の増加が認められたが 660 nm の半導体レーザーを照射することによって smad6 発現量の減少が認められた。一方 810 nm の半導体レーザー照射群では、660 nm 照射群ほど明確な smad6 発現量の減少は認められなかった (Fig. 9)。

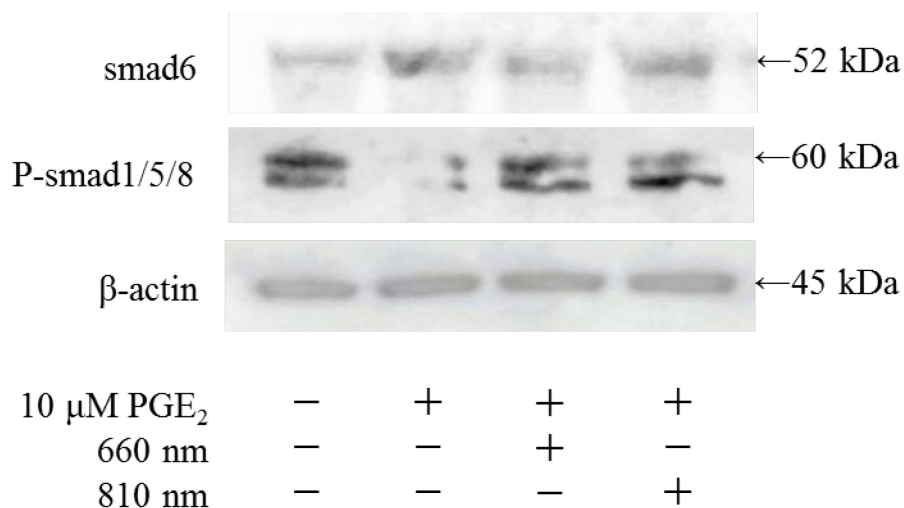


Fig. 9 半導体レーザーおよび PGE₂ の smad タンパク質発現に与える影響

半導体レーザー照射および 10 μM PGE₂ 刺激後 3 時間後の hDPC における P-smad1/5/8, smad6 タンパク質発現の比較を western blot 法により行った。

<考察>

半導体レーザーは、歯髄に対して抗炎症作用や硬組織形成能促進効果などの有用性が研究され続けている。半導体レーザーの細胞為害性について國松ら²²⁾は、810 nmの半導体レーザーを低出力にてヒト歯髄細胞に照射したとき、細胞増殖能が有意に増加したことから半導体レーザーに細胞為害性はないと報告している。また小峯ら²⁴⁾により、660 nmの半導体レーザーを低出力で照射したとき、ヒト歯髄培養細胞の増殖能が有意に増加することから単波長の半導体レーザー照射に細胞為害性はないと報告している。半導体レーザーを用いた研究においてその波長や出力条件は様々であり、硬組織形成能に与える影響の違いが出力によるものなのか、波長によるものなのかを判別する研究は行われていない。そこで、本研究では半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明することを目的として「波長」に焦点を合わせ、同出力条件下における、660 nm または 810 nm の半導体レーザーでの ALP 活性、OCN mRNA 発現、石灰化結節の染色、BMP-2 の発現について検討を行った。

骨芽細胞や象牙芽細胞の分化マーカーの一つとして知られる ALP は、リン酸エステルを加水分解する酵素であることから、ヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害するピロリン酸を分解し、硬組織形成を促進させると考えられている²⁹⁾。歯髄細胞においても、石灰化初期に産生され、高い ALP 活性が認められるという報告³⁰⁾がされていることから、本実験でも硬組織形成能を評価することが可能と考えた。その結果、ALP 活性はレーザー照射後すべての群において 13 日目をピークとし、経時的に上昇が見られた。9 日目の ALP 活性において、どちらのレーザー照射群も、コントロール群との間に有意な活性上昇を認めた。また歯髄細胞培養後期に観察される成熟象牙芽細胞の分化マーカーである OCN^{31,32)} の mRNA 発現量もレーザー照射を行った 2 群ではコントロール群に比べ有意な増加を認めた。von Kossa 染色でも、両波長の半導体レーザー照射群において、硬組織形成の促進が認められた。吉田ら³³⁾は、80 mW の半導体レーザーを歯髄細胞に 1 分以上レー

