

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 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791846

研究課題名（和文）歯髄のプラスミンによる COX-2 産生シグナルと炎症性サイトカインの相互作用

研究課題名（英文）Interaction between inflammatory cytokine and plasmin-induced COX-2 pathways in human dental pulp.

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 COX-2 産生シグナルと炎症性サイトカインとの相互作用を解明することを目的とした。

結果としてプラスミンはヒト歯髄培養細胞においてカルシニューリン、NFAT を介して COX-2 を産生したが、炎症性サイトカインは COX-2 産生シグナルに効果を示さなかった。

研究成果の概要（英文）：

This study clarifies interaction between inflammatory cytokine and plasmin-induced COX-2 pathways in human dental pulp cells. As a result, plasmin provoked COX-2 production via Ca/calcieneurin/NFAT pathways. However, inflammatory cytokine had little or no effect on COX-2 mRNA expression by plasmin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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上急務な課題である。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、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（PA）産生に与える影響、およびプラスミンの細胞に与えるアゴニスト因子としての作用について研究を行ってきた。すなわち、uPA

によって変換されたプラスミンの protease activated receptors (PARs) への作用について検討し、1) ヒト歯髄培養細胞では PAR-1、2、4 が恒常的に発現していること、2) プラスミンは、ヒト歯髄培養細胞において PAR-1 を活性化させ、細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させること、3) また、PAR-1 活性化が、IL-8 の mRNA の発現を増強させることや、作用 10 分後におけるプロスタグラ

ンジン (PG) E₂ の細胞内からの遊離が促進することを確認し、プラスミンがヒト歯髄培養細胞に対して PAR-1 を介して炎症性反応を惹起することを報告した。続いて申請者はプラスミンによる PGE₂ の合成および分泌について、さらに詳細な研究を進め、プラスミンがヒト歯髄培養細胞において、4) 作用 30 分で cyclooxygenase (COX) -2 mRNA の発現およびタンパク質産生が促進し、5) 1 時間後に PGE₂ の分泌が促進すること、カルシニューリン阻害剤 FK506 を用いた実験で、6) プラスミンによる COX-2 産生には細胞内における Ca²⁺-カルシニューリンシグナリングを介することまで明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 点に絞って研究を進めた。

① プラスミンによる COX-2 産生シグナルの詳細な解明

カルシニューリンの標的転写因子である nuclear factor of activated T cells (NFAT) 動態を検索する必要があると考えられたため、刺激後の細胞の核内外でタンパク質画分を分け、ウェスタンブロット法にて NFAT の局在を検討した。また、NFAT の核内における COX-2 プロモーター配列との結合を確認する目的で、転写活性の測定を行った。

② 炎症性サイトカインと Ca²⁺-カルシニューリンシグナリングとの相互作用

プラスミンによる Ca²⁺-カルシニューリンシグナリングと炎症性サイトカインとの相互作用について、[Ca²⁺]_i 動態、COX-2 mRNA 発現、PGE₂ 産生量をそれぞれ検討した。

3. 研究の方法

① ヒト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 プラスミンによる NFAT を介した COX-2 産生シグナルの解明

ウェスタンブロット法

細胞内タンパク質を、核内および細胞質画分に分け、プラスミン作用後の NFAT 局在の

変化を検討する。ヒト歯髄培養細胞のタンパク質画分の分離は Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen) を用いてサンプルを調整した。抗 NFATc1~c4 抗体には (anti NFATc1, c2, c3, c4, monoclonal antibody; Santacruz) を使用した。

③ 炎症性サイトカインと Ca²⁺-カルシニューリンシグナリングとの相互作用の検討

1) [Ca²⁺]_i 動態の測定

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した。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) 炎症性サイトカインの COX-2 mRNA 発現およびタンパク質産生への相乗効果

・ RT-PCR 法

Pre-denaturation は 30min 50 °C と 15min 95 °C、Denature : 94 °C 30 秒、Annealing : 55 °C 30 秒、Extension : 72 °C 30 秒-----25cycles、Final extension 72 °C 10 分の条件で行った。

