

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15795

研究課題名(和文)炎症と組織再生のクロストークから展開するmiR-21による歯髄炎制御と硬組織誘導

研究課題名(英文)Control of pulpal inflammation and hard tissue regeneration by miR-21, a modulator of cross-talk between inflammation and tissue regeneration

研究代表者

川島 伸之(KAWASHIMA, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60272605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット歯髄組織に誘発した炎症により発現が増加したマイクロRNAの中からmiR-21に着目し、歯髄炎におけるmiR-21の機能について検討を行った。lipopolysaccharides刺激によりヒト歯髄細胞においてmiR-21発現は亢進するが、TNF receptor-associated factor 6、programmed cell death 4発現抑制を介してmiR-21はNFκBシグナルを抑制する一方、miR-21はオステオポンチン発現を亢進した。miR-21が歯髄炎において炎症を制御し、硬組織再生を誘導する調整因子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：miR-21 was up-regulated in the inflamed rat dental pulp tissue, and lipopolysaccharides induced expression of miR-21 in the human dental pulp cells. miR-21 down-regulated NFκB signaling via degradation of TNF receptor-associated factor (TRAF) 6 and programmed cell death (PDCD) 4. miR-21 also promoted osteopontin expression. miR-21 may control the progress of pulpal inflammation and modulate the hard tissue formation in the dental pulp tissue.

研究分野：歯内療法学

キーワード：dental pulp cell micro RNA miR-21 NFκB signaling inflammation LPS signaling cascade differentiation

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕に継発して歯髄炎が惹起された場合、その歯髄炎が不可逆性であれば抜髄処置を余儀なくされる。歯髄組織を失った歯は、歯牙破折を起こしやすく、歯を喪失する機会が増加する。口腔内に歯を保存する上で歯髄組織の保全は重要な要件である。そのためには、歯髄炎を制御し、健全な歯髄組織を回復するための手法の確立が望まれる。また、歯髄幹細胞移植による歯髄再生療法の成否のカギとなる因子の一つは炎症反応である。炎症はこれまで組織破壊のみに加担すると考えられてきたが、治癒機転のトリガーともなっていることが近年わかってきた(Karin M & Clevers H, Nature 529, 307-315, 2015)。生体には、炎症反応の進行に伴い、炎症を終息させ治癒に向かわせるシステムが具備されており、炎症はいずれ消退し、治癒機転が働くことにより破損した組織は修復され、組織の恒常性が回復する。逆に炎症が消退しないのは、炎症と再生のクロストークに不備がある、あるいは破綻していることにより、炎症が持続するのみならず治癒機転の誘導が障害される。現在、国内・国外において、炎症と再生のクロストークにおいて、miRNAの機能が注目されている。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは歯髄炎および根尖性歯周炎の発症メカニズムを探るため、ラットに実験的歯髄炎および根尖性歯周炎を惹起し、その病態について、組織学的および分子生物学的に検討し報告を行った。炎症の進行に伴い、好中球、マクロファージ、樹状細胞様細胞といった自然免疫に参与する種々の免疫担当細胞の浸潤が観察され、IL1、TNF $\alpha$ といった炎症性メディエーター産生が亢進することを明らかにし、メディエーターの一つであるNO産生を担うiNOSを阻害すると、炎症状態が緩和することを示した(Kawashima N, et al., J Dent Res, 84, 762-767, 2005)。また、破骨細胞において骨吸収に深く関与するカテプシン K を阻害することで、骨吸収を阻害するのみならず炎症を制御可能なことを明らかにした(Suzuki N, et al., J Endod, 41, 1474-9, 2015)。炎症を特徴づけるのは炎症性メディエーターであることは解明されたが、その制御をどのようにして行うのかは課題として残っている。これまでの研究を発展させ、生体における炎症と再生・治癒のクロストークに着目し、炎症制御と組織再生を誘導するのが本研究課題の目的である。

### 3. 研究の方法

智歯から摘出した歯髄組織から単離したヒト歯髄細胞(n=5, 倫理審査番号: #948)を、10%FBS添加 $\alpha$ MEMにて35mmディッシュ上で培養した。LPS (100ng/ml, *E. Coli* 0111B4, Sigma Aldrich)を添加したヒト歯髄