レーザー照射すると、無照射のコントロール群と比較して、ALP 活性が有意に上昇していることを報告している。また、山口ら³⁴⁾は、810 nm の半導体レーザーをヒト間葉系幹細胞に3分間照射すると、無照射のコントロール群と比較して OCN 産生量が有意に増加したことを報告している。さらに Matsui ら^{19,20)}は、歯髄細胞に半導体レーザー (810 nm) を 1.0 W の出力で照射を行うことで、分子シャペロンの一つであり、骨や象牙質の形成に深く関与しているとされている HSP27 の mRNA 発現が一時的に誘導され、硬組織関連タンパク質の発現の増大、ALP 活性の増加及び石灰化結節の形成増大が生ずることを報告している。このことから、各波長のレーザー照射が細胞に作用することによって、ALP 活性が促進し、石灰化物形成を促進させたものと推測できる。

BMP は骨芽細胞の分化、骨の発生、成長、再生に深く関与しており、特に BMP-2 は強力な骨形成促進作用を有するといわれ、MC3T3-E1 細胞に BMP-2 を作用させることで ALP 活性が促進し硬組織形成能が増加したという報告がされている⁶⁾。また BMP-2 は、歯髄における未分化細胞の象牙芽細胞への分化に関与し硬組織形成を促進するものと考えられている⁵⁾ことから、本実験では BMP-2 のタンパク質発現量について検討を行った。結果において、BMP-2 は 660 nm 照射群で発現量の増加が認められることに対し、810 nm 照射群ではコントロール群に比べ、有意な差は認められなかった。Rosa³⁵⁾らは、ラットにおける骨の治癒過程に対する LLLT および recombinant human BMP (rhBMP) -2 の効果について、LLLT は rhBMP-2 を添加した骨欠損の治癒を促進し、LLLT 単独または rhBMP-2 単独よりも相互の利用によって最も骨欠損の治癒を促進したと報告している。この報告からも、半導体レーザーと BMP-2 の発現は硬組織形成に密に関わりがあるということがわかる。しかしながら 660 nm 照射群と 810 nm 照射群においてどちらの照射条件においても最終的な硬組織形成が行われたにもかかわらず、BMP-2 のタンパク質発現量に有意な差が認められたことは、興味深い結果となった。

一方で歯髄は軽度な刺激を受け続けると修復象牙質を形成することから、歯髄におい

て炎症と硬組織形成は密接に関わると考えられている。炎症のケミカルメディエーターである PGE₂ について坂本ら⁴⁾は、ヒト歯髄培養細胞を低濃度 PGE₂ (0.1 μM PGE₂) で刺激すると硬組織形成が促進されるが、高濃度 PGE₂ (1 μM PGE₂) 刺激では硬組織形成が抑制されるという二面性の働きを持つことを報告している。炎症性ケミカルメディエーターにより調整されている BMP は、生理活性物質の中で最も強い骨形成を示す因子の一つと報告され⁵⁾、骨芽細胞の分化、骨の発生、成長、再生に深く関与している。BMP を含む TGF-β スーパーファミリーがレセプターに結合した際の細胞内へのシグナル伝達は主に smad を介して伝えられる。現在まで smad は哺乳類では 8 種類が報告されており、その構造から特異型 smad, 共有型 smad, 抑制型 smad の 3 種類に分類できる。特異型 smad である smad1, 5, 8 のそれぞれが BMP レセプターによりリン酸化され、共有型 smad である smad4 と特異型 smad のいずれかが複合体を形成し、核内へと移行することによりシグナル伝達を行う。抑制型 smad である smad6 と smad7 は特異型 smad のレセプターによるリン酸化に競合、もしくは特異型 smad に結合することによって特異型 smad と共有型 smad の複合体形成を阻害することによってその作用を抑制する。安達らにより¹⁴⁾、1 μM PGE₂ が smad6 の発現を促進し、smad1, 5, 8 のリン酸化を阻害することによって、BMP シグナル伝達を抑制し、硬組織形成を阻害するとの報告がある。また黒木ら³⁶⁾は、ヒト骨芽細胞に tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1β, IL-6 を添加したとき、石灰化抑制作用を及ぼすことを報告している。このように炎症状態の細胞において硬組織形成は抑制されるといえる。臨床において覆髄処置が必要となる歯髄は炎症が起こりやすい状態、もしくはすでに炎症が起こっており、今後もさらなる炎症にさらされる可能性があることを考慮しなければならない。そのため臨床において成功率の高い覆髄法を確立するためには、硬組織を形成すると同時に歯髄の炎症をコントロールすることが必須であると考えられる。

半導体レーザーは、硬組織形成促進効果に加え、抗炎症作用の有用性もまた研究され続けている。Honmura³⁷⁾らはラットの実験的炎症モデルを作製し、炎症領域に半導体レ

レーザーを照射したところ、急性炎症発生中の血管透過性の増加、急性期の浮腫、肉芽腫すべての場合において炎症の 20~30%を阻害したとの報告がある。また Shimizu³⁸⁾らは、低エネルギーレーザー照射によって機械的ストレスを受けた歯根膜細胞からの PGE₂ および IL-1 β 産生を有意に阻害することで抗炎症効果が起こるとの報告をしている。これらの報告から、半導体レーザーの持つ抗炎症作用を利用して、細胞に今後おこる炎症の予防ができるのではないかと考えた。そこで本研究では、同出力条件下における 660 nm または 810 nm の半導体レーザーを照射した hDPC に対して、高濃度 PGE₂ を刺激させ炎症と硬組織形成能の関係について解析した。その結果、PGE₂ 刺激群と PGE₂+660 nm 照射群は他の 2 群に比べて BMP-2 の mRNA 発現量において有意な増加を認めた。さらに、PGE₂ 刺激群は他の 3 群に比べ smad6 の mRNA 発現量において有意な増加が認められ、western blot 法においても PGE₂ 刺激群では smad6 のタンパク質発現が促進され、P-smad1/5/8 のタンパク質発現が抑制された。また、von Kossa 染色から PGE₂ 刺激群では硬組織形成が抑制された。このことから、PGE₂ 刺激によって BMP-2 が増加したが、smad6 の発現も増加したため、その抑制型 smad が smad1/5/8 のリン酸化を阻害したため硬組織形成が抑制されたと推測される。しかし 660 nm+PGE₂ 照射群では PGE₂ 刺激群に比べ、smad6 の発現増加が認められず P-smad1/5/8 の発現増加と硬組織形成の促進を認めた。このことから、660 nm の半導体レーザーを照射することによって smad6 の発現が抑制されたため、P-smad1/5/8 が発現しシグナル伝達が進み硬組織形成まで至ったことが推測される。これに対し、810 nm+PGE₂ 照射群では、BMP の mRNA 発現に関しては PGE₂ 刺激群と比べ有意に減少した。Western blot 法において PGE₂ 刺激群と比べ smad6 の発現が抑制され、P-smad1/5/8 の発現が促進されているものの、660 nm+PGE₂ 照射群の時ほど明確な差は認められなかった。しかし、von Kossa 染色から PGE₂ 刺激群より硬組織形成が促進されていることがわかる。これは、BMP-2 が増加することにより smad1/5/8 のリン酸化が進むという 660 nm+PGE₂ 照射群での硬組織形成の流れとは異なる結果だと言える。

波長による細胞応答の違いについて、Nicolauら^{39,40)}は、マウス神経接合部へレーザー照射を行い、655 nmの可視光レーザーでは何の効果も観測されないが、830 nmの近赤外レーザーではシナプス伝達効率の抑制が認められると報告している。さらに単離したラット肝臓のミトコンドリアに対する様々な波長のレーザー照射を行い、415, 633, 650, 725 nmではATP含有量が増加しているが、477, 511, 554 nmの波長では増加しないという報告がある^{41, 42)}。このように光生物学分野において細胞内に異なる波長吸収スペクトルをもつ光受容体物質が存在すると言われている。これらの報告を踏まえ、hDPCにおいても同様に異なる波長吸収スペクトルをもつ光受容体物質が存在すること、またhDPCにおいて波長により異なる硬組織形成の機序がとられることが推測された。以上より、660 nmの半導体レーザーはsmad6を抑制することによって硬組織形成能を亢進させることが示唆された。また、同出力での810 nmの半導体レーザーではBMP-2とsmad6を介さない別の硬組織形成制御作用に関わることが推測された。