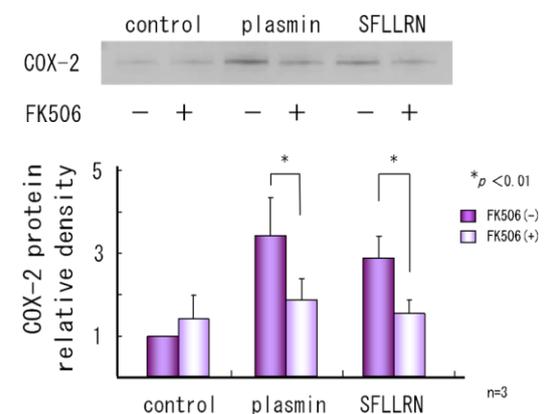
・ ウェスタンブロット法

抗 COX-2 抗体には (anti COX-2 monoclonal antibody; Cayman) を使用した。

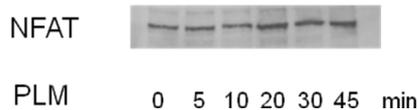
3) PGE₂ 産生量測定

PGE₂ EIA kit (Cayman) を用いて測定した。

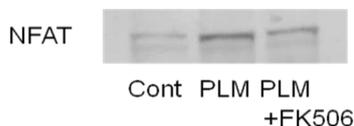
4. 研究成果



①カルシニューリン阻害剤である FK506 存在下では、プラスミンおよび PAR-1 活性化剤による COX-2 タンパク質発現は有意に抑制された。



② プラスミンは刺激後 20 分から核内への NFAT 輸送を、促進する傾向が認められた。



③ プラスミンによる核内への NFAT 輸送を、FK506 は抑制した。

④ NFATc-1 転写活性の測定を、Transfactor NFATc-1 chemiluminescent kit を用いて検討を行ったところ、転写活性の上昇傾向を認めたが、有意差は認められなかった。

⑤ 炎症性サイトカインと Ca^{2+} -カルシニューリンシグナリングとの相互作用を行うにあたり、代表的な炎症性サイトカインである IL-1b および TNF-a を用いて行った。

第一に、COX-2 mRNA 発現の変化について検討を行ったが、それぞれ単独作用と同等な発現の変化を認めたが、相乗効果は認められなかった。

本研究では、炎症性サイトカインとの相乗効果は認められなかったが、今後の課題として、カルシウムシグナルに深く関与する protein kinase C の活性化とプラスミンシグナルについて検討を行っていく予定である。

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 2 件)

① Muromachi K, Kamio N, Matsumoto T, Matsushima K. Role of CTGF/CCN2 in reparative dentinogenesis in human dental pulp. 査読あり. J Oral Sci. 2012;54(1):47-54.

② Muromachi K, Kamio N, Narita T, Annen-Kamio M, Sugiya H, Matsushima K. MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration. 査読あり. J Cell Biochem. 2011 Dec 1. doi: 10.1002/jcb.24007.

[学会発表] (計 4 件)

① Muromachi K, Kamio N, Hashizume H, Matsushima K. MMP-3 Induced CTGF/CCN2 Expression In Human Dental Pulp Cells IADR General Session July 14-17, 2010 Barcelona Spain

② ヒト歯髄培養細胞において CTGF/CCN2 は MMP-3 により産生され細胞遊走および石灰化に関与する
室町幸一郎, 神尾直人, 成田貴則, 神尾素代, 細谷史規, 山浦賀弘, 三浦孝司, 杉谷博士, 松島潔
日本歯科保存学会 2011 年春季学術大会
2011 年 6 月 9 日, 東京ベイ舞浜ホテル

③ ヒト歯髄培養細胞における CTGF/CCN2 の発現と石灰化への関与
室町幸一郎, 神尾直人, 成田貴則, 神尾素代, 杉谷博士, 松島 潔
第 4 回日本 CCN ファミリー研究会
2011 年 8 月 27 日, アークホテル岡山

④ ヒト歯髄培養細胞におけるエンドサイトーシスを介した MMP-3 による CTGF/CCN2 発現調節
室町幸一郎, 神尾直人, 成田貴則, 神尾素代, 杉谷博士, 松島潔
日本歯科保存学会 2011 年秋季学術大会
2011 年 10 月 21 日, 大阪国際交流センター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○ 取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし