

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 6 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791842

研究課題名（和文） RNA 干渉を応用した効果的な歯髄組織再生治療への取り組み

研究課題名（英文） Approach for effective pulp tissue regeneration using RNA interference

研究代表者

藤原 英明（FUJIWARA HIDEAKI）

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：20405781

研究成果の概要（和文）：

本研究では、歯の組織の一部である歯髄細胞の炎症の進行において、どのようにサイトカイン（細胞から放出されるタンパク質）が作用しているかを調べた。また、歯髄細胞の再生を阻害する炎症をコントロールする方法についても調べた。

本研究から得られた成果として、サイトカインの一種であるインターロイキン-6（IL-6）が歯髄細胞の炎症増悪に関与している可能性があることが示された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate the effect of interleukin (IL) -6 on the dental pulpitis and to control inflammation.

These studies indicated that IL-6 leads the progression of the dental pulpitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

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：歯内療法・細胞分化・細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科医療の分野において Minimal Intervention (MI) の概念が提唱され、齲蝕の進行した症例においても可及的に歯髄を保存し、積極的に失われた硬組織を再生させることを目標とした研究が数多く報告されている。現在までに水酸化カルシウム、接着性レジンや抗菌剤を応用した覆髄法、さらに bone morphogenetic protein (BMP) による歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導²と

いう研究報告もなされている。これら歯髄・象牙質複合体の再生に線維芽細胞増殖因子 (FGF) -2 を応用する研究もみられるが、FGF は本来、線維芽細胞をはじめとするさまざまな細胞に対して増殖活性や分化誘導など多彩な生理作用を示す多機能性細胞間シグナル因子であり、FGF-2 は歯周組織再生療法への応用としても注目されている。

しかし、齲蝕や外傷などによる歯髄組織の炎症部位にはインターロイキン (IL)

-1、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF) - α などの炎症性サイトカインが存在し、組織の反応や修復に影響を与えることが考えられている。例えば、歯髄に炎症が生じると二次象牙質や象牙粒などの硬組織形成がみられ、また、歯周組織では bFGF (FGF-2) の産生が健全な歯周組織よりも歯周炎罹患部位に少ないことが報告されている。おそらくは、炎症の存在が細胞の増殖や分化になんらかの影響を与えており、これらの成因に炎症性サイトカインの関与が推測される。歯髄においても同様の影響が予測され、歯髄・象牙質複合体の再生に障害となる可能性もある。

RNA interference (RNAi ; RNA 干渉) は、二本鎖 RNA が相補的な配列をもつ mRNA を分解することによって遺伝子の機能を抑えるという現象で、遺伝子機能抑制法として利用されている。RNAi は基礎研究の一手法にとどまらず、現在、医科の分野では癌やウイルス感染症の治療など、臨床応用を目指した研究報告も多数なされている興味深い分野である。

しかし、歯科の分野ではまだ RNAi の臨床応用を試みる研究報告は少ない。歯髄組織に及んだ炎症への歯髄組織の反応を制御することで「より効果的な再生療法の成果を得る」ことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

歯科治療において歯内療法、とくに抜髄処置は歯髄を除去するという、歯にとっては不可逆的処置となる。現在では歯髄を極力保存する治療法や歯髄再生療法についての研究が多くなされている。歯髄再生療法については多くの方法が検討されているが、実際に臨床で再生療法を適用する場合には患歯の歯髄組織に炎症が存在している可能性もある。

しかし、歯髄再生療法の研究において炎症の影響に関する報告は少ない。本研究では、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (recombinant human IL-6, R&D systems) を使用し、歯髄組織の炎症が歯髄の再生に与える影響と、より効果的な歯髄再生療法の検討を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞

細胞は、岩手医科大学附属病院歯科医療センター歯周病外来を受診した患者より治療上の理由で抜去された歯から、通

法にしたがって採取・分離した歯髄細胞を用いた (岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認済み)。培養は、10%の割合でウシ胎児血清 (Gibco) を含む α -MEM

(Invitrogen) を用いて 37°C、5%CO₂ 存在下で行った。なお、4-9 代継代培養した培養歯髄細胞を実験に供した。実験の対照として同条件下で培養した歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞を供した。