<結論>

出力を一定にした660 nm, 810 nmの異なる波長の半導体レーザーを用いたとき、両者の波長で硬組織形成が促進された。異なる波長による最終的な硬組織形成量の比較に明確な差は得られなかったが、異なる波長の間ではBMP-2の発現量には差が生じた。また660 nmの半導体レーザーはsmad6を抑制することによってPGE₂による硬組織形成抑制作用を打ち消すことが示唆された。また、同出力での810 nmの半導体レーザーではPGE₂による硬組織形成抑制作用を打ち消すものの、BMP-2とsmad6を介さない別の制御機構をとることが推測された。

本論文は, “Effect of Ga-Al-As Laser Irradiation at Wavelengths of 660 or 810 nm with Constant Output on the Ability of Human Dental Pulp to Form Hard Tissue” (International Journal of Oral-Medical Sciences 掲載予定) および“同出力による波長 660 nm と波長 810 nm の半導体レーザー照射がヒト歯髄培養細胞における硬組織形成能に及ぼす影響” (日本歯科保存学会誌 掲載予定) を参考論文とし, まとめ論文としたものである.

<文献>

- 1) Fitzgerald M, Heys RJ. Aclinical and histological evaluation of conservativepulptherapy in human teeth. *Oper Dent* 1991; 16: 101-112.
- 2) Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int End J* 2003; 36: 225-231.
- 3) Linu S, Lekshmi MS, Varunkumar VS, Sam Joseph VG. Treatment Outcome Following Direct Pulp Capping Using Bioceramic Materials in Mature Permanent Teeth with Carious Exposure: A Pilot Retrospective Study. *J Endod* 2017; 43: 1635-1639.
- 4) 坂本真樹, 塩沢督, 松島潔, 山崎宗与. ヒト歯髓細胞における Prostaglandin E₂ の硬組織形成促進. *日歯保存誌* 2003; 46 (3) : 445-450.
- 5) Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration Effect of Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 on Differentiation of Human Pulp Cells Into Odontoblasts. *J Endod* 2004; 30: 205-208.
- 6) Nakase T, Takaoka K, Masuhara K, Shimizu K, Ochi T. Interleukin-1 beta enhances and tumor necrosis factor-alpha inhibits bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 1997; 21 (D) : 17-21.
- 7) Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 8) Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF β signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 188-194.
- 9) Derynck R, Zhang Y, Feng X-H. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 1998; 95: 737-740.
- 10) Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.
- 11) Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Xu YY, Grinell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 1997; 89: 1165-1173.
- 12) Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K. Smad6 inhibits signaling by the TGF- β superfamily. *Nature* 1997; 389: 622-626.
- 13) Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGF- β inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 1997; 389: 631-635.
- 14) Adachi T, Okabe T, Matsushima K. Effects of PGE₂ on Smad Phosphorylation in Human Dental Pulp Cells. *Int J Oral-Med Sci* 2013; 11(4) : 268-273.
- 15) 吉田憲司. LLLT (Low Level Laser Therapy) の新潮流. *日レ歯誌* 2009; 20: 120-123.
- 16) 加藤純二. 一からわかるレーザー歯科治療. *日レ歯誌* 2008; 19: 138-144.
- 17) 湯浅茂平, 松井康太郎, 吉田拓正, 福田貴久, 明石学, 小林一行, 山口博康, 新井高. Er-YAG レーザー照射による歯周および歯内外科処置後の疼痛緩和効果. *日レ歯誌* 2006; 17: 87-92.
- 18) Y. Sakurai, M. Yamaguchi, Y. Abiko. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 29-34.
- 19) Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory Effects of Hydroxyl Radical Generation by Ga-Al-As Laser Irradiation on Mineralization Ability of Human Dental Pulp Cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 27-31.
- 20) Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci* 2008; 50: 75-81.
- 21) Ozawa Y, Snimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *BONE* 1998; 22: 347-354.
- 22) 國松亮, 郡司秀美, 柄優至, 吉見友希, 中島健吾, 谷本幸太郎. ヒト歯髓細胞の代謝に対する低出力半導体レーザー照射の影響. *日レ歯誌* 2015; 26: 1-9.
- 23) Theocharidou A, Bakopoulou A, Kontonasaki E, Papachristou E, Hadjichristou C, Bousnaki M, Theodorou

