

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11131

研究課題名(和文) 歯髄におけるPAR-1活性化カスケードによるCOX-2産生相互ネットワークの解明

研究課題名(英文) Synergistic network on COX-2 production by PAR-1 activation cascade in pulp

研究代表者

神尾 直人 (KAMIO, Naoto)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10508774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト歯髄培養細胞におけるカリクレインのPAR-1活性化と、カリクレインとプラスミンおよびブラジキニンとの相互ネットワークを介したCOX-2産生のメカニズムを解明することである。カリクレインは、COX-2 mRNAの発現を濃度-時間依存的に増加させた。カリクレインはCOX-2タンパク質の産生を促進し、この効果はPAR-1阻害剤によって抑制された。プラスミン・カリクレイン・ブラジキニンによる相互作用の探索では、細胞内Ca²⁺濃度測定ではその効果は確認されなかった。しかし、カリクレインとブラジキニンの刺激は、単独で刺激された場合と比較してCOX-2タンパク質の発現を増強した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the mechanism of COX-2 production via PAR-1 activation by kallikrein in human dental pulp cultured cells, and the interaction network of kallikrein and plasmin and bradykinin. Kallikrein increased the expression of COX-2 mRNA in a concentration- and time-dependent manner. Kallikrein promoted the production of COX-2 protein, and this effect was suppressed by PAR-1 inhibitor. In the search for the interaction by plasmin & middot; kallikrein & middot; bradykinin, the effect was not confirmed by intracellular Ca²⁺ concentration measurement. However, the stimulation of kallikrein and bradykinin enhanced the expression of COX-2 protein compared to when stimulated alone.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヒト歯髄細胞 カリクレイン PAR-1 COX-2 炎症

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は閉塞された歯髄腔内での炎症の為、容易に血流障害と梗塞を引き起こす。また、他の組織同様に炎症性サイトカインやプロテアーゼにより、歯髄線維芽細胞や細胞外基質の破壊が生じ、ひいては不可逆的な経過をたどる。歯髄の有無が歯の寿命そのものに関与する以上、歯髄炎予防を含めた歯髄の保存的治療法の確立は臨床上急務な課題である。

プラスミンはプラスミノゲンから PA によって変換され、細胞外基質成分の破壊に関与するセリンプロテアーゼである。申請者はこれまでに炎症性サイトカインがヒト歯髄培養細胞においてチロシンのリン酸化や Protein kinase C (PKC) の調節を介してウロキナーゼ型 PA (uPA) の分泌を促進することを明らかにした。またプラスミンは基質破壊だけでなく細胞膜上の Protease activated receptor (PAR)-1 を活性化することで細胞内シグナル伝達に関与し、PGE₂ の遊離や IL-8 の発現に関与することを報告し、この PA/プラスミンの連鎖的な炎症カスケードが不可逆的な経過をたどりやすい歯髄炎における歯髄特有の炎症メカニズムの一端ではないかと推察した。一方、歯周炎モデルラットで炎症から上皮化までの治癒過程において PA の局在が経時的に変化する報告や、ヒト歯髄において MMP-3 が Connective tissue growth factor/CCN family 2 の発現を促進し細胞遊走を促進する報告などプロテアーゼの基質破壊以外の作用、すなわち治癒に関する報告も多く、炎症による破壊と創傷治癒という一見対局した場面をスムーズに移行できるようにプロテアーゼの産生量は調節されていると考えられる。また、当研究室では歯髄において低濃度 PGE₂ はむしろ石灰化物形成能を促進するという報告をしており、プロテアーゼやプロスタノイドの適切で適度なコントロールが歯髄保存的治療法の確立には不可

欠であるといえる。申請者は上記に続きプラスミンの PGE₂ 産生機序について詳細に検討し、シグナル伝達過程において calcineurin の活性化による転写因子 NFATc1 の脱リン酸化を介して COX-2 の発現を促進することまで解明した。

次に申請者は PA とともにプラスミンの産生に関与するカリクレインに着目した。PAR-1 はプラスミン以外にもトロンピン、カテプシン G など様々なプロテアーゼで切断・活性化を受け細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させる報告があり、プラスミンと同じセリンプロテアーゼであるカリクレインにもその可能性があると考えた。結果としてカリクレインはヒト歯髄培養細胞で $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させること、その上昇機構に PAR-1 を介することを明らかにした。カリクレインはキニノゲンを限定分解して生理活性ペプチドであるブラジキニンなどのキニンを産生することは周知のごとくであるが、ブラジキニンもまた受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、COX-2 の発現を促進する。すなわちカリクレイン/プラスミンの PAR-1 活性化カスケードによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、カリクレイン/キニン系による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はいずれも COX-2 産生シグナルに関与し、さらには密接な相互ネットワークを形成している可能性がある。

2. 研究の目的

これまでにヒト歯髄培養細胞でカリクレインが作用 30 分で COX-2 mRNA 発現を増強するところまで確認しているが、これらの相互的な作用やフィードバック機構は不明である。またこれらの炎症シグナルの解明が歯髄で特に重要視すべきと考える理由として、現在行われる歯髄保存療法の多くに水酸化カルシウム製剤を用いる点にある。炎症歯髄近傍に存在する Ca^{2+} が COX-2 産生シグナルに重要な細胞外 Ca^{2+} の流入に寄与している可能性は否定できず、新規創薬にはこの点を見

逃すことはできない。よって本研究では以下のことに焦点を当て、検討する。

1) カリクレインによる COX-2 産生シグナルの詳細な解明

2) プラスミン・カリクレイン・ブラジキニンによる相互作用の可能性の検索

3) $[Ca^{2+}]_i$ の上昇機構の詳細な検索

3. 研究の方法

1) カリクレインによる COX-2 産生シグナルの詳細な解明

COX-2 の mRNA 発現、タンパク質産生についてをまず詳細に検討した。またシグナル伝達経路における calcineurin の関与をリアルタイム PCR 法、Western Blot 法にて検討する。さらに、NFATc1 の局在位置の変化を過去に Western Blot 法で核内・核外タンパク質画分で分けて報告したが、本申請では転写活性測定キットによって検討した。

2) プラスミン・カリクレイン・ブラジキニンによる相互作用の可能性の検索

$[Ca^{2+}]_i$ 動態と炎症反応の惹起には密接な関係があるといえる。よって本研究ではカリクレイン/プラスミン/ブラジキニンによる Ca^{2+} -calcineurin-NFATc1 シグナリングにおける相互ネットワークの存在について、 $[Ca^{2+}]_i$ 動態、COX-2 mRNA・タンパク質発現、PGE₂ 産生量をそれぞれ検討した。

3) $[Ca^{2+}]_i$ の上昇機構の詳細な検索
は Ca^{2+} イオンチャネル阻害剤である SKF96365 作用下でのカリクレイン/プラスミン/ブラジキニンによる $[Ca^{2+}]_i$ の動向を検索した。

4. 研究成果

リアルタイム PCR 法にてカリクレインは COX-2 mRNA の発現を濃度依存的、時間依存的に上昇させることを確認した。つぎにウェスタンブロット法にてタンパク質発現についても検討し、カリクレインによる COX-2

タンパク質発現の促進を確認した。またいずれも PAR-1 阻害剤により効果は抑制された。さらに培養上清中に放出される PGE₂ についても同様の傾向があった。シグナル伝達過程の検索で、calcineurin の阻害剤である FK506 はカリクレインによる COX-2 発現を阻害した。さらに転写活性測定キットによる検索で NFATc1 の転写活性はやや促進する傾向であることを確認した。

プラスミン・カリクレイン・ブラジキニンによる相互作用の検索では細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化について相乗効果を確認できなかった。しかしそれは過去の炎症性サイトカインとブラジキニンの報告と同様である。COX-2 タンパク質発現で、カリクレインとブラジキニンでそれぞれ単独作用に比べ増強することは確認した。しかしながら相乗効果という観点からすると弱く、相加、もしくは一方にマスクされている状況であることが示唆された。

同時にカリクレインによる $[Ca^{2+}]_i$ 動態の変化の由来についての検索も行った。すなわち細胞膜上のカルシウムイオンチャネル阻害剤である SKF96365 の効果を検索した。その結果、小胞体からの放出というよりはむしろ細胞外からの流入によるものが大半である結果を得た。

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1件)

Hayama T, Kamio N, Okabe T, Muromachi K, Matsushima K.

Kallikrein Promotes Inflammation in Human Dental Pulp Cells via Protease-Activated Receptor-1.

J Cell Biochem. 査読あり. 2016, 117 巻. 1522-1528. 10.1002/jcb.25437

〔学会発表〕(計 3 件)

葉山 朋美, 神尾 直人, 岡部 達, 松島 潔
ヒト歯髄細胞における KLKB1 による
calcineurin を介した炎症反応. 第 147 回日本
歯科保存学会学術大会.

2017.10.26-27

岩手県盛岡市マリオス.

Joji Fukai, Takahiro Watanabe, Risa Saito,
Hitomi Someya, Naoto Kamio, Tatsu Okabe,
Kiyoshi Matsushima.

Effects of calcification ability on human dental
pulp cells by Ga-Al-As laser irradiation.

2016 Autumn Scientific Meeting and Joint
Scientific Meeting of KACD-JSCD.

2016.10.21-23

韓国ソウル

神尾 直人, 葉山 朋美, 室町 幸一郎, 五味
博之, 喜多詰 規雄, 上田 幾大, 三浦 孝司,
山浦 賀弘, 松島 潔

ヒト歯髄培養細胞における LPS の Neuropsin
発現に与える影響.

第 143 回日本歯科保存学会学術大会.

2015.11.12-13

東京都文京区シビックホール.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

神尾 直人 (KAMIO Naoto)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号: 1 0 5 0 8 7 7 4

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()