

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09979

研究課題名(和文) 歯髄炎進展と象牙芽細胞分化誘導に関わるCXCR4の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of CXCR4 involved in pulpitis progression and odontoblast differentiation

研究代表者

神尾 直人 (KAMIO, Naoto)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：10508774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄炎時もしくは象牙芽細胞へ分化する過程におけるCXCR4の機能について検索し、歯髄培養細胞を用い、IL-1bやブラジキニンが刺激後数日でmRNAおよびタンパク質発現を促進させることを解明した。しかしながらPGE2は影響を与えなかった。炎症性刺激を与えた細胞で、細胞内カルシウムイオン濃度の変化がみられるか、CXCL12、MIFで検討したものの、無刺激時と比べて有意に増加させるものは確認されなかった。同様のケモカイン受容体としてCX3CR1でも検討し、炎症性刺激におけるmRNA発現、タンパク質発現を確認し、さらにCX3CL刺激は硬組織形成能を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄は一度炎症を起こすと改善が困難な組織である。歯髄の有無が歯の寿命だけでなく認知症や寿命そのものにも影響を与え、歯髄保存療法の適応拡大は歯科臨床医にとって急務である。CXCR4はケモカイン受容体のひとつで、受容体とそのリガンドは基本的には炎症の拡大時に増強されるが、それと同時に歯髄では治癒機転を促進する可能性がある。本研究で炎症モデルの細胞ではCXCR4の発現が増強されるものの、そのリガンドの作用では治癒機転への影響は確認できなかった。一方で、同様のケモカイン受容体であるCX3CR1は炎症の拡大と治癒機転への影響が確認され、歯髄炎と治癒とを関連付ける因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We searched for the function of CXCR4 during pulpitis and odontoblast differentiation. Using cultured dental pulp cells, we clarified that IL-1b and bradykinin promote mRNA and protein expression. However, PGE2 had no effect. We examined whether the increase in the intracellular calcium ion concentration was observed in the cells given the inflammatory stimulus. Although CXCL12 and MIF were examined, no significant increase was observed compared to the non-stimulated state. We also examined CX3CR1 as a similar chemokine receptor, confirmed mRNA expression and protein expression in inflammatory stimulation, and suggested that CX3CL stimulation promotes hard tissue formation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄 炎症 細胞・組織 CXCR4 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は硬組織により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係し、また残存機能歯数の増加は認知症予防や寿命にまで影響を与える。すなわち歯髄の保存は『健康長寿』に寄与する。近年、多分化能を有する幹細胞や、成長因子を用いた組織再生療法の研究・臨床応用が急速に進む一方で、炎症歯髄における細胞機能の特性もまだ不明な点が多いのが現状である。また MTA セメントなどを用いた感染歯髄に対する直接覆髄や部分断髄が臨床的には実施されているが、その適応は明確でなくさらなる基礎的な研究が必須であると考えられる。これまでに、炎症歯髄組織では健康な歯髄に比べ macrophage migration inhibitory factor (MIF) および MIF 受容体のひとつである CXCR (C-X-C motif chemokine receptor) 4 の発現が多く認められること、歯髄細胞に MIF を作用させると COX-2 の mRNA やタンパク質発現が促進し、炎症性メディエーターである PGE₂ の分泌が促進すること、CXCR4 阻害剤作用下では抑制されること、を解明した。上記の報告は PGE₂ による炎症の拡大に焦点を当てたものであるが、一方、当研究室では歯髄において低濃度 PGE₂ はむしろ硬組織形成能を促進するという報告やメタロプロテアーゼである 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消炎のみならず歯髄の治癒に導く過程に必須であると示唆される。また、現時点で未分化細胞から象牙芽細胞に分化する過程で CXCR4 の発現が促進する報告や、CXCR4 を未分化マーカーとする報告がある。すなわち、歯髄における炎症と治癒の特殊性に、CXCR4 の機能の複雑性が関与している事が推察されるが、これを解明するには至っていない。

2. 研究の目的

歯髄の炎症初期において、CXCR4 発現の未分化細胞の集積と歯髄細胞および白血球からの MIF や CXCR4 の本来のリガンドである CXCL-12 の発現が促進され細胞に作用し、他サイトカインの影響も含め局所の PGE₂ が高濃度となれば周囲の組織を含めた炎症の拡大に、低濃度にコントロールされた場合には象牙芽細胞への分化が促進し、硬組織形成に寄与するという仮説が成立する。特に、MIF は他組織では CXCR4 を介して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を促進するが、歯髄ではそれを惹起しない。歯髄における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇はセカンドメッセンジャーとして炎症の進展に働くだけでなく治癒機転に直接的な影響を与えともいわれており、その複雑性の解明は歯髄炎を治癒に反転させうる。そこで CXCR4 を介したシグナル伝達のさらなる機能解析と、硬組織形成過程における発現の変化について検討を行った。

3. 研究の方法

研究は主に歯髄培養細胞もしくはヒト抜去歯を用い、日本大学における人を対象とする医学系研究に関する倫理内規および日本大学松戸歯学部倫理審査要項等関連法規を遵守の上で行った。mRNA 発現はリアルタイム PCR 法、タンパク質発現は Western Blot 法もしくは細胞蛍光免疫染色にて行った。細胞内カルシウムイオン濃度の測定は、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した。研究対象としては CXCR4 とそのリガンドである MIF、CXCL-12 であるが、同時に他ケモカイン受容体の関連も変更実験として検討した。硬組織形成能は、Alizarin Red 染色にて観察した。

4. 研究成果

(1) 炎症性刺激によるケモカイン受容体の発現

リアルタイム PCR 法・細胞蛍光免疫染色にて炎症性サイトカインである IL-1 β やブラジキニンが、刺激後数日で CXCR4 mRNA およびタンパク質発現を上昇させることを見出した。続けてウェスタンブロット法にて検索し、IL-1 β が時間依存的に CXCR4 タンパク質を増加させる傾向にあることが見いだされた。また、それらの刺激はリガンドである MIF の発現には影響しなかった。さらに、IL-1 β 、LPS は、C-X3-C motif chemokine (CX3C) R1 のタンパク質発現を、またそのリガンドである CX3CL の mRNA、タンパク質発現を時間依存的、濃度依存的に促進した。しかしながら石灰化誘導培地や PGE₂ は、MIF および CXCR4、の発現自体には影響を与えなかった。上記の結果から、炎症性の刺激はケモカイン受容体の発現は歯髄細胞で認められるがそのリガンドは必ずしも歯髄細胞では発現せず、白血球や血管内皮細胞の発現に依存する可能性があることが示唆された。

(2) 炎症性刺激、ケモカイン刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の変化

通常無刺激の歯髄培養細胞は、bradykinin、histamine、plasmin、kallikrein により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を誘発する。しかしながらケモカイン受容体への刺激では正常歯髄細胞では細胞内カルシウムイオン濃度の変化が認めなかった。上記の炎症性刺激がケモカイン受容体の発現を促進した結果、機能の絶対量が増加すれば新たなシグナル伝達を誘発する可能性はあると考えられた。すなわち刺激後の細胞を用いて細胞内カルシウムイオン濃度の変化があるかを検討した。結果として、炎症性サイトカイン、石灰化誘導培地、乳酸にて処理したヒト歯髄培養細胞で、CXCR4、CX3CL にて刺激し、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を検索したものの、無刺激のものよりも上昇させることはなかった。同時に、Xa 因子、スフィンゴシン 1 リン酸についても検討すると、スフィンゴシン 1 リン酸のみ細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を認めた。

(3) 炎症歯髄組織の免疫組織化学染色

CXCR4 は炎症程度の強い部位では発現は多く、逆に第三象牙質が形成された正常歯髄様組織では発現細胞が少ない結果となった。この結果は CX3CR1 および CX3CL も同様であったが、CX3CL は歯髄細胞から発現している可能性があるのに対し、MIF は歯髄からの発現が確認されない点が興味深いといえる。CXCR4 を未分化細胞マーカーと報告されている論文もあり、炎症時に発現した CXCR4 陽性細胞が、象牙芽細胞へと分化し機能している可能性は示唆されるが、炎症強度から考えるとさらなる検討が必要である。仮説として細胞内カルシウムイオンの増加が引き起こす第三象牙質の形成 に対しては今のところ CXCR4 は寄与しておらず、むしろ炎症の進展時に発現が強くなる と現在の結果からは言える。また、細胞内カルシウムを増加させないという結果からも、CXCR4 シグナルは炎症の進展に導くがゆえにカルシウムイオンに変化を来さないという可能性はある。このようなカルシウム上昇の選択性があると考え、bradykinin のような急激な濃度上昇を認める因子に関して、それを第三象牙質の形成に利用できる可能性を模索できれば治癒機転へと利用可能なのかもしれない。

(4) ケモカイン刺激による炎症と硬組織形成関連因子

CXCR4 シグナルは COX2/PGE₂ を介して歯髄の硬組織形成関連遺伝子に影響を与える可能性

は示唆される。しかしながら歯髄細胞自らがリガンドを発現する可能性が低いことから、CX3CR1 シグナルの検討を行った。高濃度の CX3CL の作用により、CXCR4 と同様に COX2 の発現を認めたが、低濃度の CX3CL の作用は COX2 の弱い mRNA 発現だけでなく BMP-2 の mRNA 発現を促進し、Alizarin Red 染色にて高濃度刺激よりも高い硬組織形成誘導を示した。また、MMP-3 の発現を促進する報告が変形性関節炎ではあるが、歯髄細胞では発現が促進されなかった。PGE₂ の調整とともに自らも硬組織形成調整に関与できる可能性がある因子であると考えられると興味深い結果であると言える。

本研究で歯髄におけるケモカイン受容体の発現と炎症進展・硬組織形成への関与の一端を解明できたと考えられるが、今後さらなる詳細の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 神尾 直人、葉山 朋美、渡邊 昂洋、深井 譲滋、鈴木 誠、五明 夏子、倉持 光成、岡部 達、松島 潔	4. 巻 65
2. 論文標題 ヒト歯髄培養細胞における lipopolysaccharide による kallikrein-related peptidase 8 産生と炎症反応	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 205 ~ 214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11471/shikahozon.65.205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五明 夏子、岡部 達、神尾 直人、葉山 朋美、深井 譲滋、渡邊 昂洋、松島 潔
2. 発表標題 ヒト歯髄培養細胞におけるフラクタルカインの炎症作用の検索
3. 学会等名 第155回 日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉持 光成、岡部 達、神尾 直人、葉山 朋美、深井 譲滋、渡邊 昂洋、松島 潔
2. 発表標題 スフィンゴシン-1-リン酸のヒト歯髄培養細胞における硬組織形成能への影響
3. 学会等名 第155回 日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 昂洋、神尾 直人、葉山 朋美、深井 譲滋、松島 潔
2. 発表標題 ヒト歯髄におけるMIFのCXCR4を介したPGE2産生による炎症促進作用
3. 学会等名 第152回 日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷 夏子, 岡部 達, 神尾 直人, 葉山 朋美, 深井 譲滋, 渡邊 昂洋, 松島 潔
2. 発表標題 ヒト歯髄培養細胞におけるfractalkineの炎症と硬組織形成能への関与
3. 学会等名 第157回 日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉持 光成, 岡部 達, 神尾 直人, 葉山 朋美, 深井 譲滋, 渡邊 昂洋, 松島 潔
2. 発表標題 ヒト歯髄培養細胞におけるスフィンゴシン-1-リン酸受容体の検索
3. 学会等名 第157回 日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------