- G, Papadopoulou L, Kantiranis N. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg-based bioceramic scaffolds under low-level laser treatment. *Lasers Med Sci* 2017; 32 (1) : 201-210.
- 24) 小峯千明, 深井譲滋, 小倉由希, 大塚一聖, 小西賀美, 洪性文, 瀧上真奈, 深津晶, 若見昌信, 村上洋, 辻本恭久, 平山聡司, 松島潔, 福本雅彦. 半導体レーザー単波長照射と2波長同時照射が培養ヒト歯髄由来細胞における硬組織形成能に及ぼす影響. *日大口腔科学* 2016; 42: 80-88.
- 25) Ohshima M, Kuwata F, Otsuka K, Saito R, Sato K, Shioji S, Suzuki K. Alkaline phosphatase activities of culture human periodontal ligament cells. *J Nihon Univ Sch Dent* 1988; 30: 208-217.
- 26) Sallon C, Callebaut I, Boulay I, Fontaine J, Logeart-Avrarmoglou D, Henriquet C, Pugniere M, Cayla X, Monget P, Harichaux G, Labas V, Canepa S, Taragnat C. Thrombospondin-1 (TSP-1), a new bone morphogenetic protein-2 and -4 (BMP-2/4) antagonist identified in pituitary cells. *J Biol Chem* 2017; 292 (37) : 15352-15368.
- 27) Suguru Serita, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Sayuri Hamano, Hideki Sugii, Shinichiro Yoshida, Hiroyuki Mizumachi, Hiromi Mitarai, Satoshi Monnouchi, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda. Transforming growth factor- β -induced gene product-h3 inhibits odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *Archives of Oral Biology* 2017; 78: 135-143.
- 28) Yuwu Liu, Chang Wu, Ying Wang, Sailan Wen, Junpu Wang, Zhihong Chen, Qiongqiong He, Deyun Feng. Loss of plexin-B3 in hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2015; 9: 1247-1252.
- 29) 石田陽子, 小丸圭一, 織田公光. アルカリフォスファターゼ構造と機能. *臨床化学* 2004; 33: 36-44.
- 30) Goseki M, Oida S, Nifuji A, Sasaki S. Properties alkaline phosphatase of the human dental pulp. *J Dent Res* 1990; 69: 909-912.
- 31) Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T. Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int* 2000; 66: 139-144.
- 32) Yokose S, Kadokura H, Tajima N, Hasegawa A, Sakagami H, Fujieda K, Katayama T. Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. *Cell Tissue Res* 2004; 315: 375-384.
- 33) 吉田清司, 弦間豊樹, 大島光宏, 大塚吉兵衛. 培養ヒト歯髄細胞の細胞増殖およびアルカリホスファターゼ活性に低出力半導体レーザーが及ぼす影響について. *日レ歯* 2001; 12: 74-78.
- 34) 山口大, 高野真知, 染井千佳子, 谷本安浩, 和田守康, 葛西一貴. 低出力レーザー照射はCbfa1, Osxを介してヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進する. *再生歯誌* 2010; 8 (1) : 1-9.
- 35) Rosa AP, de Sousa LG, Regalo SC, Issa JP, Barbosa AP, Pitol DL, de Oliveira RH, de Vasconcelos PB, Dias FJ, Chimello DT, Siéssere S. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. *Lasers Med Sci* 2012; 27(5): 971-977.
- 36) 黒木健文, 神宮政男, 延永正, 腰原康子. ヒト骨芽細胞の石灰化に対するサイトカインの抑制作用. *炎症* 1990; 10 (5) : 403-404
- 37) Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med* 1992; 12 (4) : 441-449.
- 38) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 1995 Jul; 74 (7) : 1382-1388.
- 39) Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, Tomas J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. *Lasers Surg Med* 2004; 34 (3) : 277-284.
- 40) Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, Tomas J. Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse. *Lasers Surg Med* 2004; 35 (3) : 236-241.
- 41) Kato M, Shinizawa K, Yoshikawa S. Cytochrome Oxidase is a Possible Photoreceptor in Mitochondria.

