ヒト歯髄細胞の代謝に対する低出力半導体レーザー照射の影響

國 松 亮 郡 司 秀 美 柄 優 至
吉 見 友 希 中 島 健 吾 谷 本 幸 太 郎

広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門歯科矯正学講座

(受付：2015 年 1 月 27 日，受理：2015 年 3 月 10 日)

Effects of Low-level Diode Laser Treatment on the Metabolism of Human Dental Pulp Cells

Ryo KUNIMATSU, Hidemi GUNJI, Yuji TSUKA

Yuki YOSHIMI, Kengo NAKAJIMA and Kotaro TANIMOTO

Department of Orthodontics and Applied Life Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences

(Received: January 27, 2015, Accepted for Publication: March 10, 2015)

Abstract: Laser irradiation activates a range of cellular processes in a variety of cell types, including stem cells, and can promote tissue repair.

The purpose of this study was to examine the effects of diode laser irradiation on the proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp cells (hDPCs). hDPCs were cultured and exposed to an 810-nm diode laser at a dose of 0 or 1 J/cm². Cell proliferation was evaluated by cell proliferation ELISA BrdU kit and MTS assay. For osteogenic differentiation, hDPCs at confluence were cultured in osteoblastic differentiation medium (ODM), and were irradiated daily with a diode laser. mRNA and protein levels of bone markers were examined by real-time PCR analysis and Western blot analysis, respectively. Alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium concentration were determined. Mineralization was evaluated by Alizarin Red staining. Cell proliferation was enhanced significantly ($P < 0.01$) by treatment with laser irradiation. mRNA levels of ALP, type I collagen and dentin sialoprotein (DSP) in hDPCs treated with laser irradiation became significantly ($P < 0.01$) higher compared with non-treated controls. Treatment of hDPCs with laser irradiation also enhanced significantly ($P < 0.01$) ALP activity and calcium concentration, resulting in enhanced mineralization, as evidenced by the high intensity of Alizarin Red staining.

In conclusion, the present study showed that 810-nm diode laser irradiation may contribute to the regeneration of dental pulp by enhancing hDPC proliferation and differentiation.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 26 : 1 ~ 9, 2015 Reprint requests to Dr. KUNIMATSU)

Key words = Low-level diode laser, Dental pulp cell, Proliferation, Cell differentiation

キーワード = 低出力半導体レーザー，歯髄細胞，細胞増殖，細胞分化

緒 言

幹細胞は様々な細胞へ分化する能力と高い増殖能力を持つため，再生医療への応用が期待されている。そして医科歯科領域で様々な臨床応用が試みられている¹⁻¹⁰⁾。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は，骨髄中の細胞成分の 0.001% ~ 0.01% と微量に存在する未分化の細胞で，細胞増殖能と骨芽細胞，軟骨細胞，神経細胞

および脂肪細胞などへの多分化能を有している。MSCs は，一定未分化に維持した培養が可能であること，さらに骨髄穿刺による細胞の採取法が確立されていることなどの理由から，臨床応用に向けて盛んに研究が進められている。

近年，医科において，心臓をはじめとする臓器や血管，神経に至る幅広い組織に対して，再生治療への応用の検討がなされている¹⁻⁶⁾。歯科領域においても，インプラント周囲の骨再生や，歯周病による骨欠損部修復治療への応用

が数多く報告されている⁷⁻¹⁰⁾。このような背景から、2003年に閉塞性動脈硬化症あるいはバージャー病に対する骨髄細胞移植による血管新生療法が、さらに、2011年には、培養骨髄細胞移植による骨延長術が高度先進医療としてそれぞれ認可されている。しかしながら、骨髄液を採取するためには、骨髄穿刺は避けられず、大きな患者負担となっている。そのため、骨髄液以外の細胞供給源が検索されてきた。

近年、歯髄組織中より MSCs と同様な分化能を持つ歯髄由来未分化間葉系幹細胞 (Dental pulp stem cells; DPSCs) が存在することが明らかとなった¹¹⁻¹³⁾。この DPSCs は *in vitro* によるこれまでの検討により、骨髄由来間葉系幹細胞と比較して高い増殖能を有し、MSCs と同様に多分化能を有することが示唆されている¹⁴⁻²²⁾。また、歯科治療時において従来は廃棄されていた抜去歯を使用できることから、容易に入手できる利点がある。さらに、DPSCs は骨髄幹細胞と比較して低侵襲な方法であり、歯牙硬組織に保護されていることから、外的刺激を受けにくく、遺伝子損傷が少ないと考えられていることから、再生医療への応用が期待されている。現在、幹細胞の未分化性維持や分化誘導を行うために、遺伝子組み換え技術や薬剤添加による方法が検討されているものの臨床応用は達成されていないことが現状であることから、増殖や分化を誘導する技術の新たな開発や確立が望まれている²³⁾。

近年、低出力のレーザー光による生体組織に対する光刺激作用 (Low Level Laser Therapy; LLLT) が注目されている。レーザーは、励起状態にある物質の誘導放射により発生された特定の電磁波であり、その波長により様々な特徴を有するため、近年、医療分野に広く応用されており、その有効性が示唆されてきた。現在、医療分野においては、主に半導体、Nd:YAG, Er:YAG, CO₂ レーザーなどが使用されているが、中でも半導体レーザーは高い生体親和性と、組織浸透性を有するため、損傷治療、疼痛緩和および骨再生などを目的に臨床応用が試みられている。LLLT の効果として、創傷治療促進²⁴⁾、細胞増殖能の亢進²⁵⁾、疼痛緩和作用²⁶⁾および骨形成促進作用²⁷⁾が報告されている。しかしながら、その照射条件や波長によって作用が異なり、報告は様々である。AlGhamdi²⁸⁾らは、細胞増殖能に関して過去の報告を調査したところ、半導体レーザー照射は様々な細胞において、細胞増殖の促進作用があり²⁹⁻³³⁾、その照射条件は、600～900nm の波長で出力密度が 0.5～4J/cm²であったことを報告している²⁸⁾。

近年、660nm の波長を有する半導体レーザー照射により、ヒト培養歯髄細胞の細胞増殖能を亢進させることが報告された^{34, 35)}。また、810nm の半導体レーザー照射がヒト培養歯髄細胞の骨分化に影響を及ぼすことも報告されている³⁶⁾。しかしながら、810nm の半導体レーザー照射が、ヒト培養 DPSCs の細胞増殖および骨分化に対して、経日

的に検討された報告は少なく、細胞の代謝調節機構にどのような影響を与えるのかは明らかにされていない。そこで、低出力半導体レーザー照射がヒト培養歯髄由来間葉系幹細胞の代謝に及ぼす影響について検討することとした。

対象と方法

1. hDPSCs の単離および培養

実験に用いたヒト由来培養 DPSCs は、広島大学歯学部倫理委員会の承認 (臨床研究承認番号-1) を得て、患者および保護者に、十分なインフォームドコンセントを行い、承諾を得た上で、採取・使用した。そして、矯正歯科治療の必要上抜歯された小白歯 (11 検体: 6 名; 男性 3 名, 女性 3 名: 13 歳 11 ヶ月～32 歳 10 ヶ月: 平均年齢 22 歳 6 ヶ月) から、Gronthos らの方法¹¹⁾および Mikami らの方法³⁷⁾に準じて単離した。単離後、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% ペニシリンおよび 1% ストレプトマイシンを含む (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) 中に浸漬し、培養皿に静置し、37℃, 5% CO₂ 存在下で培養を行った。培養開始から 2 日ごとに培地を交換し、80% コンフルエントに到達した時点で、細胞を 0.25% トリプシンおよび 0.1% EDTA を含むリン酸緩衝液 (phosphor buffer saline; PBS) により 5 分間処理して剥離した後、継代培養を行った。実験には、2～5 回継代した細胞を用いた。

2. 照射条件

本研究では、半導体レーザー (Nexus 7W; USA Laser Biotech Inc, Richmond, VA, USA) を使用した。Nexus 7W は、Ga-Al-As の半導体素子を有する半導体レーザー機器であり、組織治療促進および疼痛緩和を目的に使用され、波長 810nm の連続波で、0.7, 1, 1.4 および 2.8 ワットの出力が選択可能である。なお、本研究のレーザー照射条件については、まず、予備実験を行い、至適条件を模索した後、照射条件を決定した。すなわち、培地交換の際に、1 ワットの出力にて、培養皿の基底面からレーザー照射口まで 17mm 離して 10 秒照射し、1 回の照射あたり 1 J/cm² となるように照射を行った (図 1)。

3. 細胞増殖能 (生細胞数) の測定

hDPSCs の細胞増殖能に対する半導体レーザー照射の影響を検討するため、hDPSCs を 6-well plate (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) に、 3×10^4 /well の密度にて播種し、培養開始 1 日目より、レーザー照射を開始し、2 日ごとに培地交換を行うとともに、レーザー照射を行った。実験開始から 1, 3, 5 および 7 日目に、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell proliferation assay Kit (Promega, Madison, MI, USA) を用いて、MTS アッセイ法により評価した (図 2A)。

4. 細胞増殖能 (DNA 合成量) の測定

DNA 合成量に対する半導体レーザー照射の影響を検討するため、hDPSCs を 6-well plate (FALCON) に、 $1 \times 10^3/\text{well}$ の密度にて播種した。60%コンフルエントに到達した後、血清濃度を段階的に下げ、0%とし、レーザー照射を1回行った。照射24時間後に、Cell Proliferation ELISA BrdU kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて評価した (図2A)。

5. 骨分化誘導

レーザー照射が細胞増殖に及ぼす影響を除外し、骨への分化誘導に及ぼす影響について評価するために、細胞がコンフルエンスに到達するまで10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行い、コンフル

エントに到達した後、骨分化誘導培地に変更し、毎日培地交換を行うとともに、レーザー照射を開始した。レーザー照射は、毎日の骨分化誘導培地交換の際に、1ワットの出力にて、培養皿底面よりレーザー照射口より17 mm 離して10秒照射し、1回の照射あたり $1\text{J}/\text{cm}^2$ となるようにレーザー照射を行いながら、 37°C 5% CO_2 条件下にて培養を行った。なお、骨分化誘導培地には、100nM Dexamethasone (Sigma Aldrich), 10 mM β -Glycerophosphate (Sigma Aldrich), 50mg/ml L-ascorbic acid (Sigma Aldrich) および10% FBS (Invitrogen) を含有した DMEM (Sigma Aldrich) を使用した。

6. 定量 PCR 解析

hDPSCs を 6-well plate (FALCON) に、 $2 \times 10^5/\text{well}$ の密度にて播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。その後、コンフルエンスに到達した培養開始3日目より、骨分化誘導培地に変更し、毎日培地交換を行うとともに、前項5と同様の出力条件にて、レーザー照射を開始した。その後、毎日の骨分化誘導培地交換の際にレーザー照射を継続した。培養開始3, 7, 14 および21日目に細胞層より total RNA を抽出し、ReverTraAce (東洋紡, 大阪) および Random primer (東洋紡) を用いて、 $1\mu\text{g}$ の total RNA から cDNA を合成し、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP), type I コラーゲン (Coll-1), デンチンシアロプロテイン (DSP) の発現について、SYBR Green[®] Real-time PCR Master Mix (東洋紡) を用いて、Lyght Cycler[®] 480 II (Roche Diagnostics) により遺伝子発現量を解析

Nexus 7W

図1 本研究で用いた半導体レーザー機器

図2 検討する項目とタイムコース

Target cDNA	Primer sequence
ALP	F:5'-GGGTCAGCTCCACCACAA-3' R:5'-GCATTGGTGTGTACGTCTTG-3'
COL1	F:5'-AGGTGCTGATGGCTCTCCT-3' R:5'-GGACCACTTTCACCCCTTGT-3'
DSP	F:5'-GGGATGTTGGCGATGCA-3' R:5'-CCAGCTACTTGAGGTCCATCTTC-3'
GAPDH	F:5'-CCACTCCTCCACCTTTGA-3' R:5'-CACCACCCGTGTGCTGTA-3'

図3 プライマーの設計

した(図2B)。反応条件は、95℃で15秒の変性反応と55℃で30秒のアニーリング及び72℃で10秒の伸張反応を1サイクルに設定し、45サイクル行った。また、用いたプライマーの設計は図3に示す。

7. Western blot 解析

hDPSCsを6-well plate (FALCON) に、 2×10^5 /wellの密度にて播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。その後、コンフルエンスに到達した培養開始3日目より、骨分化誘導培地に変更し、毎日培地交換を行うとともに、前項5と同様の出力条件にて、レーザー照射を開始した。その後、毎日の骨分化誘導培地交換の際にレーザー照射を継続した。培養開始21日目に細胞層より蛋白質を抽出、電気泳動により分離後、メンブレン上に転写し、1次抗体として抗ALP抗体、抗DSP抗体、抗Coll-1抗体および抗 β -actin抗体を用い、2次抗体として、HRP標識抗体を用いて標識し、検出試薬ECL plus detection reagent (GE Healthcare, Hertfordshire, UK)を用いて化学発光させて、X線フィルムに露光したものを現像した(図2B)。