細胞より microRNA を抽出 (mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit, Thermo Fisher Scientific) した後、miR-21 および microRNAU6 (miR-U6:ユニバーサルコントロール) に対する専用のプローブを用いて逆転写を行い、さらにmiR-21およびmiR-U6に特異的なTaqman Probeを用いたreal-time PCRを行った (TaqMan Universal PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific、CFX96, BioRad)。また、TNF $\alpha$ , TRAF6、PDCD4 mRNA 発現を real-time PCR (CFX96, BioRad) にて検討した。さらに、NF $\kappa$ B阻害薬としてBAY11708 (Cayman)を使用した。またNF $\kappa$ B p65, pNF $\kappa$ B p65に対する特異的抗体を用いたWestern blottingおよびNF $\kappa$ Bの結合領域を認識するpGL4.32[luc2P/NF $\kappa$ B-RE/Hygro] (pGL4\_NF $\kappa$ BRE, Promega)を用いたluciferase assayを行いNF $\kappa$ Bシグナルの解析を行った。miR-21の機能を明らかにする目的で、強制発現ベクター (pcDNA3-miR21, Addgene)を歯髄細胞にトランスフェクション (TransIT-LT1 Transfection Reagent, Takara)した。

### 4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカインおよびmiR-21発現動態: ヒト歯髄細胞において、LPS刺激により産生が誘導される炎症性サイトカインIL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  mRNAは2時間をピークとする発現動態を示した(図1)。またmiR-21もほぼ同様の発現動態を示した(図1)。

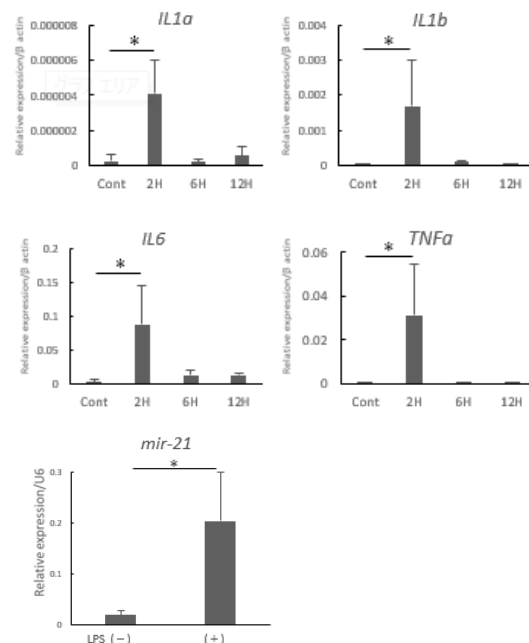


図1: ヒト歯髄細胞をLPSにて刺激したところ、2時間をピークとして炎症性サイトカインであるIL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ のmRNA発現が亢進した。またmiR-21産生もLPSにて誘導された。

(2) NF $\kappa$ B シグナルカスケード：LPS 刺激された歯髄細胞においては、pNF $\kappa$ B p65 の発現が増加し、pGL4\_NF $\kappa$ BRE を用いた luciferase 活性が顕著に増加することから、LPS 刺激により歯髄細胞において NF $\kappa$ B シグナルが活性化していることが明らかになった。さらに、BAY-11708 を添加すると、炎症性サイトカインのみならず miR-21 発現も抑制された。すなわち、miR-21 の産生に NF $\kappa$ B シグナルが深く関与していることが明らかになった (図 2)。

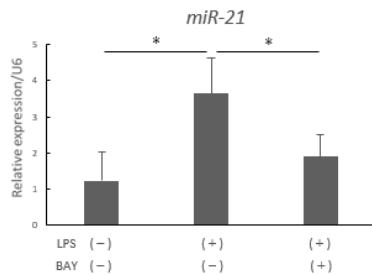


図 2：ヒト歯髄細胞において LPS にて誘導された miR-21 は、NF $\kappa$ B 阻害薬である BAY-11708 添加により抑制された。

(3) miR-21 強制発現：ヒト歯髄細胞において microRNA21 を強制発現させると、IL6、TNF $\alpha$  といった炎症性サイトカインの mRNA 発現が抑制された (図 3)。また、Toll-like receptor 4 シグナルに属する TRAF6、Akt シグナルに属する PDCD4 の mRNA 発現も抑制された (図 4)。さらに、pNF $\kappa$ B p65 の発現および pGL4\_N $\kappa$ BRE を用いた luciferase 活性も抑制された。以上の結果から、miR-21 は TRAF6、PDCD4 発現を抑制することにより、NF $\kappa$ B シグナルを制御し、その結果として炎症性メディエーター産生が抑制されたと推察される。以上の結果より、ヒト歯髄細胞において LPS 刺激により産生が誘導される miR-21 は、NF $\kappa$ B シグナルを制御することで炎症性メディエーター産生を抑制することが明らかになった。

