

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592124
 研究課題名（和文） 歯内一歯周疾患に対する新たな治療法の確立；補体調節因子の制御
 研究課題名（英文） Establishment of therapeutic strategy for endo-perio lesion; the control of complement regulatory factors
 研究代表者
 作田 哲也(SAKUTA TETSUYA)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：20284888

研究成果の概要（和文）：ヒト 歯根膜細胞には補体調節因子(CD46, CD55 と CD59)の発現が認められた。同細胞を TNF- α で前処理した後に *P. intermedia* 由来のリポ多糖で刺激すると、前処理しないものに比べて CD59 の発現が抑制された。歯髄における痛みの発生機序に関与すると考えられる内因性カンナビノイドの一つであるアナンダマイドは、ヒト歯髄細胞における MMP-2 の産生を誘導することが明らかとなった。MMP-2 はそれを産生した歯髄細胞上に発現する補体調節因子を切断することにより、歯髄細胞は補体による攻撃を受けやすくなると考えられる。TNF- α のような炎症性因子や AEA のようなエンドカンナビノイドは、補体制御因子の発現を抑制することにより根尖部における組織破壊を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Complement regulatory factors (CD46, CD55, and CD59) were expressed in human periodontal ligament cells. The amount of CD59 expressed on human periodontal ligament cells stimulated with LPS from *P. intermedia* is down-regulated by pre-treatment with TNF- α . Anandamide (AEA), one of endocannabinoids, induced MMP-2 production in human dental pulp cells. MMP-2 might be cleave the complement regulatory factors from cells, and which receive complementary attack. It is likely that inflammatory mediators such as TNF- α and endocannabinoids such as AEA down-regulate the expression of complement regulatory factors and might be cause the tissue destruction in apical region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内治療学、歯内一歯周疾患、補体

1. 研究開始当初の背景

1) 細菌感染に対して宿主は様々な免疫反応を示すことになるが、自然免疫の一つとして補体系が挙げられる。すなわち、細菌の侵入は、①抗体の結合に伴う第一経路 ②マンナン結合タンパクなどが関与するレクチン経路 ③細菌表面上でC3因子の活性化が起こる第二経路のそれぞれの経路により、好中球の遊走を引き起こして炎症巣への白血球の動員を促進し、また食細胞の活性化(オプソニン作用)や膜障害性複合体の形成によって細菌の破壊をもたらす。

2) これに対して、宿主細胞は補体からの攻撃から自らを守る手段として、細胞膜上にCD55 (DAF; Decay accelerating factor)、CD59 や CD46 を発現し、補体による攻撃を回避している。CD55 は C3b/C3b_β 転換酵素と C4b/C4b_{2a} 転換酵素を阻害し、また CD59 は C5-8 あるいは C5-9 複合体に結合し最終的な膜障害性複合体の形成を妨げる、さらには CD46 は C3b あるいは C4b と結合して血漿中の I 因子(セリンプロテアーゼ)による分解を受けやすくすることで補体による溶解を防いでいる。すなわち補体系には、補体の活性化とそれらを制御する分子という2つのバランスが重要であることが示唆される。

2) 根尖性歯周炎および辺縁性歯周炎の発症には、細菌の菌体成分やその産生物が、歯根膜細胞や骨芽細胞などの歯周組織を構成する細胞を刺激して、①サイトカインネットワークの破綻をきたし、②マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP)とその阻害因子(Tissue inhibitor of MMP; TIMP)とのバランスが崩壊させることによって、細胞外基質の産生と分解とのバランスに乱れを引き起こすことが関与していると考えられているが、病的な補体攻撃を受けることにより歯周組織を構成する細胞は細胞死に至ることから、補体系も重要な役割を果たしていると考えられる。

3) 我々はこれまでにヒト歯根膜細胞における各種サイトカインの動態とマクロライド系抗生剤との関係を分子生物学的に解析する一連の研究を行ってきた。例えば、ヒト歯根膜細胞において腫瘍壊死因子(TNF- α)が誘導する血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を、マクロライド系抗生剤であるロキシシロマイシンが転写因子AP-1やSP-1を介して抑制することを明らかにした。また、同じ系にお

いて MMP-1 の誘導をロキシシロマイシンが MAP キナーゼの JNK と ERK を介して抑制する(J Periodontal Res 43, 51-61, 2007)ことも報告した。さらにラット肝臓癌モデルにおいて、ロキシシロマイシンが VEGF の産生を減少させることで腫瘍性血管新生を抑制する(Anticancer Res 25, 133-138, 2005)ことを明らかにした。また最近、ヒト歯肉上皮細胞において TNF- α が誘導する MMP-13 の発現をロキシシロマイシンが抑制することも報告した。

4) CD46 等の補体調節因子は MMP によって細胞表面上から切断され、補体攻撃からの防御能力を失うことになる。特発性歯髄炎の原因として種々の疼痛関連物質が知られているが、アナンダマイド(anandamide; AEA)は内因性カンナビノイドの一つであり神経伝達物質であるが、最近、関節リウマチや敗血症等の炎症メディエーターとしても注目されている。しかしながら、ヒト歯髄細胞における MMP の産生に対して AEA がどのように影響しているか、また補体調節因子の発現に与える影響については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、まずヒト歯根膜細胞における補体調節因子の発現について調べ、次にヒト歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 の産生について調べ、炎症-神経-免疫の関連に着目し、根尖部領域(歯髄組織と歯根膜組織とが近接する領域)における歯内-歯周疾患の発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 矯正学的理由で抜歯した小臼歯より歯根膜細胞を採取し分離培養した。ヒト歯根膜細胞における補体調節因子の発現をフローサイトメトリー(CyAn ADP)により解析した。

2) 矯正学的理由で抜歯した小臼歯より歯髄細胞を採取し分離培養した。

①AEAによるMMP-2の産生

培養歯髄細胞を AEA で刺激し、産生された MMP-2 をウェスタンブロット法と ELISA 法にて解析した。

②AEAレセプターの発現

培養歯髄細胞における AEA レセプター(CB1, CB2, TRPV1)の発現をウェスタンブロット法で調べた。

③AEAのMMP-2誘導に対するMAPKの影響

培養歯髄細胞を AEA で刺激し ERK1/2, p38MAPK と JNK のリン酸化をウェスタンブロット法で解析した。また、培養歯髄細胞を U0120 (ERK1/2 阻害剤), SB203580 (p38MAP 阻害剤) と SP600125 (JNK 阻害剤) で前処理した後に AEA で刺激し、産生された MMP-2 をウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

1) ヒト歯根膜細胞における補体調節因子の発現 フローサイトメトリーによりヒト歯根膜細胞上の補体調節因子 (CD59, CD55 と CD46) の発現を解析すると、すべての調節因子の発現が認められた (図 1)。また、ヒト歯根膜細胞において、TNF- α (10 ng/mL) で 24 時間前処理した後に LPS (10 μ g/mL) で 3 日間

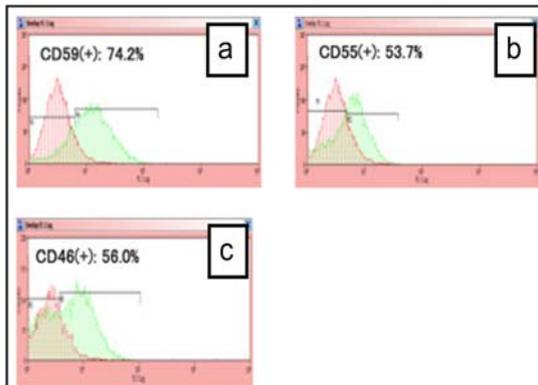


図 1 ヒト歯根膜細胞における補体調節因子の発現 a:CD59, b:CD55, c:CD46

刺激すると、前処理しないものに比べて CD59 の発現が抑制されることが認められた (図 2)。

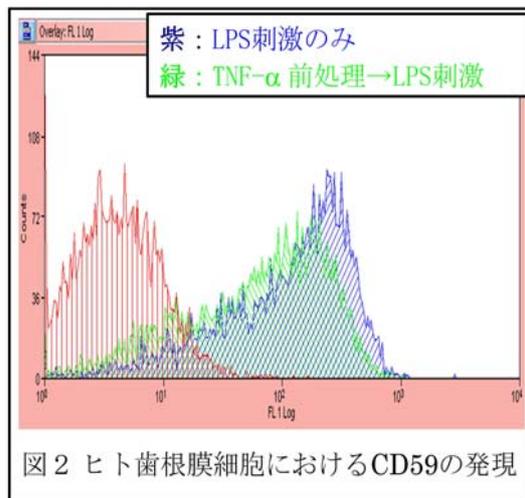


図 2 ヒト歯根膜細胞における CD59 の発現

2) ヒト歯髄細胞における AEA による MMP-2 産生の誘導

①AEA による MMP-2 産生の誘導: ヒト培養歯髄細胞を AEA (10 μ M) で種々の時間刺激し培養上清を回収した後、含まれる MMP-2 をウェス

タンブロット法と ELISA 法で解析すると MMP-2 産生の誘導が認められた (図 3 (A): ウェスタンブロット法 図 3 (B): ELISA 法)。

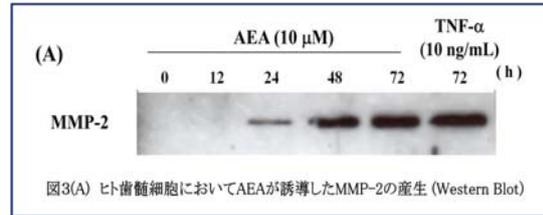


図 3(A) ヒト歯髄細胞において AEA が誘導した MMP-2 の産生 (Western Blot)

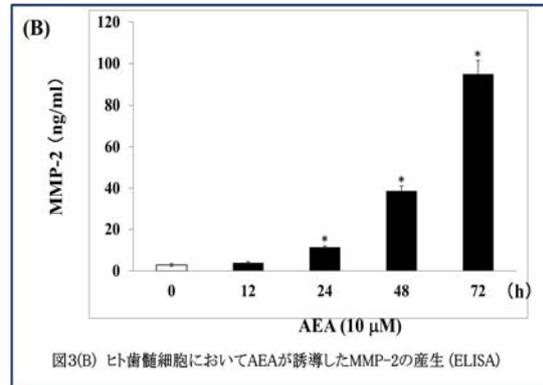


図 3(B) ヒト歯髄細胞において AEA が誘導した MMP-2 の産生 (ELISA)

②ヒト歯髄細胞における AEA レセプターの発現: ヒト培養歯髄細胞における AEA レセプター (CB1, CB2, TRPV1) の発現をウェスタンブロット法で解析すると、歯髄細胞には 3 種類すべての AEA レセプターの発現が認められた (図 4)。また、AEA が誘導する MMP-2 の産生は、CB1 と TRPV1 に対するアンタゴニスト (CB1; AM251, TRPV1; capsazepine) により抑制されたが、CB2 に対するアンタゴニスト (SR144528) はその産生に影響を与えなかった (図 5)。

③AEA が誘導する MMP-2 の産生に関与する

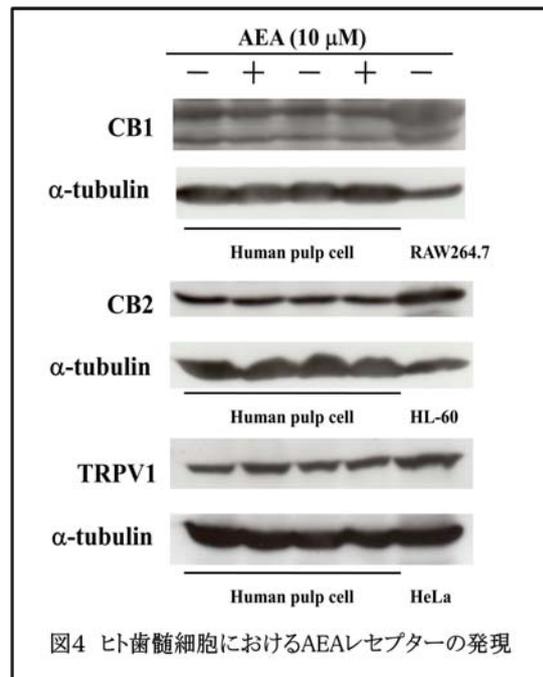
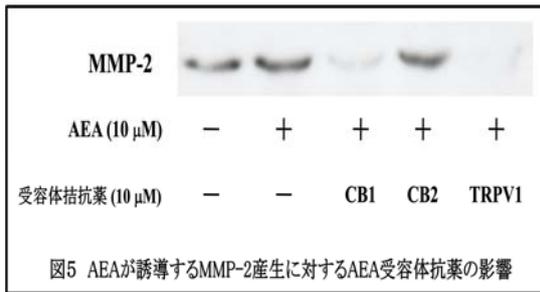
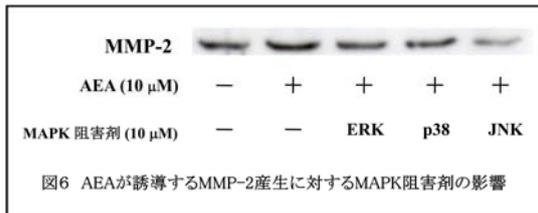


図 4 ヒト歯髄細胞における AEA レセプターの発現



MAPK：ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 の産生は、SP600125 (JNK 阻害剤) によって著しく抑制され、また U0126 (ERK 1/2 阻害剤) と SB203580 (p38 MAPK 阻害剤) によっても弱いながら抑制を確認することができた (図6)。

以上の結果より、特発性歯髄炎において歯



髄領域に産生されると考えられる AEA は、歯髄細胞に作用し MMP-2 の産生を誘導する。産生された MMP-2 は歯根膜細胞上の補体調節因子 (CD59, CD55 や CD46) の細胞外領域を切断し、補体攻撃にさらされ易くなり炎症の増悪へとつながることが示唆された。根尖部においては歯髄組織と歯根膜組織とが相互に影響していることが予想され、AEA や MMP-2 を標的とした薬剤が補体調節因子の発現を介して歯内一歯周疾患の新たな治療薬として応用される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Miyashita K, Oyama T, Sakuta T, Tokuda M, Torii M

Anandamide induces matrix metalloproteinase-2 production through cannabinoid-1 receptor and transient receptor potential vanilloid-1 in human dental pulp cells in culture.

J Endod 38, 786-790, 2012, 査読あり

DOI: 10.1016/j.joen.2012.02.025

[学会発表] (計 3 件)

(1) 藤沢真理、徳田雅行、森本陽子、小山徹、作田哲也、宮下桂子、鳥居光男

高浸透圧下でのマウス象牙芽細胞における細胞内転写因子と炎症性因子の発現

日本歯科保存学会、2013 年 6 月 5 日、熊本

(2) 宮下桂子、小山徹、作田哲也、森本陽子、藤沢真理、徳田雅行、鳥居光男
ヒト歯髄細胞培養系においてアナンダマイドは Cannabinoid-1 receptor, Transient receptor potential vanilloid-1 を介して MMP-2 産生を誘導する

日本歯科保存学会、2012 年 6 月 29 日、沖縄

(3) 徳田雅行、作田哲也、小山徹、梶原武弘、達山祥子、川上克子、森本陽子、江本真規子、藤沢真理、宮下桂子、藤島慶、鳥居光男

ヒト歯肉線維芽細胞における TNF-α 誘導性の MMP-1 産生に対するインクレチン関連薬の影響

日本歯科保存学会、2012 年 6 月 29 日、沖縄

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作田 哲也 (SAKUTA TETSUYA)

鹿児島大学・歯学総合研究科・助教

研究者番号：20284888

(2) 連携研究者

鳥居 光男 (TORII MITSUO)

鹿児島大学・歯学総合研究科・教授

研究者番号：30116066

小山 徹 (OYAMA TOHRU)

鹿児島大学・歯学総合研究科・助教

研究者番号：60233623

宮下 桂子 (MIYASHITA KEIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号：50636264