

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890237

研究課題名（和文） ヒト歯髄培養細胞におけるプラスミンと炎症性サイトカインの相互作用

研究課題名（英文） Interaction between plasmin and inflammatory cytokine in human dental pulp cells.

研究代表者

神尾 直人 (KAMIO NAOTO)

日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）

研究者番号：10508774

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト歯髄培養細胞におけるプラスミンによるプロスタグランジン（PG） E_2 産生機構と炎症性サイトカインとの相互作用を解明し、歯髄炎の進行における歯髄細胞の機能的な特徴の一部を明らかにすること目的とした。結果として、プラスミンはヒト歯髄培養細胞においてCOX-2 mRNA発現、タンパク質産生およびPGE $_2$ 分泌を促進し、それには細胞内シグナルにおけるカルシニューリンが関与することが解明された。

研究成果の概要（英文）：This research clarifies interaction between plasmin and inflammatory cytokine in human dental pulp cells. As a result, the effect of plasmin on COX-2 mRNA expression and PGE2 secretion were coupled to calcineurin activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,170,000	351,000	1,521,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,510,000	753,000	3,263,000

研究分野：保存治療系歯学

科研費の分科・細目：若手研究（スタートアップ）

キーワード：歯学、細胞・組織、炎症、プラスミン、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

歯髄の保存的治療法の確立は臨床に不可欠な課題であり、申請者はこれまでに歯髄炎の病態の確立と治療薬開発への応用を目的として、ヒト歯髄培養細胞を用いて炎症性サイトカインがプラスミノゲンアクチベータ産生に与える影響について研究を行ってきた。次に申請者は、プラスミノゲンアクチベータによって変換されるプラスミンが、

プロテアーゼとしての作用だけでなく細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることでシグナル伝達を担うことを明らかにした。さらにプラスミンによるシグナル伝達は、Protease activated receptor-1を介していること、Interleukin-8のmRNA発現や、PGE $_2$ の遊離を引き起こし、歯髄における炎症性反応を惹起することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究ではまず、プラスミンの PGE₂ 産生機構を明確にする必要がある。そこで、PGE₂ 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の mRNA およびタンパク質発現、さらには細胞内カルシウムイオン濃度の動態との関連について検討し、またそれらが炎症性サイトカイン作用下での変化を検討する。以上のことで、歯髄炎の進行における歯髄細胞の機能的な特徴の一部を明らかにし、炎症性因子選択的な薬剤の開発を含め歯髄の保存的治療の為の新しい指標を確立する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄培養細胞の培養、保存

矯正学的理由により抜去された歯牙から歯髄を無菌的に抽出し、約 2mm 角に細断後 cell culture dish に静置し、アウトグロースした細胞をヒト歯髄培養細胞とした。培養は 10% ウシ胎児血清および抗生物質添加 α -MEM を用い、5~9 代継代した細胞を実験に用いた。

(2) プラスミンが COX-2 mRNA 発現およびタンパク質産生に与える影響

プラスミン刺激による COX-2 mRNA 発現を RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法にて、タンパク質発現をウェスタンブロット法にて検討した。

① RT-PCR 法

得られた total RNA、DNA primer (COX-2 および glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ; GAPDH)、Onestep RT-PCR kit (Qiagen 社製) を使用して RT-PCR を行った。すなわち 250 ng total RNA, 5×Qiagen Onestep RT-PCR Buffer (5・1)、5 pmol forward および reverse primer (3・1)、dNTP mix (1・1)、Enzyme mix (1・1)、を混和した後、総量を 25・1 とし、Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer 社製) にて cDNA 合成および増幅反応を行った。用いた DNA primer の塩基配列は以下の Table. 1 に示す。RT-PCR の反応条件は、50 °C 30 分、95 °C 15 分を 1 cycle 行って cDNA を合成し、次いで DNA 変性を 94 °C 30 秒、アニーリングを 55 °C 30 秒、伸長反応を 72 °C 30 秒行い、これを 1 cycle として 22 cycle 行った後、最終伸長反応を 72 °C 10 分間行った。PCR 合成産物は 2% アガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色を行い遺伝子増幅を確認した。

②リアルタイム PCR 法

mRNA を RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した後、omniscrypt RT kit.

(QIAGEN) によって cDNA を調整した。リアルタイム PCR 反応は、Thermal Cycler Dice™ Real Time System (Takara) および SYBR Premix Ex Taq™ II を用いて以下のように行った。増幅のサイクルは 95°C 5 分を 1 サイクル行い、次に 94°C 15 秒、55°C 30 秒 72°C 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。

③ ウェスタンブロット法

細胞内 COX-2 タンパク質の検出は、ヒト歯髄培養細胞を EGTA、EDTA 添加 Lysis Buffer にて回収後、SDS sample buffer にてサンプルを調整する。SDS sample buffer を加え 5 分間ボイルした後、15,000 rpm で 1 分間遠心分離後の上清をサンプルとして SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、ニトロセルロース膜へ転写した。その後 30 分間スキムミルクにてブロッキングを行い、洗浄後、一次抗体として (anti COX-2 monoclonal antibody; Cayman) を 2 時間、二次抗体として HRP 標識 anti mouse IgG (Bio Rad 社製) を 90 分間作用させた後、Enhanced Chemiluminescence kit (ECL kit; Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて化学発光を行い、タンパク質発現の検索を行った。

(3) 炎症性サイトカインと PAR-1 活性化シグナルとの相互作用

炎症性サイトカインである IL-1・および TNF- \cdot を前投与時における、PAR-1 活性化シグナルについて、プラスミンおよび PAR-1 活性化ペプチドを用いて検討した。

① [Ca²⁺]_i 測定

コンフルエントになったヒト歯髄培養細胞を蛍光色素 Fura-2 にてラベルし、刺激後の細胞内の蛍光を日本分光 CAF-110 スペクトロフルオロメーターにて測定する。すなわち 13.5 mm カバーガラス上で細胞培養を行い、Fura-2 ラベル後専用キュベット内に静置し刺激を行う。励起波長 340 nm および 380 nm における比から Grynkiewicz らの方法 (J. Biol. Chem., 1985) により濃度換算を行った。

② COX-2 mRNA 発現の変化

上記した方法にて RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を行い、COX-2 mRNA 発現量の変化を検討する。

③ PGE₂ 産生量測定

PGE₂ EIA kit (Cayman) を用い、培養上清中に遊離した PGE₂ 量の測定を行った。

4. 研究成果

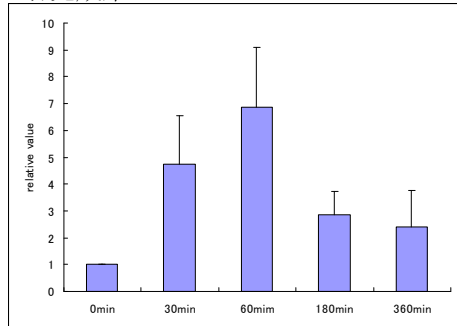


Fig. 1 プラスミンによる COX-2 mRNA 発現の時間依存性効果

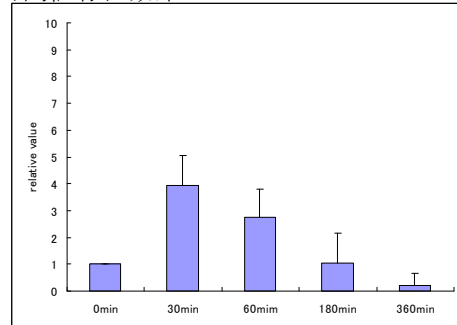
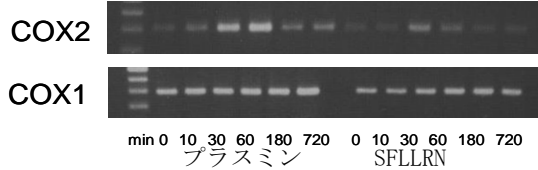


Fig. 2 PAR-1 活性化剤による COX-2 mRNA 発現の時間依存性効果



(1) プラスミンおよび PAR-1 活性化剤 (SFLLRN) は、時間依存的に COX-2 mRNA 発現を増強させ、プラスミンは刺激後 60 分で、SFLLRN は刺激後 30 分で最大となった。

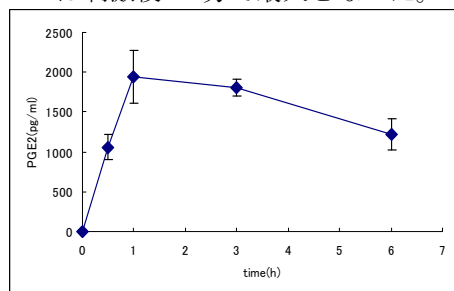


Fig. 3 プラスミンによる PGE₂ 産生量の時間依存性効果

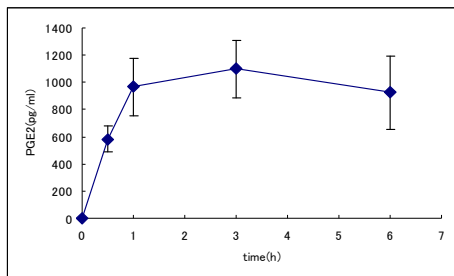


Fig. 4 PAR-1 活性化剤による PGE₂ 産生量の時間依存性効果

(2) プラスミンおよび SFLLRN は、時間依存的に培養上清中の PGE₂ 量を増加させ、ともに刺激後 60 分で最大となった。

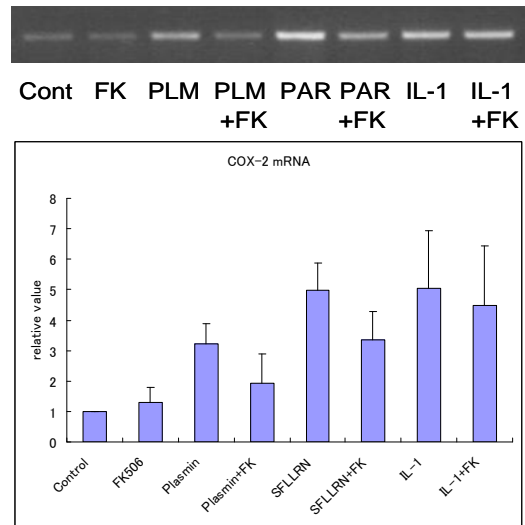


Fig. 5 COX-2 mRNA 発現に対する、カルシニューリン阻害剤 (FK506) の効果

(3) 次に、サイトカインの相互作用を検索する前に、COX-2 産生の細胞内シグナルをプラスミンおよび SFLLRN (Ca 依存性) と、IL-1b (Ca 非依存性) で検討する必要がある。

カルシニューリン阻害剤である FK506 は、プラスミンおよび SFLLRN による COX-2 mRNA 発現を抑制したが、IL-1b による COX-2 mRNA 発現には影響しなかった。

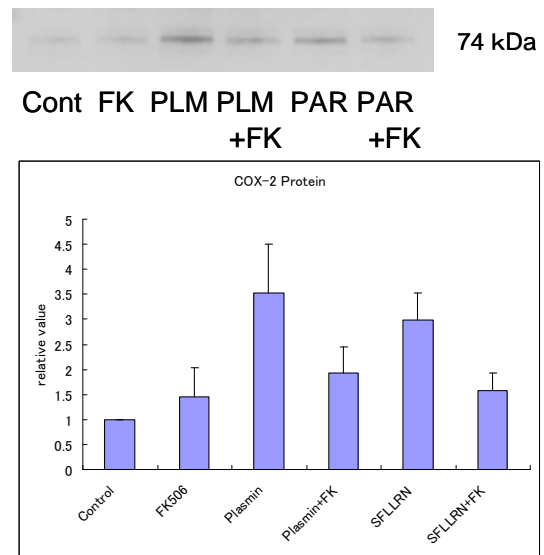


Fig. 6 COX-2 タンパク質発現に対する、FK-506 の効果

(4) カルシニューリン阻害剤である FK506 は、プラスミンおよび SFLLRN による COX-2 タンパク質産生を抑制した

以上の結果から、プラスミンは COX-2 mRNA 発現、タンパク質産生を経て PGE2 産生に関与していること、またそれには細胞内シグナル伝達においてカルシニューリンの活性化が関与することが示唆された。

今回の報告ではヒト歯髄培養細胞におけるプラスミンの COX-2 産生機構の確立に終始したが、現在 IL-1b および TNF-a による相互作用を検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 神尾直人、室町幸一郎、五味博之、酒井きよ美、田中みどり、中尾寿美、松島潔
ヒト歯髄培養細胞の plasmin による COX-2 産生におけるカルシニューリンの関与
日本歯科保存学会 2009 年秋季学術大会
2009 年 10 月 29 日、30 日
仙台国際センター
- ② 中尾寿美、室町幸一郎、神尾直人、松島潔
歯肉線維芽細胞におけるセラミドの抗炎症作用
日本歯科保存学会 2009 年秋季学術大会
2009 年 10 月 29 日、30 日
仙台国際センター
- ③ 室町幸一郎、神尾直人、橋爪英城、松島潔、中尾寿美
plasmin 刺激によるヒト歯根膜培養細胞の protease activated receptor-2 mRNA 発現調節について
日本歯科保存学会 2009 年秋季学術大会
2009 年 10 月 29 日、30 日
仙台国際センター

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・助手 (専任扱)

研究者番号：10508774