(2) 歯髄細胞における IL-6 刺激伝達

歯髄細胞および歯根膜細胞における IL-6 刺激伝達を調べるため、各々の培養細胞に IL-6 (10 ng/ml)、IL-6+sIL-6R (各 10 ng/ml) および sIL-6R (10 ng/ml) を 10 分間作用させた。その後、細胞を回収し、ウエスタンブロット法にて MAPKs (ERK1/2) のリン酸化の程度を調べた。

(3) Real time PCR 法による FGF-2 mRNA 発現

線維芽細胞増殖因子 (FGF) -2 は線維芽細胞などの細胞増殖を促進させる因子であり、IL-6 が歯髄細胞の FGF-2 mRNA 発現にあたる影響について、real time PCR 法にて定量した。

全 RNA の抽出には RNeasy® Mini Kit (Qiagen, USA) と QIAshredder (Qiagen) を用いて行った。得られた全 RNA から Omniscript RT Kit (Qiagen) を用いて Oligo d(T)法にて cDNA を合成した。

合成した cDNA を QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) のプロトコールに従いサンプル調整後、LightCycler™ (Roche Diagnostics, Germany) にて real time PCR 定量分析を行なった。

(4) IL-6 による歯髄細胞の VEGF 産生性

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、歯髄細胞の最も強力な血管浸潤誘導因子であり、歯髄炎病巣に見られる angiogenic な状態を誘導し、その進展・悪化において重要な役割を果たすものと想定されている。炎症の進展過程には様々なサイトカインネットワークが関与しており、IL-6 が歯髄細胞の他の炎症増悪因子にあたる影響について、歯髄細胞を IL-6 (10 ng/ml)、IL-6+sIL-6R および sIL-6R (10 ng/ml) で刺激し、24 および 48 時間培養した後、培養上清を回収し、ELISA kit (R&D systems) を用いて VEGF 産生量を定量し

た。

(5) RNA 干渉 (RNAi) による歯髄細胞 IL-6 受容体 (IL-6R) 発現抑制効果の検討

RNAi が歯髄細胞の炎症の制御に有効であるか、IL-6 存在下で歯髄細胞の IL-6R を RNAi でノックダウンし、VEGF mRNA 発現への影響について調べた。RNAi には HiPerFect Transfection Reagent と IL-6R siRNA (共に Qiagen) を使用した。歯髄細胞を培養 24 時間後に 5nM siRNA を添加した。siRNA 添加 24 時間培養後、サンプルを回収し、real time PCR 法にて VEGF mRNA 発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 歯髄細胞における IL-6 刺激伝達の解明

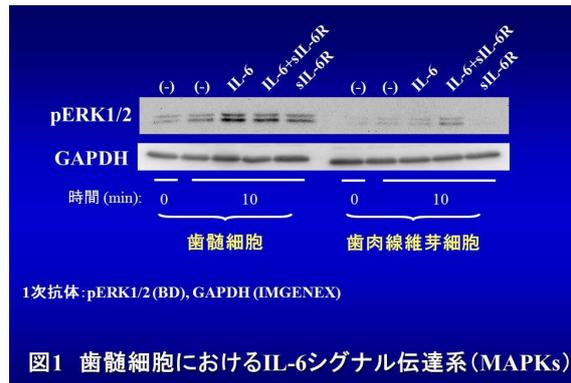
歯髄細胞における IL-6 のシグナル伝達系についてリン酸化 ERK を指標にして調べた (図 1)。IL-6 の標的細胞膜上に存在する IL-6 受容体は、分子量 130kDa の糖タンパク質 gp130 と会合して細胞内にシグナルを伝達する。また、IL-6 受容体には、膜結合型 IL-6 受容体の他にヒトの血清や尿に存在する分泌型の可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) が存在する。可溶性受容体も膜結合型受容体と同程度の IL-6 親和性を示す。sIL-6R は膜結合型 IL-6 受容体切断酵素の働きによる Shedding、あるいは選択的スプライシングによって生じ、膜結合型と同様にシグナル伝達能を有する。また、sIL-6R は単独では機能せず、IL-6-sIL-6R 複合体が gp130 と会合することによって初めてシグナル伝達を行うことができる。

