

論 文 内 容 要 旨

Oxidative stress impairs the calcification ability of
human dental pulp cells

(酸化ストレスはヒト歯髄細胞の
石灰化能を低下させる)

BMC Oral Health, 22(1):437,2022.

主指導教員：柴 秀樹 教授

(医系科学研究科 歯髄生物学)

副指導教員：寺山 隆司 教授

(医系科学研究科 顎顔面解剖学)

副指導教員：太田 耕司 教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

白輪地 聡美

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

1. 緒言

歯の内部吸収は、歯髄側から象牙質が吸収される稀な疾患で、その病態は未だ十分に明らかにされていない。間葉系細胞が形成する骨組織と象牙質は組成において共通する部分が多いが、骨組織が絶えずリモデリングによって吸収・再形成を繰り返しているのに対し、象牙質は形成された後には、ほとんど吸収されることはない。この相違点について、近年の研究では、歯髄細胞は破歯細胞の形成を抑制する能力を生来備えており、象牙質吸収のない恒常性の維持に関与しているのではないかと推察されている。

酸化ストレスは、細胞内に過剰な活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)が発生することで起こる反応のことである。過酸化水素は主要な ROS の1つであり、代謝調節やストレス応答においてセカンドメッセンジャーとして機能する。これまで、酸化ストレスが歯髄細胞に及ぼす影響については、様々な検討が行われている。ある研究では、一定数の細胞死を誘導する濃度の過酸化水素水が、歯髄細胞の石灰化能を阻害するとしている。一方で、低濃度の過酸化水素水による極短時間の刺激では歯髄細胞のオステオポンチン、オステオカルシンの遺伝子発現が上昇するという報告もあり、さらなる検討が必要である。

歯の内部吸収と酸化ストレスの関係については未だ明らかにされていない。本研究では、歯髄細胞の損傷が内部吸収の惹起に密接に関わっていると仮説し、内部吸収のメカニズム解明の一助となるべく、酸化ストレスと歯髄細胞の石灰化能の関係性について検討した。

2. 材料と方法

- 1) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の生存率に及ぼす影響：培養ヒト歯髄細胞 (Lonza) をプレートに播種し、10%FBS 存在下 α -MEM で 24 時間培養した。無血清培地に置換した上で、種々の濃度の過酸化水素水(0, 100, 250, 500, 1000 μ M)で 24 時間刺激した後、WST 法で生存率を評価した。
- 2) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の細胞内 ROS に及ぼす影響：ヒト歯髄細胞をプレートに播種し、10%FBS 存在下 α -MEM で 24 時間培養した。無血清培地に置換し、細胞膜透過性プローブ DCFH-DA を加えて 1 時間培養した後、過酸化水素水 100 μ M で 2 時間刺激し、蛍光顕微鏡で観察した。
- 3) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の石灰化能に及ぼす影響：ヒト歯髄細胞をプレートに播種し、10%FBS 存在下 α -MEM で培養し、サブコンフルエントとなった状態で無血清培地に変更し、過酸化水素水 100 μ M で 6 時間刺激した。その後、石灰化誘導培地に置換し、7 日間培養した。培養終了後、アルカリフォスファターゼ(ALP) 活性を ALP 染色で、ALP の遺伝子発現を培養細胞のライセートから total RNA 抽出後、RT-qPCR 法で調べた。また、同様の手順で歯髄細胞を刺激し、石灰化誘導培地に置換した後 28 日間培養し、石灰化結節の沈着をアリザリンレッド染色で評価した。

2-アミノエチルジフェニルボラート(2-APB)は IP3 受容体の膜透過性阻害剤とし

て見出され、ストア作動性カルシウム流入 (store-operated calcium entry: SOCE) 機構の阻害剤としても使用されている。そこで、上記の培養系に過酸化水素水刺激の 1 時間前に 10 μM の APB を加え、同様に評価した。

3. 結果

- 1) ヒト歯髄細胞は過酸化水素水(50, 100, 250, 500, 1000 μM)存在下で 24 時間培養したところ、高濃度過酸化水素水処置群(250, 500, 1000 μM)では著明な細胞死に陥った。一方で、50, 100 μM の過酸化水素水処理は細胞生存率を低下させなかった。
- 2) 細胞膜透過性プローブを用いて細胞内 ROS を調べたところ、100 μM の過酸化水素水処理した歯髄細胞では対照群に比べて優位に細胞内 ROS が上昇していることが確認された。以上のことから、本研究では酸化ストレスの誘導剤として 100 μM の過酸化水素水を使用することにした。また、IP₃ 受容体の膜透過性阻害剤である 2-APB 10 μM を前処置した群では、過酸化水素水によって誘導される細胞内 ROS 産生が抑制されていた。
- 3) 歯髄細胞を 100 μM の過酸化水素水で刺激した後、石灰化誘導培地を用いて 7 日間培養したところ、対照群と比較して優位に ALP 活性が低下した。ALP mRNA の遺伝子発現も過酸化水素水処置群で著しく低下していた。2-APB 10 μM を前処置した群では、過酸化水素水による ALP mRNA 遺伝子発現および ALP 活性の低下が抑制された。また、歯髄細胞を 100 μM の過酸化水素水で刺激した後、石灰化誘導培地を用いて 28 日間培養したところ、対照群と比較して優位に石灰化結節の沈着が抑制されていた。2-APB 10 μM を前処置した群では、過酸化水素水による石灰化結節沈着の抑制が回復された。

4. 考察

本研究によって、過酸化水素水刺激による酸化ストレスがヒト歯髄細胞の石灰化能を低下させ、その低下に IP₃ シグナル関与の可能性が示唆された。本研究の結果は、歯の内部吸収機序解明のための有用な新知見であり、歯の内部吸収治療薬の開発の手がかりとなる。