Photobiochem Photobiophys 1981; 2: 263-269.

- 42) Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, CatalanoIM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. FEBS Lett 1984; 175: 95-99.

Effects of Ga-Al-As lasers with different wavelengths on hard tissue formation in human dental pulp cells

Joji Fukai

Department of Endodontics

Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key words: Ga-Al-As laser, calcification, prostaglandin E₂, human dental pulp cells

Abstract

Dental pulp preservation greatly affects prognosis in conservation treatment of teeth. Ideally, dental pulp is enveloped with hard tissue, consisting of dentin produced by the pulp itself. Calcium hydroxide preparations and mineral trioxide aggregate (MTA) are direct calcification methods in current clinical use. The direct pulp capping method involves the use of a calcium hydroxide preparation; however, owing to its high alkalinity, this preparation can result in pulp inflammation and formation of a necrotic tissue layer. Therefore, methods resulting in more reliable hard tissue formation are required to protect the pulp. Pulp inflammation promotes hard tissue formation, and reparative dentin is formed. Hence, hard tissue formation from dental pulp is closely related to inflammation.

Numerous studies have attempted to promote hard tissue formation, using Ga-Al-As laser treatment of human dental pulp cells (hDPCs) to develop auxiliary method to direct pulp capping. These studies aimed to investigate the induction of hard tissue formation by the dental pulp with lasers at single or different wavelengths; however, it is difficult to compare their reported effects because of differences in output conditions and/or irradiation duration to promote hard tissue formation. Few studies have investigated which factors associated with hard tissue formation are affected by laser wavelength.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) , a chemical mediator of inflammation, is involved in reparative dentin formation, and stimulation of hDPCs at low or high PGE₂ concentrations promotes or inhibits hard tissue formation, respectively. BMP activity and expression are regulated by inflammatory cytokines and chemical mediators. BMP2 is also involved in the differentiation of stem cells into dentinal blast cells in the pulp and in the acceleration of hard tissue formation. SMAD family proteins contribute to BMP signaling; SMAD1, 5 and 8 are phosphorylated by BMP receptors and promote downstream transcription, while SMAD6 and 7 suppress BMP signaling.

The present study aimed to elucidate the mechanism underlying the induction of hard tissue formation by Ga-Al-As lasers and the difference in hard tissue formation of cells exposed to Ga-Al-As lasers at 660 or 810 nm under the same output conditions, through comparison of ALP activity, calcified nodule staining, bone morphogenetic protein 2 (BMP2) mRNA expression, and hard tissue formation. To study the effect of Ga-Al-As laser irradiation on BMP2 signaling, we focused on their anti-inflammatory effects. We evaluated the ability of hDPCs stimulated with

PGE₂ at the same concentration to generate hard tissue following irradiation with a Ga-Al-As laser at 660 or 810 nm under the same output conditions.

Laser treatment at these two wavelengths did not result in any clear difference in hard tissue formation; however, BMP2 expression differed on irradiation at the two wavelengths. Therefore, we hypothesized that different intracellular pathways are activated at the two wavelengths. We further analyzed BMP signaling in response to laser treatment to test this hypothesis.

Consequently, treatment of hDPCs with semiconductor lasers with the same output indicated that irradiation at 660 nm enhanced their ability to form hard tissue through suppression of SMAD6; however, irradiation at 810 nm enhanced hard tissue formation via a mechanism that did not involve BMP2 and SMAD6.