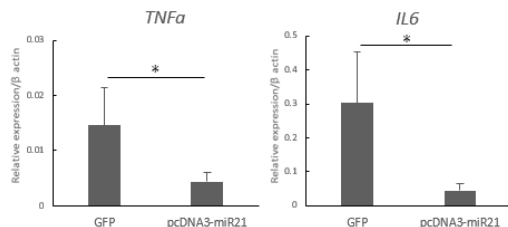


図 3：ヒト歯髄細胞において、LPS 刺激により誘導された TNF $\alpha$  および IL6 mRNA 発現は、miR-21 により抑制された。

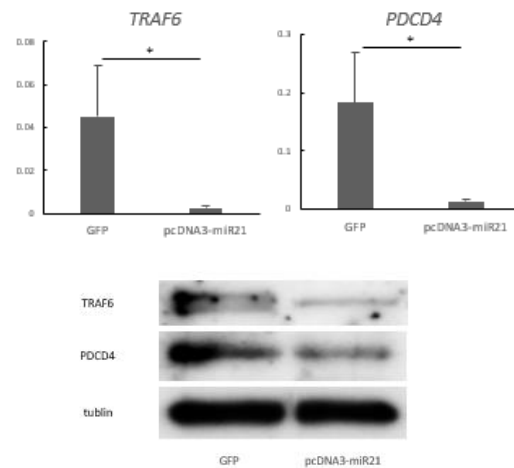


図 4：ヒト歯髄細胞において、LPS により誘導された TRAF6 および PDCD4 の mRNA およびタンパク発現は、miR-21 により抑制された。

(4) 硬組織マーカー発現：ヒト歯髄細胞に miR21 を強制発現させることにより、硬組織マーカーの一つであるオステオポンチン mRNA 発現の亢進が認められた。以上の結果より、miR-21 はヒト歯髄細胞を硬組織形成細胞へ分化誘導する可能性が示唆された。

## 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 5 件)

- ① Bakhit A, Kawashima N, Hashimoto K, Noda S, Nara K, Kuramoto M, Tazawa K, and Okiji T, Strontium ranelate promotes odonto-/osteogenic differentiation/mineralization of dental papillae cells in vitro and mineralized tissue formation of the dental pulp in vivo, Scientific Reports, 2018 in press, doi: 10.1038/s41598-018-27461-7. 査読あり
- ② Hashimoto K, Kawashima N, Ichinose S, Nara K, Noda S, Okiji T., EDTA Treatment for Sodium Hypochlorite-treated Dentin Recovers Disturbed Attachment and Induces Differentiation of Mouse Dental Papilla Cells., J Endod. 2018 Feb;44(2):256-262. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.003. 査読あり
- ③ Kawashima N, Noda S, Yamamoto M, Okiji T, Properties of dental pulp-derived mesenchymal stem cells and the effects of culture conditions, J Endod. 2017 Sep;43(9S):S31-S34. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.004. 査読あり

④ Tazawa K, Ikeda H, Kawashima N, Okiji T., Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts., Arch Oral Biol. 2017 Mar;75:55-61.  
doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.007.  
査読あり

⑤ 川島伸之, 戸村淳嗣, 横田兼欣, 興地隆史, 低濃度 EDTA 溶液のスミヤー層除去効果と象牙質脱灰に対する影響, 日本歯科保存学雑誌, p. 32-39 第 60 巻 第 1 号 2017 年  
<https://doi.org/10.11471/shikahozon.6.0.32> 査読あり

〔学会発表〕 (計 21 件)

① Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Saito M, Okiji T, Meis2 Induces Odonto-/Osteoblastic Differentiation and Mineralization, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif., USA - March 22-25, 2017

② Noda S, Kawashima N, Hashimoto K, Aramaki O, Okiji T, Dense Culture Condition Promotes Human Dental Pulp Stem Cell Differentiation, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif., USA - March 22-25, 2017

③ 橋本健太郎, 川島伸之, 市野瀬志津子, 奈良圭介, 野田園子, 興地隆史, NaOCl 処理象牙質に対する EDTA 処理はマウス歯乳頭由来細胞の接着を回復し細胞の分化を誘導する, 第 82 回口腔病学会学術大会 平成 29 年 11 月 19 日 20 日 東京医科歯科大学

④ 藤井真由子, 川島伸之, 興地隆史, ヒト歯髓細胞における炎症性メディエーター産生制御における HIF1a の役割, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月 16~18 日, 松本歯科大学キャンパス