従来、歯肉線維芽細胞は機能レベルで膜結合型 IL-6 受容体を発現しない細胞であるという報告がなされ、IL-6 単独では歯肉線維芽細胞に作用できないとされてきた。一方、gp130 は発現するので、IL-6 のシグナル伝達には、炎症性細胞などが産生する sIL-6R の存在が必須である。

今回の実験でも歯肉線維芽細胞では、これまでの報告どおり、IL-6/sIL-6R 添加群でのみリン酸化が誘導された。

一方、歯髄細胞では IL-6/sIL-6R 添加群に加えて、IL-6 単独の添加群で ERK のリン酸化が誘導される結果となった。歯髄のおもな構成細胞は線維芽細胞であるが、同じ線維芽細胞であっても歯肉と歯髄とでは異なる結果となったことはまだ報告されていない。IL-6 のシグナル伝達系が細胞によって異なり、複数の伝達経路が存在する可能性があることが示唆さ

れた。



(2) Real time PCR 法を用いた FGF-2 mRNA 発現に対する IL-6 の作用

FGF-2 の mRNA 発現量は IL-6 添加により濃度依存的に減少し、IL-6 の 1 および 10 ng/ml 添加群は FGF-2 mRNA 発現量を有意 ($p < 0.05$) に抑制した (図 2)。

FGF-2 は、線維芽細胞の増殖を促進する分子として、それぞれ脳、脳下垂体から発見されている。特に、骨・軟骨形成や中枢神経などでの多彩な生理作用が報告され、注目を集めている。歯科領域においては、FGF-2 の歯周組織の再生に関する研究報告および歯周治療へ応用した臨床試験が実施されている。

現在、象牙質や歯髄の再生に関する研究について、生体外で歯髄細胞に BMP 遺伝子を電気的に導入し、それを生体内の露髄面に移植することで象牙質を再生させるとする歯髄幹細胞を用いた BMP の生体外遺伝子導入や生体吸収性材料と接着性レジンを用いた覆髄法、また rhBMP-2 や connective tissue growth factor を用いて象牙質再生を促進させる研究が報告されている。近年では FGF-2 の臨床応用に関する研究報告も見られるようになり、Kikuchi らはラットの臼歯に人工的に作製した露髄面に対し、FGF-2 を取り込んだゼラチンハイドロゲル含有コラーゲンスポンジの修復象牙質形成能について報告している。この研究から、FGF-2 の放出がコントロールされない場合には、残存している歯髄細胞を過剰な修復象牙質形成へ誘導するのみで、露髄面の欠損象牙質を修復しなかったのに対し、FGF-2 の放出をコントロールしたグループでは、歯髄細胞による象牙質が欠損した露髄面

へ象牙質様の石灰化粒子の形成を誘導し、自らは象牙芽細胞もしくは象牙芽細胞様細胞の機能的マーカーである dentin sialoprotein を発現したことが示されている。

さらに、Ishimatsu らは、FGF-2 を取り込んだゼラチンハイドロゲル含有コラーゲンスポンジから放出される FGF-2 濃度について検討した結果、適度な量の FGF-2 が放出されることで dentin-bridge 様の構造物を形成したと報告している。この報告より、FGF-2 が象牙質・歯髄複合体の再生に有用であることが示され、歯髄細胞が有している内在性の FGF-2 も同様の働きをしている可能性があるかと推測される。

今回の研究結果から、炎症性サイトカインである IL-6 が歯髄細胞の FGF-2 産生を抑制し、象牙質・歯髄複合体の再生に影響をあたえる可能性が示唆された。

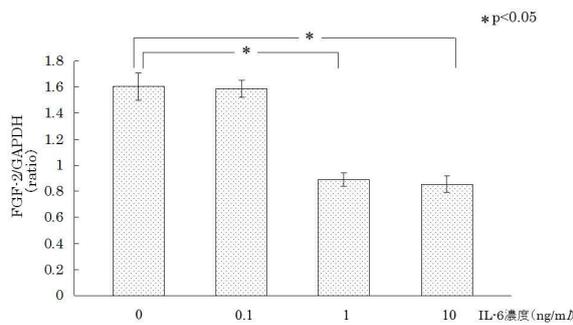


図2 Real-time PCRによる培養歯髄細胞の FGF-2 mRNA発現の解析

(3) IL-6 による歯髄細胞の VEGF 産生性への影響

歯髄細胞を IL-6 および IL-6/sIL-6R で刺激した後の VEGF 産生性調べた結果を示す(図3)。IL-6 単独刺激では、VEGF 産生はほとんど誘導されなかった。一方、IL-6/sIL-6R 刺激では、VEGF 産生が有意に亢進する結果となった。