8. ALP 定量の測定

hDPSCsを6-well plate (FALCON) に、 2×10^5 /wellの密度にて播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。コンフルエンスに到達した培養開始3日目より、骨分化誘導培地に変更し、毎日培地交換を行うとともに、前項5と同様の出力条件にて、レーザー照射を開始した。その後、毎日の骨分化誘導培地交換の際にレーザー照射を継続した。培養開始3, 7, 14および21日目に細胞層より TritonX-100 assay bufferを用いて細胞を回収した。その後、Sonic Vibra Cell (Sonic & Materials Inc, Newtown, CT, USA)で細胞を粉碎した。得られた抽出物を Quantichrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA)を用いて評価した(図2B)。そして、マイクロブ

レートリーダー VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)を用いて、波長405nmにおける吸光度を測定した。

9. Ca 定量の測定

hDPSCsを6-well plate (FALCON) に、 2×10^5 /wellの密度にて播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。その後、コンフルエンスに到達した培養開始3日目より、骨分化誘導培地に変更し、毎日骨分化誘導培地交換を行う際に、前項5と同様の出力条件にて、レーザー照射を行った。培養開始3, 7, 14および21日目にトリス緩衝液にて洗浄し、10%ギ酸を加えて30分抽出し、Ca定量用試料とした。Ca濃度の測定には、カルシウムC-テストワコー(和光純薬工業、大阪)を用いて、マイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices) にて、波長570nmにおける発色産物の吸光度を測定した(図2B)。なお、キットの標準溶液を希釈して作製した標準曲線を用いてCa量を算出した。

10. アリザリンレッド染色

DPSCsを6-well plate (FALCON) に、 2×10^5 /wellの密度にて播種し、10% FBS (Invitrogen) 含有 DMEM (Sigma Aldrich) にて培養を行った。その後、コンフルエンスに到達した培養開始3日目より、骨分化誘導培地に変更し、毎日骨分化誘導培地交換を行う際に、前項5と同様の出力条件にて、レーザー照射を行った。培養開始21日目にトリス緩衝液にて洗浄し、PBSにて細胞層を洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業)にて固定し、1%アリザリン染色液にて処置を行った。染色された細胞層をスキャナーで取り込み、その染色性を比較した(図2B)。さらに、染色性を評価するため、Gregoryらの方法³⁸⁾に準じて定量化を行った。すなわち、10%酢酸および20%エタノール混合液を、各ウェルに300 μ l添加し、室温にて15分間静置した。得られた抽出液を96well-plate (FALCON) に播種し、マイクロプレートリーダー VERSAmax (Molecular Devices)を用いて、波長405nmにおける吸光度を測定した。

11. 統計処理

有意差検定には、Excel統計2010ソフトを用いて、Wilcoxon t-testを用いて、有意水準を $P < 0.05$ あるいは $P < 0.01$ とし、平均の有意差検定を行った。

結 果

【結果1. 半導体レーザー照射が細胞増殖能に及ぼす影響】

MTS assayにおいて、hDPSCsは半導体レーザー照射により、対照群と比較して、培養開始5日目、7日目に生細胞数の有意な増加を示した(図4)。また、BrdU assayを用いた検討では、hDPSCsは半導体レーザー照射により、対照群と比較して、DNA合成量の有意な増加が認められ

図 4 半導体レーザー照射が細胞増殖に及ぼす経日的変化

図 6 半導体レーザー照射が ALP 遺伝子発現に及ぼす経日的変化

図 5 半導体レーザー照射が DNA 合成量に及ぼす影響

た (図 5)。

【結果 2. 半導体レーザー照射による hDPSCs の骨基質産生能の変化】

1) 定量 PCR 解析

定量 PCR 解析において、培養開始 3 日目では、ALP、Coll-1 および DSP の遺伝子発現に有意な変化を認めなかった (図 6, 7 および 8)。その後、骨分化誘導培地に変更するとともに培地交換時にレーザー照射を開始したところ、培養開始 7 日目、14 日目、21 日目いずれにおいても、レーザー照射群では、ALP、Coll-1 および DSP 遺伝子発現量の有意な増加が認められた (図 6, 7 および 8)。

2) Western blot 解析

Western blot 解析において、培養開始 21 日目の ALP、DSP および Coll-1 蛋白質発現は、対照群と比較し、レーザー照射群では著明な増加を認めた (図 9)。

