

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19029

研究課題名(和文) 歯髄炎におけるsemaphorin7Aの生理学的機能の解析と臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of physiological function of semaphorin7A in pulpitis.

研究代表者

西藤 法子 (Saito, Noriko)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：40735099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経ガイダンス因子として知られているSemaphorin familyの一つであるSemaphorin7A(以下Sema7A)に着目し、歯髄炎でのSema7Aの役割を解明することを目的として実験を行なった。Sema7Aはヒト歯髄細胞に対して、単独刺激では細胞増殖に影響はなく、TNF- α によって抑制された石灰化を解除する傾向を示した。Sema7Aは単独刺激では炎症性サイトカインであるIL-6、IL-8の産生に影響は与えず、TNF- α 刺激による炎症下で増加を示した。しかし、その反応は歯髄細胞によって異なり十分な再現性を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症時に誘導されるサイトカインなどの炎症因子を抑制することによる歯髄炎治療法の開発に関する報告は多いが、いまだに不可逆的な炎症時には抜髄を選択しているのが現状である。Sema7Aは歯髄組織において、炎症刺激によって明瞭な炎症性サイトカイン産生増加への関与を期待したが、十分な再現性を得ることができなかった。しかしながら、TNF- α による石灰化抑制の解除傾向や、シグナル伝達経路関連タンパク発現など炎症増悪因子としての影響は示唆できる。Sema7Aによる炎症への関与は歯髄の炎症機構の新たな発見であり、今後の歯髄の炎症制御に関する新規治療法の開発研究につながる成果となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Semaphorin7A (Sema7A), a member of the Semaphorin family, known as a neural guidance factor, to elucidate the role of Sema7A in pulpitis. Sema7A did not affect the production of inflammatory cytokines, IL-6 and IL-8, when stimulated alone, but increased under TNF- α -induced inflammation. However, the response varied from pulp cell to pulp cell and could not be reproduced adequately. These results suggest that Sema7A may be a possible exacerbator of inflammation, but its apparent involvement requires further investigation.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯学 Semaphorin7A 歯髄細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の寿命や感覚に重要な歯の神経である歯髄は、口腔内細菌の感染や歯が受けた機械的刺激によって炎症が生じる。刺激の程度によっては不可逆的な炎症が生じることになり、疼痛の制御のためにも歯髄を除去する抜髄を治療法として選択している。申請者は、歯髄に生じた不可逆的な炎症を抑制し、抜髄することなく健全な歯髄を回復される新たな治療法の確立をめざしている。歯髄組織では免疫担当細胞のみならず、歯髄組織細胞の主体となる歯髄線維芽細胞が様々な刺激に反応して炎症性サイトカインを産生することから、歯髄線維芽細胞が歯髄炎の病態の最外層に位置し、歯髄腔内に到達する外的因子を最初に受容する。Semaphorin7A (Sema7A) は、神経細胞において神経ガイダンス因子をとして知られている Semaphorin family の一つであり、炎症性サイトカインカスケードの促進因子として機能が報告されている分泌タンパク質である。Sema7A は、血管形成、癌浸潤、骨代謝の促進やマクロファージの活性化による免疫反応の増強など様々な生理活性を持つことが知られている (Pasterkamp RJ, BMC Dev Biol. 2007)。歯髄組織中では、成熟した象牙芽細胞の神経突起の基部を含めた部分に Sema7A が発現しており、受容体であるインテグリンは歯髄の神経線維で発現している (Maurin JC, Matrix Biol. 2005)。定常時でのその機能的意義については不明であるが、象牙芽細胞が保持する感覚受容器としての神経細胞様機能の発現に寄与していると推察される。一方で、歯髄に炎症が惹起されると象牙芽細胞が分泌する Sema7A はその潜在的な炎症促進能により、種々の炎症性サイトカインによる炎症カスケードを増悪化している可能性がある。歯髄においては、象牙芽細胞が恒常的に Sema7A を発現することが報告されているが、歯髄炎発症に関する過程での機能は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では歯髄腔内に存在する Sema7A に着目し、歯髄炎の不可逆化に象牙芽細胞が分泌している Sema7A が寄与していると仮定した。そのために、炎症刺激として TNF- α を使用し、リコンビナント Sema7A を作用させたヒト歯髄細胞で炎症性サイトカイン IL-6、IL-8 の産生に与える影響を炎症性サイトカインカスケードのシグナル伝達機構も含めて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞 (hPDC) は疫学研究 (E-54 広島大学倫理審査委員会) で採取した抜去歯牙内の歯髄から採取したものと、Lonza 社から購入した細胞を使用した。10% FBS を含む α -MEM 培地中で 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 存在下の恒温器内で培養した。実験には 3 継代から 6 継代のものを使用した。

(2) ヒト歯髄細胞における Sema7A の発現確認: hPDC を (1) の条件で培養し Sema7A と TNF- α で刺激した時の Sema7A の発現量を Western Blotting 法で確認した。

(3) Sema7A のヒト歯髄細胞増殖への影響: (1) の条件で培養した hPDC に対してリコンビナント Sema7A (0-200 ng/ml) の単独刺激を行い細胞増殖への影響を、クリスタルバイオレット染色で検討した。

(4) ヒト歯髄細胞における石灰化能への影響: Sema7A と TNF- α 、石灰化誘導培地で刺激し (1) の条件で hPDC を培養後、7 日間経過した細胞の石灰化を ALP 染色で確認した。

(5) ヒト歯髄細胞における IL-6、IL-8 の産生量の確認: (1) の条件下で培養した hPDC を、炎症惹起させるため TNF- α (10 ng/ml) で刺激した。また、同時にリコンビナント Sema7A で刺激し、24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法で IL-6、IL-8 の産生量を測定した。さらに、炎症性カスケードの阻害剤 (SC514: TNF- α inhibitor, PD98059: ERK inhibitor, SP600125: JNK inhibitor, SB203580: p38 MARK inhibitor) 存在下における IL-6、IL-8 の濃度を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) Sema7A のヒト歯髄細胞に対する細胞増殖への影響: 単独刺激した Sema7A は hPDC の細胞増殖に影響を与えなかった (図 1)。

(2) ヒト歯髄細胞における Sema7A の発現確認: hPDC は恒常的に Sema7A を発現しており、炎症反応時に発現が増加したが、Sema7A 単独刺激では発現の増加は見られなかった (図 2)。

(3) ヒト歯髄細胞における石灰化能への影響: hPDC

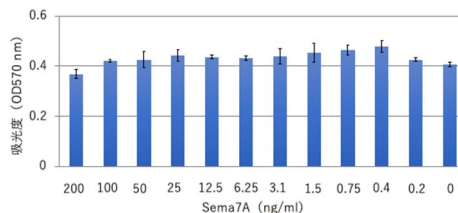


図 1. Sema7A 刺激時のヒト歯髄細胞増殖への影響

は TNF- α 刺激によって石灰化が抑制され、Sema7A の刺激によって石灰化の抑制が解除される傾向を示した(図3)。(4)ヒト歯髄細胞における炎症性カスケード関連タンパクの発現:(図2) Sema7A (10 ng/ml) の刺激で ERK1/2 と JNK のリン酸化、total I κ B の degradation が増強し、Sema7A (100 ng/ml) の刺激では 60 分後の p38 のリン酸化が増強した(図4)。

(5)ヒト歯髄細胞における IL-6、IL-8 の産生量の確認: hPDC の炎症反応時における Sema7A が誘導する IL-6、IL-8 は明らかに増加する場合と変化ない場合があり、産生増加する十分な再現性を得ることができなかった。NF- κ B 阻害剤及び ERK 阻害剤によって TNF- α によって産生した IL-6、IL-8 は抑制されたが、JNK 阻害剤では産生量の変化はなかった。P38 MARK 阻害剤によって IL-6 の産生はほとんど抑制されなかった。(図5)

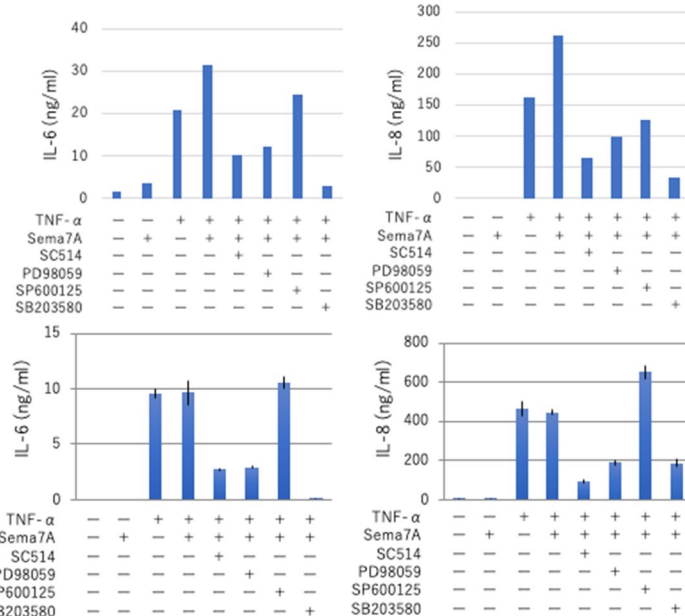


図5. TNF- α , Sema7A 刺激による IL-6, IL-8 の産生

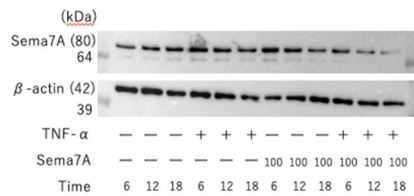


図2. ヒト歯髄細胞における Sema7A の発現

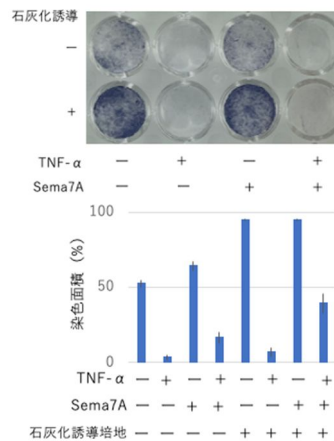


図3. ヒト歯髄細胞における石灰化能への影響

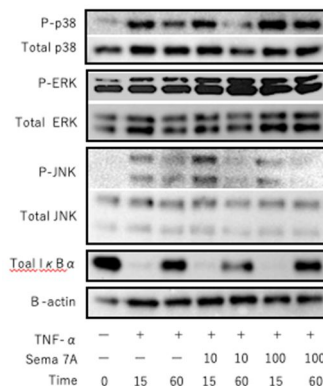


図4. TNF- α 刺激によるシグナル伝達関連タンパクの発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西藤法子, 進藤 智, 平田 土屋志津, 中西 惇, 吉田和真, 武田克浩, 柴 秀樹
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞におけるSemaphorin7Aの炎症促進機能
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度秋季学術大会（第151回）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------