

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11115

研究課題名(和文) 歯髄炎における炎症・抗炎症バランス制御機構の解析とTh17細胞の役割

研究課題名(英文) Analysis of mechanism for pro-inflammatory and anti-inflammatory balance and role of Th17 cells in pulpitis

研究代表者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：00217770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯髄炎の病態形成におけるTh17細胞の役割を解明することを目的とし、象牙芽細胞様細胞として樹立されたラットKN-3細胞に対し、Th17細胞から産生されるインターロイキン(IL)-17の影響について、Th17細胞関連ケモカインであるCCL20発現状況より検討した。その結果、炎症性サイトカインであるIL-1刺激によりKN-3細胞において産生が上昇したCCL20をIL-17が増強させること、IL-1とIL-17による共刺激により細胞内シグナル因子MAPKsのリン酸化が亢進されること、代表的カテキンであるエピガロカテキンガレートがKN-3細胞におけるCCL20産生を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of Th17 cells in the pathogenesis of pulpitis, and thus we examined the effect of interleukin(IL)-17 on CCL20 production from KN-3 cells established as rat odontoblast-like cells. IL-17 increased CCL-20 production from KN-3 cells exposed to IL-1. The treatment of IL-17 also enhanced the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in IL-1 stimulated KN-3 cells. Moreover, epigallocatechin-3 gallate, a representative type of catechins, reduced CCL20 production from activated KN-3 cells.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄炎 象牙芽細胞 Th17

1. 研究開始当初の背景

臨床において、歯髄保存の適否を正確かつ客観的に診断することは容易ではない。近年の潮流として、可及的な歯髄温存の重要性が提唱されてきており、歯髄炎の可逆・不可逆の境界を明確にすることは、歯科臨床における重要課題の一つといえよう。われわれは、この課題を解決するためには、歯髄炎の病態形成を理解することが必要であるとの認識から、これまでに歯髄炎における細菌感染や炎症性細胞浸潤の実態について研究をすすめてきた。興味深いことに臨床的に不可逆性歯髄炎と診断された歯髄組織において、炎症性細胞浸潤に關与するケモカイン - ケモカインレセプターのうち、CCL20-CCR6系が作動していることを明らかにしてきた。CCR6発現はTh17マーカーの一つと位置づけられていることから、Th17細胞が歯髄炎の病態形成に關与している可能性が考えられるが、その役割については不明な部分も多く、特に歯髄の最外側に位置し外来刺激に対する最初の防御線となる象牙芽細胞との關係については明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄炎の病態形成における炎症・抗炎症バランスに対するTh17細胞の役割を解明することを目的とし、Th17細胞から産生されるサイトカインであるインターロイキン(IL)-17が歯髄炎組織に存在しているかどうか、さらに象牙芽細胞に対するIL-17の影響について、Th17細胞関連ケモカインであるCCL20や象牙質形成に關連するタンパクの発現より検討した。

3. 研究の方法

(1) 歯髄組織におけるIL-17発現:

臨床的に不可逆性歯髄炎と診断された炎症歯髄組織を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋したのち薄切組織切片を作製した。対照として、矯正治療目的に抜去された便宜抜去歯より得られた歯髄を正常歯髄とした。ヘマトキシリンエオジン染色にて炎症の程度を把握したのち、IL-17に対する特異抗体を用いた免疫組織学的手法により、IL-17の発現や局在について検討した。

(2) 炎症性サイトカインおよびTh17サイトカインに対する象牙芽細胞の反応性:

象牙芽細胞様細胞として樹立されたラットKN-3細胞を用いて、炎症性サイトカインであるIL-1ならびにTh17サイトカインであるIL-17をKN-3細胞に作用させたときのCCL20産生をELISA法にて検討した。また、象牙質形成關連タンパクであるdentin sialophosphoprotein (DSP)の発現について検討を加えた。

(3) Th17サイトカイン刺激をうけた象牙芽細胞における細胞内シグナル因子の解析:

KN-3細胞に対し、IL-1とIL-17による共刺激を行ったときの細胞内シグナル因子; mitogen-activated protein kinases (MAPKs) シグナル経路やnuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル経路の活性化について、特異抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析し、単独刺激の場合と比較検討した。

(4) 活性化された象牙芽細胞に対するカテキンの影響:

エピガロカテキンガレート (EGCG) に代表

されるカテキンは様々な生理活性を有することが知られているが、今回カテキンの抗炎症作用に着目し、EGCGを用いてKN-3細胞の前処理を行ったのち、IL-1とIL-17を作用させたときのCCL20産生をELISA法にて検討し、EGCG処理を行わない場合と比較することでEGCGの影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 歯髄組織におけるIL-17発現について、免疫組織化学を用いて検討したところ、炎症歯髄組織では炎症性細胞浸潤が認められる部位にIL-17陽性像を認めた。一方、正常歯髄ではIL-17はほとんど認めなかった。

(2) IL-17ならびにIL-1をKN-3細胞に作用させたときのCCL20産生をELISA法にて検討したところ、IL-17のみ作用させたときのKN-3細胞からはCCL20の産生はほとんど認められなかった。一方、IL-1はKN-3細胞におけるCCL20産生をIL-1濃度依存的に上昇させた。さらに、IL-1とIL-17を共刺激させたところ、相乗的にCCL20産生を増強させることが示された。また、KN-3細胞にこれらのサイトカインを作用させたときのDSP発現については、有意な変化は認めなかった。

(3) IL-1にてKN-3細胞を刺激したときの細胞内シグナルのリン酸化をウエスタンブロット法にて解析したところ、MAPKsシグナル経路におけるERK, SAPK/JNK, p38MAPKのリン酸化ならびにNF- κ Bシグナル経路におけるI κ B α のリン酸化が亢進されていることが確認された。また、上記の細胞内シグナル因子に対するインヒビターを用いたときの

CCL20産生をELISA法にて検討したところ、CCL20産生がインヒビターにより抑制されていることが確認され、これらのシグナル因子がCCL20産生に関与していることが示された。さらに、KN-3細胞に対しIL-1とIL-17による共刺激を行ったときの細胞内シグナル因子のリン酸化を解析し、IL-1単独の場合と比較した。その結果、ERKならびにp38MAPKのリン酸化が亢進されていることが示された。

(4) IL-1とIL-17により活性化増強されたKN-3細胞に対するカテキンの反応性について検討した。その結果、代表的なカテキンであるEGCGは、KN-3細胞におけるCCL20産生をEGCG濃度依存的に抑制することが示された。

以上の結果より、IL-17は歯髄炎病巣局所に存在し、炎症性サイトカインにてCCL20産生を誘導された象牙芽細胞様細胞に対しIL-17はその反応性を増強させることが明らかとなり、歯髄炎の病態形成におけるケモカイン産生調節や細胞浸潤にIL-17が関与している可能性が示唆された。また、KN-3細胞からのCCL20産生がEGCGにより抑制されたことから、カテキンの抗炎症作用を期待して深在う蝕部に応用するような新規歯髄保存療法に結び付く可能性が示唆された。

これらの成果は、歯髄炎の病態形成におけるTh17細胞の役割、特に象牙芽細胞との関係について、その一端を明らかにできたものと考えている。今後は、今回の研究期間で明らかにできなかった石灰化機構への影響や他のエフェクター細胞から産生されるサイトカインとの関連性について追究していきたいと考えている。

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2件)

平尾 功治, 湯本 浩通, 細川 由樹, 蔵本 瞳, 鷺尾 絢子, 中西 正, 武川 大輔, 北村 知昭, 松尾 敬志. ラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) におけるカテキンの抗炎症作用. 日本歯科保存学雑誌 60, 235 - 244, 2017年 (査読有)

DOI : 10.11471/shikahozon. 60. 235

Hosokawa Y, Hirao K, Yumoto H, Washio A, Nakanishi T, Takegawa D, Kitamura C, Matsuo T. Functional roles of NOD1 in odontoblasts on dental pulp innate immunity. BioMed Research International 2016, Article ID 9325436, 11 pages, 2016年 (査読有)

DOI : 10.1155/2016/9325436

[学会発表](計2件)

Nakanishi T, Takegawa D, Hirao K, Yumoto H, Hosokawa Y, Matsuo T. Effect of interleukin-17A on CCL20 production from odontoblast-like cells, 95th General Session and Exhibition of the IADR, 2017年3月24日, サンフランシスコ (アメリカ合衆国)

中西 正, 武川 大輔, 平尾 功治, 湯本 浩通, 細川 由樹, 松尾 敬志. Interleukin-17 がラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) の CCL20 産生に及ぼす影響, 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第143回), 2015年11月13日, 文京シビックホール (東京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号 : 00217770

(2)研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号 : 60284303

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)

徳島大学・病院・講師
研究者番号 : 90346601