3) ALP 定量の変化

レーザー照射が ALP 産生量に及ぼす経日的な影響につ

図 7 半導体レーザー照射が Coll-1 遺伝子発現に及ぼす経日的変化

図 8 半導体レーザー照射が DSP 遺伝子発現に及ぼす経日的変化

いて、培養開始 7 日目、14 日目、21 日目いずれにおいても、レーザー照射群では、対照群と比較して ALP 量の有意な増加が認められた (図 10)。

4) Ca 定量の変化

レーザー照射が hDPSCs の Ca 沈着に及ぼす影響は、培養開始 3 日目、7 日目、14 日目いずれにおいても、レーザー照射群は、対照群と比較して有意な変化を認めなかったが、培養開始 21 日目では、レーザー照射群により有意

図 9 半導体レーザー照射が骨形成関連蛋白質に及ぼす影響

図 12 半導体レーザー照射が石灰化沈着物に及ぼす経日的変化

図 10 半導体レーザー照射が ALP 量に及ぼす経日的変化

図 11 半導体レーザー照射が Ca 量に及ぼす経日的変化

図 13 半導体レーザー照射が石灰化沈着物に及ぼす影響

考 察

本研究結果では、ヒト培養 DPSCs への 810nm の半導体レーザー照射により、対照群と比較し、培養開始 5 および 7 日目に生細胞数の有意な増加が認められた。また、BrdU 法を用いた細胞増殖能に関連する DNA 合成量の変化の検討においては、レーザー照射 24 時間後に、対照群と比較して有意な亢進が認められた。以上の結果より、810nm の半導体レーザー照射は、ヒト培養 DPSCs の細胞増殖能を増加させることが示された。

骨形成の分化プロセスには、細胞外基質が深く関与しており、コラーゲンと非コラーゲンの両方が含まれている。特に ALP は、初期段階の骨形成に重要な役割を担うことが知られている³⁹⁾。また、DSP は、歯髄組織および象牙質の特異的マーカーとして知られ、硬組織および骨形成に関与する中期から後期段階のマーカーとして報告されている⁴⁰⁾。そのため、本研究は、骨分化段階の異なる骨形成関連遺伝子について着目し、検証を行った。また、最終的な骨分化を評価するためには、骨形成関連遺伝子の変化だけ

な変化が認められた (図 11)。

5) アリザリンレッド染色の変化

培養開始 21 日目のアリザリンレッド染色により、対照群と比較して、レーザー照射群においては、石灰化沈着物を示す赤染が明確に認められた (図 12)。また、アリザリンレッド染色性についての定量評価では、レーザー照射群では、対照群と比較して石灰化沈着物の有意な増加が認められた (図 13)。

ではなく、遺伝子発現後に形成される蛋白質および石灰化沈着物の変化について検討し、これらを総合的に判断する必要がある。このため、本研究では、骨形成関連遺伝子発現の経日的な変化を検討するとともに、ALP および Ca 量の経日的な変化についても検討を行った。さらに、最終的な骨分化を評価するため、培養 21 日目の骨形成関連蛋白質と石灰化沈着物の変化について検討した。その際、細胞増殖の影響を除外するため、コンフルエント到達後、骨分化誘導培地に変更し、毎日培地交換時に 810nm, 1J/cm² の出力条件にて、レーザー照射を行うこととした。

本研究結果では、定量 PCR 解析において、培養開始 3 日目では、ALP, Coll-1 および DSP の遺伝子発現に有意な変化を認めなかった。その後、骨分化誘導培地に変更するとともに培地交換時にレーザー照射を開始したところ、培養開始 7 日目、14 日目、21 日目いずれにおいても、レーザー照射群では、対照群と比較して、細胞外基質である Coll-1 遺伝子発現量の有意な増加が認められた。骨形成の初期段階マーカーである ALP の遺伝子発現は、培養開始 7 日目において、レーザー照射群は、対照群と比較して、約 1.8 倍の ALP 遺伝子発現の亢進が認められた。そして、培養開始 14 日目では、約 2.3 倍の ALP 遺伝子発現量となった。しかしながら、培養開始 21 日目では、有意な増加を認められるものの、ALP 遺伝子発現量は、約 1.6 倍と減少した。一方、後期段階の遺伝子マーカーである DSP の遺伝子発現は、培養開始 21 日目に、レーザー照射群は、対照群と比較して、約 2 倍となり、最大の亢進が認められた。

以上の結果より、培養開始 21 日目における骨形成の分化段階は、初期段階から中期 - 後期段階に移行しているものと推察される。また、培養開始 21 日目における、ALP, DSP, Coll-1 蛋白質発現量および Ca 量の変化は、対照群と比較し、レーザー照射群で著明な増加を認めた (図 9, 11)。以前、我々の研究グループでは、ヒト培養 MSC において骨分化誘導を行い、エナメル蛋白であるアメロゲニン添加が骨分化に及ぼす影響について、経日的な変化について検証を行った⁴¹⁾。Ca 量は、培養 10 日目までは、Ca 量は少なく、アメロゲニン添加により、有意な変化は認められなかったが、骨分化段階の後半となる培養 18 日目から 26 日目に Ca 量が 100 ~ 200ppm と急激に増加し、アメロゲニン添加群は、対照群と比較し、培養 18 日目より有意な増加が認められた。本研究においても同様な変化が認められ、骨分化段階初期の培養 7 日目および 14 日目では、レーザー照射群と対照群と比較して有意な変化が認められなかったが、培養 21 日目に Ca 量の有意な増加が認められた。このように Ca 定量は、骨分化段階の後半に変化が認められるものと推察される。さらに、アリザリンレッド染色により、対照群と比較して、レーザー照射群に

において、石灰化沈着物を示す赤染が明確に認められ、定量化による評価においても有意な増加を認めた (図 12, 13) ことより、810nm の半導体レーザー照射により最終的な骨分化が誘導されることが示唆された。

半導体レーザー照射が細胞の骨分化に及ぼす影響については、様々な条件で検討がなされている。600 ~ 700nm の波長に関する過去の研究は、632nm, 0.43J/cm² および 660nm, 1.3J/cm² の出力条件による半導体レーザー照射により、ヒト骨芽細胞の ALP 量が増加することが報告されている^{42, 43)}。一方、800 ~ 900nm の報告では、Fukuhara らは、905nm, 3.75J/cm² の出力条件による半導体レーザー照射により、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞の石灰化沈着が亢進することを報告している⁴⁴⁾。また、Khrdra らは、ヒト骨芽細胞に対して、830nm, 3J/cm² のレーザー照射により、ALP 量が増加することを報告している⁴⁵⁾。そして、ヒト歯髄細胞に対して、810nm, 7.6J/cm² の出力条件にて半導体レーザー照射を行ったところ、レーザー照射により BMP-2, BMP-4 および ALP 量の増加が認められ、培養 28 日目には、石灰化沈着物が有意に増加することが報告されている³⁶⁾。本研究結果では 1J /cm² とエネルギー少ないものの、骨分化が促進された。この理由として、骨分化誘導培地を用いて、毎日培地交換時にレーザー照射を行ったことが関与しているものと考えられる。

レーザーの透過性は、そのレーザー特有の光波長と照射体に存在する発色団の分布、またレーザーの出力数で異なる。発色団には、水分、ヘモグロビン、核酸、蛋白質などがある。Er:YAG レーザーは主な発色団が水であるため、生体組織の 70% が水で構成されていることから、表面で吸収される。一方、Nd:YAG レーザーおよび半導体レーザーは、水が高効率の発色団ではないため、組織透過性を示し、歯や硬組織においてもわずかな水分などによって軟組織と同じような傾向を示す⁴⁶⁾。Marshall らは、半導体レーザーにおいて 550nm よりも 750nm の波長のほうが、生体組織浸透性が高く、特に 800 ~ 900nm 付近の波長は、非常に組織浸透性が良いと報告している⁴⁷⁾。以上の背景より、今後は、各波長のレーザーを用いて、細胞および照射距離を同一の出力条件にし、*in vitro* 系検討を行うことで培養細胞における最適な条件を検討する必要がある。また、各波長のレーザー照射の生体内透過性および組織・修復再生の最適な条件について *in vivo* による検証を行う必要があると考えられる。

本研究では、Gronthos¹¹⁾ および Mikami ら³⁷⁾ の通法に準じて、hDPSCs の単離を試みた。Gronthos, Shi および Nakashima らはヒト歯髄組織より得られた歯髄細胞を培養し、ラット皮下に移植する実験から歯髄幹細胞の存在を示している⁴⁸⁻⁵⁰⁾。さらに、ラット歯髄細胞をヌードマウス皮下に移植したところ、骨様組織、骨髄様組織および脂肪

様組織が形成されることを確認し、歯髄細胞中に様々な組織に分化可能な幹細胞が存在することも報告されている⁵¹⁾。本研究で用いたヒト培養歯髄細胞は、高い骨分化能を有するものの、多分化能についての検証および細胞集団に関する検討は行っていない。近年、単離したMSCsの品質検査のため、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析がなされている。MSCsの特異的な細胞表面抗原の発現については、CD44, CD73, CD90が間葉系細胞マーカーとされ、CD105, CD146, STRO1は幹細胞マーカーであると報告されている³⁷⁾。一方でCD14, CD34, CD45などが血球系マーカーであることが示唆されている³⁷⁾。今後は、得られたヒト培養歯髄細胞が軟骨・脂肪などへ分化するかどうか更なる検討を行うとともに、フローサイトメトリーによる細胞表面抗原の解析を行う予定である。

LLLTTに関するシグナル伝達経路やメカニズムに関しては、まだ詳細な解明はなされていないものの、細胞増殖および分化にPDGF- α ⁵²⁾, TGF- β ^{53, 54)}, IGF-1^{53, 55)}およびBMP-2⁵⁶⁾などの成長因子が関与していることが報告されている。近年、LLLTT (830nm) は、骨芽細胞において、IGF-1およびBMPの発現やERKのリン酸化を亢進させることにより骨形成関連遺伝子であるRunx 2の発現が増加し、骨分化を誘導させることが報告された^{57, 58)}。

これらの報告は、LLLTTは、骨芽細胞において、IGF-1およびBMP-2シグナル伝達経路を介して、細胞増殖の促進や骨分化を誘導することが予想される。今後は、hDP-SCsにおける細胞増殖および骨分化について、詳細なシグナル伝達経路の解明を行う予定である。

結 語

本研究により、810nm (1J/cm²) の半導体レーザー照射は、ヒト培養歯髄細胞の細胞増殖能および石灰化能を亢進させることが明らかとなった。このことから、低出力半導体レーザー照射を応用した組織再生の可能性が強く示唆された。

謝 辞

本研究は、科学研究費(若手研究(B) 研究課題番号: 25862016)、平成26年度新産業創出研究費および広島大学病院臨床研究助成金により、研究が行われた。また、本研究を遂行するにあたり、御助言および協力を賜りましたカリフォルニア大学サンフランシスコ校Orofacial Science講座のPamela Denbesten教授およびThuan Le講師に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Imanishi Y, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, et al: Impact of synovial membrane-derived stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *J Artif Organs*, 12 : 187-193, 2009.
- 2) 大串 始, 川手健次: 骨関節疾患への自己(患者由来)間葉

- 系幹細胞を用いた治療-間葉系幹細胞の血管再生能とそれを使用した骨壊死治療技術開発. *医学のあゆみ*, 229 : 813-817, 2009.
- 3) 永谷憲歳: 間葉系幹細胞を用いた心血管再生療法. *心電図*, 28 : 328-332, 2008.
- 4) Laco F, Kun M, Weber HJ, et al: The dose effect of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on epidermal development in organotypic co-culture. *J Dermatol Sci*, 55 : 150-160, 2009.
- 5) 亀井直輔, 田中信弘, 越智光夫, 他: 骨髄間葉系幹細胞移植による脊髄軸索再生. *脊髄機能診断学*, 28 : 41-46, 2007.
- 6) 林裕二郎, 西田 勉, 河野 淳, 他: 間葉系幹細胞は胃潰瘍治療を促進する. *潰瘍*, 34 : 42-44, 2007.
- 7) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al: Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 75 : 1281-1287, 2004.
- 8) 竹沢保政, 土井 豊, 柴田俊一, 他: 自己硬化型アパタイトセメント. *J Oral Biol*, 31, 240-247, 1989.
- 9) 若月達也: 顎骨欠損部へのHydroxyapatite (HAP) 移植後の治癒過程に関する実験的研究-多孔性HAPと緻密性HAPとの比較について. *歯科学報*, 85 : 931-952, 1985.
- 10) Kubo T, Doi K, Hayashi K, et al: Comparative evaluation of bone regeneration using spherical and irregularly shaped granules of interconnected porous hydroxylapatite-A beagle dog study. *J Prosthodont Res*, 55 : 104-109, 2011.
- 11) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 : 13625-13630, 2000.
- 12) Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 : 5807-5812, 2003.
- 13) Karbanová J, Soukup T, Suchánek J, et al: Osteogenic differentiation of human dental-pulp-derived stem cells under various ex-vivo culture conditions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 53 : 79-84, 2010.
- 14) Unda FJ, Martin A, Hilario E, et al: Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGF- β . *Dev Dyn*, 218 : 480-489, 2010.
- 15) Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, et al: Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol*, 37 : 1045-1055, 1992.
- 16) Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, et al: Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif Tissue Int*, 66 : 139-144, 2000.
- 17) Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81 : 531-535, 2002.
- 18) Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, et al: Dental pulp cells provide urotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*, 19 : 2388-2398, 2004.
- 19) Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, et al: Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells*, 25 : 78-87, 2007.
- 20) Wei X, Ling J, Wu L, et al: Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*, 33 : 703-708, 2007.
- 21) Graziano A, d'Aquino R, Laino G, et al: Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*, 4 : 21-26, 2008.
- 22) Arthur A, Rychkov G, Shi S, et al: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26 :

- 1787-1795, 2008.
- 23) 櫛引俊宏：レーザー光照射が骨髄間葉系幹細胞の骨分化におよぼす影響。日レ歯誌, 21 : 185-191, 2010.
- 24) Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, et al: Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. *J Athl Train*, 39 : 223-229, 2009.
- 25) Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, et al: Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*, 29 : 179-184, 2001.
- 26) Chow RT, Heller GZ, Barnsley L: The effect of 300 mW, 830nm laser on chronic neck pain: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Pain*, 124 : 201-210, 2006.
- 27) Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, et al: Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97 : 693-700, 2004.
- 28) AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA, et al: Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*, 27 : 237-249, 2012.
- 29) Schindl A, Merwald H, Schindl L, et al: Direct stimulatory effect of low-intensity 670-nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br J Dermatol*, 148 : 334-336, 2003.
- 30) Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, et al: Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*, 28 : 355-364, 2001.
- 31) Almeida-Lopes L, Rigau J, et al: Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*, 29 : 179-184, 2001.
- 32) Li WT, Leu YC, Wu JL: Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg*, 28 : 157-165, 2010.
- 33) Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, et al: Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*, 30 : 353-358, 2003.
- 34) Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, et al: Stem cell proliferation under low-intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*, 40 : 433-438, 2008.
- 35) Holder MJ, Milward MR, Palin WM, et al: Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res*, 91 : 961-966, 2012.
- 36) 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*, 30 : 27-31, 2007.
- 37) Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, et al: Honda MJ: CD271/p75 (NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev*, 20 : 901-913, 2011.
- 38) Gregory CA, Gunn WG, Peister DJ: An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, 329 : 77-84, 2004.
- 39) Zhu JX, Sasano I, Takahashi I, et al: Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J*, 33 : 25-35, 2001.
- 40) Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, et al: Dentin sialoprophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*, 57 : 1165-1175, 2012.
- 41) Tanimoto K, Huang YC, Kunimatsu R, et al: Amelogenin enhances the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 196 : 411-419, 2012.
- 42) Stein E, Koehn J, Sutter W, et al: Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wiener klinische Wochenschrift*, 120 : 112-117, 2008.
- 43) Bloise N, Ceccarelli G, Minzioni P, et al: Investigation of low-level laser therapy potentiality on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors. *J Biomed Optics*, 18 : 128006, 2013.
- 44) Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, et al: Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 79 : 443-450, 2006.
- 45) Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, et al: Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*, 26 : 3503-3509, 2005.
- 46) 加藤純二, 栗津邦男, 宮崎英隆, 他：一から分かるレーザー歯科治療。医歯薬出版, 3-5, 2003.
- 47) Marshall J, Haywood JK: The biological nature of the hazard. *The Institute of Physical Science in Medicine*, 1-7, 1987.
- 48) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al: Post-natal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 97 : 625-630, 2000.
- 49) Shi S, Robey PG, Gronthos S: Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*, 29 : 532-539, 2001.
- 50) Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, et al: Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Ther*, 9 : 814-818, 2002.
- 51) 森戸亮行, 五味一博, 鈴木一範, 他：歯髄細胞の多分化能。日歯保存誌, 48 : 859-863, 2005.
- 52) Baron W, Metz B, Bansal R, et al: PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol Cell Neurosci*, 15 : 314-329, 2000.
- 53) Wildemann B, Schmidmaier G, Ordel S, et al: Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 65 : 150-156, 2003.
- 54) Huang X, Lee C: Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF-beta. *Front Biosci*, 8 : 740-749, 2003.
- 55) Jin DM, Chen LL, Yan J, et al: Effects of IGF-I and BMP-2 combined application on promoting proliferation, differentiation and calcification of MC 3T3-E1 and NIH 3T3 cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 35 : 55-63, 2006.
- 56) Moore NM, Lin NJ, Gallant ND, et al: Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients. *Acta Biomater*, 7 : 2091-2100, 2011.
- 57) Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, et al: Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med*, 42 : 519-526, 2010.
- 58) Kiyosaki T, Mitsui N, Suzuki N, et al: Low level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx 2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomed Laser Surg*, 28 : 167-172, 2010.