⑤ 野田園子, 川島伸之, 橋本健太郎, 山本弥生子, 荒牧音, 田上順次, 興地隆史, 培養密度が歯髓幹細胞の幹細胞特性に与える影響, 第 146 回日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会, 2017 年 6 月 8 日, 9 日, リンクステーションホール青森, 青森

⑥ 倉本将司, 川島伸之, 野崎浩佑, Bakhit AY, 奈良圭介, 藤井真由子, 橋本健太

郎, 野田園子, 興地隆史, Mineral trioxide aggregate は LPS 刺激マクロファージの機能を calcium-sensing receptor を介して調節する, 第 146 回日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会, 2017 年 6 月 8 日, 9 日, リンクステーションホール青森, 青森

⑦ Bakhit A, Kawashima N, Hashimoto K, Noda S, Nara S, Okiji T, Strontium ranelate evoked proliferation and mineralization of mouse dental papillae cells is mediated via calcium sensing receptor 第 147 回日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会, 2017 年 10 月 26 日, 27 日, マリオス盛岡, 盛岡

⑧ K. Tazawa, H. Ikeda, N. Kawashima, M. Ozawa, H. Suda, T. Okiji, Expression of TRPM8 in Freshly Isolated Human Odontoblasts, 94th General session & exhibition of the IADR, June 22-25, 2016, Seoul, South Korea

⑨ Aramaki O, Kawashima N, Shimada Y, Okiji T, Tagami J, Three-dimensional analysis of Iba1+ macrophages in human dental pulp using whole mount immunostaining, 94th General session & exhibition of the IADR, June 22-25, 2016, Seoul, South Korea

⑩ Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Yamamoto M, Okiji T, Properties of dental pulp derived-mesenchymal stem cells and effects of culture conditions, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.

⑪ Nara K, Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Bakhit A, Okiji T, Increase of miR21 expression in dental pulp cells and tissues in response to LPS stimulation, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.

⑫ Noda S, Kawashima N, Hashimoto K, Aramaki O, Yamamoto M, Okiji T, Effects of confluent culture condition on dental pulp stem cell surface markers, proliferation, gene expression, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.

⑬ K. Hashimoto, N. Kawashima, K. Nara, S. Noda, M. Saito, T. Okiji, Recovery

effects of EDTA treatment on attachment and differentiation of mouse dental pulp cultured on NaOCl-treated dentin, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.

⑭ Bakhit A., Kawashima N., Yamamoto M., Hashimoto K, Noda S., Nara K., Okiji T. Action of Strontium Ranelate on the Dental-Pulp Complex, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.

⑮ 川島伸之、齋藤正寛、興地隆史、マウス歯髓細胞/組織および骨芽細胞/組織における Meis2 発現、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、平成 28 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター

⑯ 藤井真由子、川島伸之、興地隆史、ヒト歯髓細胞における lipopolysaccharide による HIF1a 発現の誘導、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、平成 28 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター

⑰ 川島伸之 山本弥生子 野田園子 橋本健太郎 興地隆史、歯髓幹細胞の三次元培養における幹細胞マーカーの発現動態、第 23 回日本歯科医学会総会、平成 28 年 10 月 21 日から 23 日、福岡国際会議場

⑱ 倉本将司、川島伸之、Alamuddin Bakhit、奈良圭介、藤井真由子、野田園子、橋本健太郎、齋藤正寛、興地隆史、Lipopolysaccharide 存在下におけるマウス歯乳頭細胞の mineral trioxide aggregate に対する反応性、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会、2016 年 10 月 27 日 28 日、キッセイ文化ホール、松本

⑲ 若林安見子、川島伸之、Alamuddin Yassin Bakhit、橋本健太郎、野田園子、奈良圭介、興地隆史、S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーの細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能の検討、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会、2016 年 10 月 27 日 28 日、キッセイ文化ホール、松本

⑳ Nara K, Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Okiji T, microRNA21 down-regulates the expression of inflammatory mediators in LPS-stimulated human dental pulp cells via an NF- $\kappa$ B dependent mechanism,

Oct. 21-23, 2016, 2016 Autumn Scientific Meeting (the 146th) and Joint Scientific Meeting of KACD-JACD (the 18th), The K Hotel Convention Center, Seoul, Korea,

㉓ Kawashima N, Hashimoto K, Okiji T, Rescue of mouse dental papillae cell-attachment to sodium hypochlorite-treated dentin disks by EDTA treatment, The 49th Scientific meeting of Korean Academy of Endodontics & The 14th JAE-KAE Joint Scientific Meeting, November 19th and 20th 2016, Nuridream Square, Seoul

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 伸之 (KAWASHIMA, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：66172605

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし