

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10205

研究課題名(和文) 乳歯歯髄組織におけるCCL11の機能解析および新たな歯髄保護再生療法の開発

研究課題名(英文) Effect of CCL11 derived from deciduous tooth on pulp and root resorption

研究代表者

長谷川 智一 (HASEGAWA, Tomokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師

研究者番号：50274668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はhTERT遺伝子を導入して不死化した乳歯歯髄細胞においてケモカインの一つであるCCL11の発現解析を行った。CCL11は各種白血球の遊走因子として知られ、歯周病の病態に關与することが示唆されている。歯髄疾患への關与も考えられるため、その発現調節機構について解析を行った。歯髄細胞株においてCCL11を構成的に発現し、その発現はFGF-2の投与により抑制されることが明らかとなった。FGF-2によるCCL11 mRNAの発現抑制は、SP600125のみがブロックした。以上の結果から、歯髄細胞株の発現するCCL11は、FGF-2によりJNK経路を介して抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のCCL11についての研究はアレルギー疾患の炎症の成立や炎症の増悪機構、ケモカインレセプター阻害などによる好酸球の遊走コントロールによる治療法について多い。歯科においては歯周病での炎症の増悪機構における報告がほとんどである。

今回我々がケモカインCCL11によるヒト乳歯歯髄疾患への關与や根尖性歯周炎の成立、乳歯歯根の内部吸収や異常吸収に關する可能性を検討するのは本邦では初めてではないと思われる。また乳歯歯髄細胞でのCCL11の強発現の報告も現在では我々のみである。乳歯の早期喪失の主要な原因である歯根の異常吸収のメカニズムが判明すれば、臨床応用も目指すことが可能となり得る。

研究成果の概要(英文)： Expression of C-C motif ligand 11 (CCL11) in human dental pulp cells (DP cells) was investigated because CCL11 could be thought that it might play important roles in regenerative dentistry. In this study, we showed that fibroblast growth factor 2 (FGF-2) inhibited the expression of CCL11 in a time- and dose-dependent manner in DP cells via the JNK signaling pathway. The present findings could provide important insights into the association of FGF-2 and CCL11 in dental tissue regeneration therapy.

研究分野：歯学

キーワード：乳歯歯髄細胞 CCL11

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ケモカインは細胞遊走活性を有するサイトカインの一種であり、一般的には白血球などの遊走を引き起こし炎症の形成に関与する。その中でも C-C motif ligand 11 (CCL11) は好酸球の遊走を誘導し、局所を酸性に誘導し、炎症を悪化させると考えられる。

本来好酸球は感染症や寄生虫に対する防御反応に重要と考えられていたが、好酸球中の顆粒たんぱく質による細胞障害作用が明らかとなり、近年ではアレルギー疾患の炎症反応を惹起・促進する火付け役と考えられるようになった。この好酸球の遊走をコントロールする CCL11 とその受容体 C-C motif receptor 3 (CCR3) がアレルギー疾患で注目されている。アレルギー疾患の炎症の成立・組織への好酸球浸潤の程度と、CCL11 の発現強度が疾患重症度と相関することが知られている。さらに CCL11 受容体である CCR3 を発現する Th2 細胞の浸潤も誘導され、この Th2 細胞の産生する炎症性サイトカインによる炎症の増悪も報告されている。

ところがヒト乳歯歯髄より分離し、hTERT 遺伝子導入により分裂寿命を延長した乳歯歯髄細胞株の解析で CCL11 が強発現していることを確認した。炎症の形成とその増強に関与すると考えられている CCL11 が、なぜ歯髄で強発現しているのかを解明することは、逆に歯髄における炎症のコントロールや歯髄組織の恒常性維持機構の解明に役に立つと考えられる。この疑問の答えは最終的には歯髄再生に活用できることが予想される。

また CCL11 は炎症性骨吸収にも関与していることが報告されている。乳歯の歯髄疾患の場合、歯根の内部吸収や歯根の異常吸収を生じることが多い。すなわち乳歯では歯根の異常吸収を生じてしまうために治療自体が不可能になってしまうことが多い。しかし永久歯で同様の根尖性歯周炎の場合では歯根吸収が生じることがほとんどない。このことから、CCL11 が乳歯の歯根吸収に関与している可能性も検討する予定である。

### 2. 研究の目的

近年の CCL11 についての研究はアレルギー疾患の炎症の成立や炎症の増悪機構、ケモカインレセプター阻害などによる好酸球の遊走コントロールによる治療法について多い。歯科においては歯周病での炎症の増悪機構における報告がほとんどである。

今回我々は乳歯歯髄細胞で産生されるケモカイン CCL11 について、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) による発現調節機構の解析を行った。FGF-2 は歯の発生だけでなく歯周組織の恒常性の維持、再生療法においても近年注目されているサイトカインである。

以上の解析を行うことで、ヒト乳歯歯髄疾患への関与や根尖性歯周炎の成立、乳歯歯根の内部吸収や異常吸収に関係する可能性を検討する。また乳歯歯髄細胞での CCL11 の強発現の報告も現在では我々のみである。さらに日常の小児歯科臨床において、乳歯の早期喪失の主要な原因である歯根の異常吸収のメカニズムが判明すれば、臨床応用も目指すことが可能となり得る。保存療法が可能になることで子供たちの健康増進を図ることができ、さらには日本の健康保険財政にも寄与することが考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 乳歯歯髄細胞株および乳歯歯髄の分離細胞における CCL11 発現の確認

hTERT 導入により分裂寿命を延長し single cell cloning により樹立したヒト由来の乳歯歯髄細胞株において CCL11 mRNA 発現されているのかどうか確認を行う。また FGF-2 による CCL11 の発現に対する影響の確認を real-time PCR によって行った。

#### (2) FGF-2 による CCL11 の発現抑制機構の解析

FGF-2 による CCL11 の発現抑制が、FGF 受容体を介しているのか阻害剤 AZD4547 を使用して確認を行った。

#### (3) FGF-2 による CCL11 の発現抑制メカニズムにおける、細胞内シグナル経路の解析

FGF 受容体から down-stream の細胞内シグナル分子の解析を行った。FGF 受容体の下流シグナルの解析のために、SB203580 (p38 MAPK 阻害剤)、U0126 (ERK1/2 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤) を使用して解析を行った。western blotting によりそれぞれの細胞内シグナル分子のリン酸化の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト歯髄細胞株における CCL11 の発現は FGF-2 の投与によって抑制された。

ヒト歯髄細胞株において CCL11 は構成的に発現し、その発現は FGF-2 の投与により抑制されることが明らかとなった。この効果は濃度依存的で FGF-2 投与量 10-20 ng/ml、投与後 24 時間で 10 分の 1 と最大であった (図 1)。効果も経時的に作用し、24 時間から 48 時間でピークを示した (図 2)。

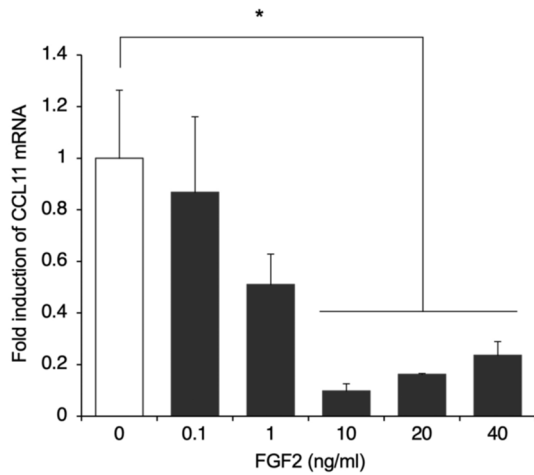


図 1. FGF2 投与量による CCL11 の発現量

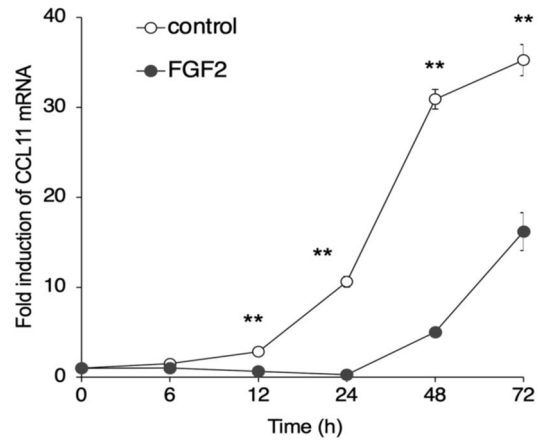


図 2. CCL11 発現量の経時的変化

(2) FGF-2 の投与によるヒト歯髄細胞における CCL11 の発現抑制は、FGF 受容体の阻害剤 AZD4547 の投与によってブロックされた。

FGF 受容体の阻害剤である AZD4547 の投与によって、CCL11 の発現抑制はブロックされ、発現の促進が認められた (図 3)。同時に阻害剤単独の投与でも CCL11 の発現促進が認められたことから、ヒト歯髄細胞は構成的に FGF-2 を産生しオートクライン的に作用して CCL11 の産生を抑制している可能性が考えられた。

(3) CCL11 の発現抑制は、FGF 受容体から JNK 経路を介していることが示された。

FGF-2 受容体の下流シグナルの解析のために、SB203580 (p38 MAPK 阻害剤)、U0126 (ERK1/2 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤) を使用して解析を行った。western blotting によりそれぞれの細胞内シグナル分子のリン酸化の検討を行った結果、FGF-2 投与によって全ての分子においてリン酸化が生じた。また、FGF-2 とそれぞれの阻害剤の投与によってシグナル分子のリン酸化が抑制された。しかしながら FGF-2 による CCL11 mRNA の発現抑制は、SP600125 のみがブロックした。これらの結果を合わせると、歯髄細胞株の発現する CCL11 は、FGF-2 により JNK 経路を介して抑制されることが明らかとなった。

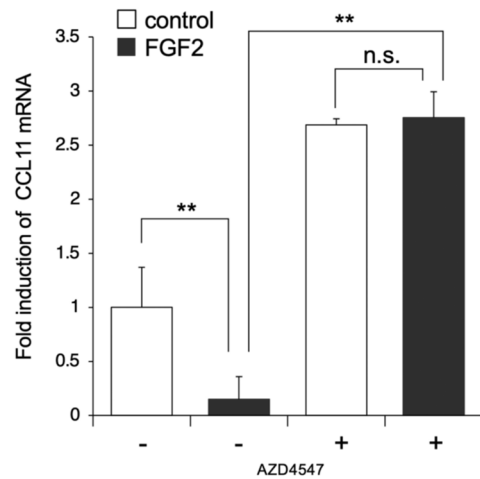


図 3. FGF2 受容体阻害剤による影響

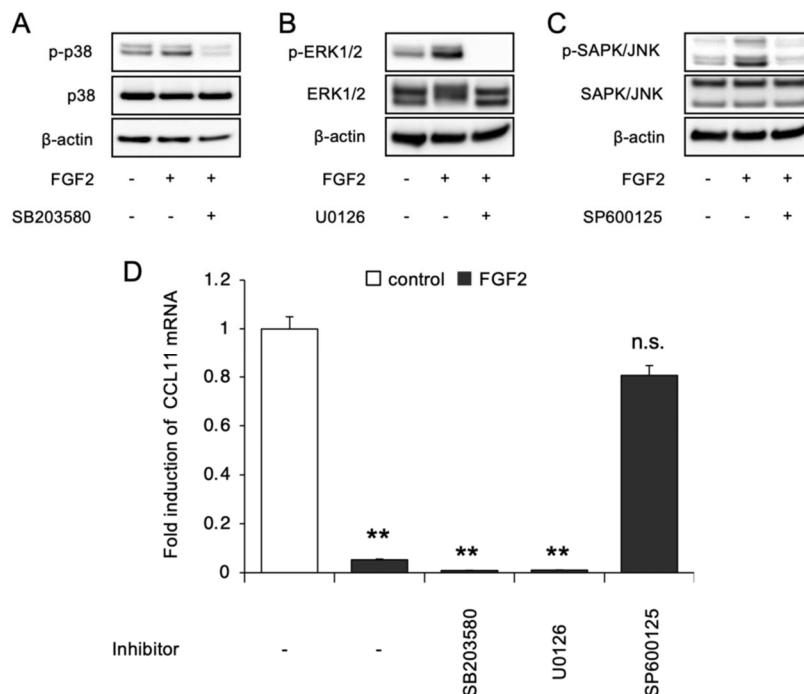


図 4. MAP kinase と阻害剤による解析

これらの結果から、乳歯歯髄細胞が CCL11 を発現していること、さらに CCL11 の発現量を FGF-2 によってコントロール可能なこと、その細胞内シグナルは JNK 経路を介していることが示された。これらの結果を利用して、歯髄疾患や歯周組織の再生治療に応用可能かどうか、今後検討を行っていく予定である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeyoshi Asakawa, Atsushi Yamada, Masumi Kugino, Tomokazu Hasegawa, Kentaro Yoshimura, Kiyohito Sasa, Mitsuhiro Kinoshita, Masakazu Nitta, Karin Nagata, Tomomi Sugiyama, Ryutaro Kamijo & Takahiro Funatsu	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment of Down's syndrome periodontal ligament cells by transfection with SV40T-Ag and hTERT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 379-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 黒厚子璃佳, 岩田こころ, 中川 弘, 長谷川智一, 上田公子, 北村尚正, 赤澤友基, 杉本明日菜, 河原林啓太, 宮崎 彩, 尼寺理恵, 藤島史帆, 岩崎智憲, 岩本 勉	4. 巻 60
2. 論文標題 当科における5年間の障害児・有病児の初診時実態調査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 岩田こころ, 黒厚子璃佳, 杉本明日菜, 藤島 史帆, 赤澤友基, 河原林啓太, 宮崎彩, 北村尚正, 尼寺理恵, 上田公子, 中川弘, 長谷川智一, 岩本勉	4. 巻 59
2. 論文標題 当科における初診患者の実態調査 ～平成における30年間の変遷～	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Kurogoushi Rika, Hasegawa Tomokazu, Akazawa Yuki, Iwata Kokoro, Sugimoto Asuna, Yamaguchi-ueda Kimiko, Miyazaki Aya, Narwidina Anrizandy, Kawarabayashi Keita, Kitamura Takamasa, Nakagawa Hiroshi, Iwasaki Tomonori, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 22
2. 論文標題 Fibroblast growth factor 2 suppresses the expression of C-C motif chemokine 11 through the c-Jun N-terminal kinase pathway in human dental pulp-derived mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1356-1364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2021.10791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒厚子璃佳、長谷川智一、赤澤友基、岩本 勉
2. 発表標題 歯髓細胞におけるFGF2によるJNK経路を介したCCL11の発現抑制
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎智恵、前尾 慶、幸平若菜、北村尚正、河原林啓太、宮崎 彩、赤澤友基、上田公子、中川 弘、長谷川智一
2. 発表標題 小児閉塞性睡眠時無呼吸への対応と展望
3. 学会等名 徳島県小児保健協会 総会並びに第62回講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒厚子璃佳、長谷川智一、岩崎智恵、岩本 勉
2. 発表標題 両側性に生じた下顎第一大臼歯生歯困難の1例
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 彩、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯の早期萌出をみる ADAM17 欠損症の1例
3. 学会等名 第 58 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------