VEGF は強力な血管新生能・血管透過性を有するサイトカインである。血管新生は既存の血管のうち、おもに細静脈から新たな毛細血管が形成される減少と定義され、生理現象として子宮粘膜、創傷治癒などに認められる。

一方で、病的組織、たとえば固形腫瘍の発育、糖尿病網膜症の眼障害、慢性関節リウマ

チの滑膜組織などの病態に密接に関連し、炎症増悪因子としての一面も知られている。

これまでの研究では、IL-6 が歯肉線維芽細胞の VEGF 産生性に及ぼす影響に関する研究報告がなされている。しかし、歯髄細胞に関する研究報告は少ない。今回の歯髄細胞における IL-6 の VEGF 産生性に関する研究結果では、新たな知見として、IL-6 単独では VEGF 産生はさほど亢進しないが、sIL-6R と複合体を形成することで VEGF 産生性を亢進し、歯髄細胞の炎症増悪に関連していることが示唆された。

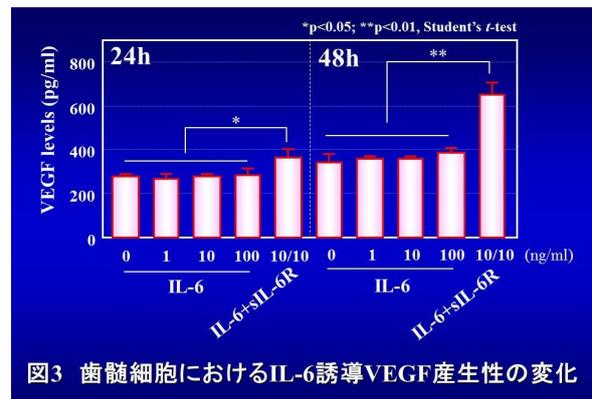


図3 歯髄細胞におけるIL-6誘導VEGF産生性の変化

(4) RNAi による歯髄細胞の VEGF 産生抑制効果

培養歯髄細胞の IL-6R を RNAi により一時的に発現を抑制(ノックダウン)し、IL-6 を培養歯髄細胞に作用させた。その後、IL-6 による培養歯髄細胞の血管内皮増殖因子(VEGF)産生について real time PCR 法にて定量比較した。結果は RNAi を実施していないコントロール群に対し、実験群(RNAi を実施)は、VEGF 産生がわずかに抑制されたが、統計学的有意差は認められなかった(データ未発表)。

この結果は、IL-6R 発現のみを抑制するだけでは効果が限定的である可能性を示唆していると思われる。

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1件)

① 藤原 英明、八重柏 隆、畠山 節子、武田 泰典、石平 洋二、國松 和司、IL-6 が培

養歯髓由来細胞の FGF-2 発現に与える影響、
日本歯科保存学雑誌、査読有、53 巻、2010、
207-213

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 澤田 俊輔、滝沢 尚希、磯島 亜里紗、藤原 英明、金澤 智美、村井 治、八重柏 隆、石崎 明、成石 浩司、歯肉線維芽細胞を標的とした新規融合蛋白 IL-1ra-sgp130 の抗炎症効果の検討、日本歯周病学会春季学術大会、2012 年 5 月 19 日、札幌
- ② 滝沢 尚希、澤田 俊輔、磯島 亜里紗、藤原 英明、大川 義人、村井 治、八重柏 隆、成石 浩司、Caveolin-1 による歯周組織由来線維芽細胞の VEGF 産生誘導、日本歯周病学会春季学術大会、2012 年 5 月 18 日、札幌
- ③ 藤原 英明、成石 浩司、澤田 俊輔、伊東 俊太郎、八重柏 隆、國松 和司、IL-6 によるヒト歯髓細胞の VEGF 産生誘導、日本歯科保存学会秋季学術大会、2010 年 10 月 29 日、岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 英明 (FUJIWARA HIDEAKI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：20405781

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：