

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792459

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来細胞における炎症応答抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of inflammatory mechanisms in deciduous dental pulp fibroblasts

研究代表者

原田 京子 (HARADA, Kyoko)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80434794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳歯歯髄由来線維芽細胞において、種々のサイトカインやMMP、抗炎症作用を持つアデノシンがどのように関連しているかについて解明し、歯髄炎に対する治療指針の可能性の範囲を拡大させることを目的とし研究を行った。初年度は、TNF- $\alpha$ 、LPSおよびアデノシンが最も乳歯歯髄細胞に影響を及ぼす濃度について、またそれらによってMMP2産生能に有意な変化がみられることを明らかにした。次年度は、TNF- $\alpha$  刺激によるMMP2産生が、PI3-K阻害剤であるLY294002により抑制されたことより、MMP-2産生はPI3-Kを介していることが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether TNF- $\alpha$  affected the production of MMP-2 in deciduous dental pulp fibroblasts and its signaling pathways utilizing gelatin zymography and western blotting analysis. TNF- $\alpha$  increased the expression of MMP-2 in a dose-dependent manner in deciduous dental pulp fibroblasts. LY294002 and Wortmannin, which are PI3-K inhibitors, inhibited the MMP-2 production induced by TNF- $\alpha$  in deciduous dental pulp fibroblasts. Moreover, in deciduous dental pulp fibroblasts cultured with TNF- $\alpha$ , AKT was phosphorylated in a time-dependent manner with the maximum phosphorylation at 30 min, and LY294002 and Wortmannin abolished this phosphorylation of AKT in TNF- $\alpha$ -stimulated deciduous dental pulp fibroblasts. These results suggest that TNF- $\alpha$  may enhance pulp tissue destruction during pulp inflammation in part by regulating MMP-2, and that the AKT pathway is involved in MMP-2 production in deciduous dental pulp fibroblasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：乳歯歯髄

### 1. 研究開始当初の背景

齲蝕及び歯周病に代表される歯科疾患は、その発病や進行により歯の喪失へと繋がるため、食生活や社会生活等に支障をきたし、ひいては、全身の健康に影響を与えるものとされている。現在、歯の喪失が10歯以下であれば食生活に大きな支障を生じないとの研究<sup>1)</sup>に基づき、生涯にわたり自分の歯を20歯以上保とうという8020運動が提唱・推進されている。歯の喪失原因の約9割が齲蝕と歯周病で占められていることから、各ライフステージに応じた適切な齲蝕・歯周病予防を推進することが重要である。特に乳歯の齲蝕と永久歯の齲蝕には強い関連が認められ、乳幼児期は基本的歯科保健習慣を身につける時期として非常に重要であり、生涯を通じた歯の健康づくりに対する波及効果も高いと言える。近年、乳歯齲蝕は減少傾向にあるとされているが、必ずしも楽観を許す状態ではないとの報告もある。乳歯が齲蝕や歯髄炎に罹患した場合には、出来る限り早期に発見し修復、保存していくことで、良好な乳歯列咬合状態を確保することができ、その結果、健全な後続永久歯の萌出が誘導される。齲蝕はミュータンス連鎖球菌により齲窩が形成され、また齲窩にグラム陰性菌が増殖することによって、歯髄炎、歯髄壊死などの症状へと進展する。これらは、プラーク細菌由来リポポリサッカライド(LPS)、マトリックステアーゼなどが原因であり、このような炎症時には歯髄において好中球などの免疫担当細胞の浸潤、炎症性サイトカインの産生がみられることが知られている。近年口腔内領域において、線維芽細胞より産生され抗炎症作用を持つ、ATP由来のエネルギー代謝産物アデノシンが注目されている。またアデノシン受容体にはA1、A2a、A2b、A3の4つのサブタイプの存在が報告されているが、その中でもA2a受容体は炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6など)刺激により、その発現が上昇すること、また炎症反応や創傷治癒過程に積極的に関与していることが報告されている。さらにアデノシン受容体は、マクロファージおよび線維芽細胞などに発現していることが明らかにされている。そこで本研究では、結合組織の修復、再生、リモデリングに深く関与している乳歯歯髄由来線維芽細胞について、その特異性について検討し、炎症反応の抑制機序を解明したい。

### 2. 研究の目的

本研究では、結合組織の修復、再生、リモデリングに深く関与している線維芽細胞、特にその能力の高い乳歯歯髄由来線維芽細胞の特異性を遺伝子発現に着目して解析し、さらに炎症部位の組織破壊をもたらす種々のサイトカインやMMPが、どのように関連しているかについて解明する。それにより歯髄炎に対する治療指針の可能性の範囲を拡大させるとともに、幹細胞として有用である歯

髄細胞の保存に向けて再生医療への路を拓くことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)乳歯歯髄由来線維芽細胞は、歯根が2/3以上残存する健全乳歯で、抜去したものを分割し歯髄組織を剥離し、約2×2mmの組織片に切り出し、一定時間初期付着を行ったのち増殖してくる細胞を初代培養乳歯歯髄由来線維芽細胞として継代を行う。本研究には5~8継代した細胞を用いた。また本学医の倫理委員会の承認を得て行った。

(2)乳歯歯髄由来線維芽細胞の増殖率をMTT assayにより吸光度を測定し評価した。

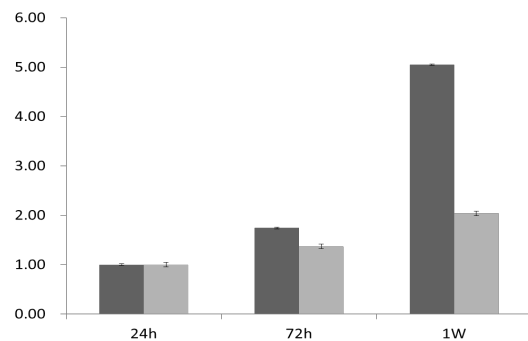
(3)メタルプロテアーゼ産生能は乳歯歯髄由来線維芽細胞をTNF- $\alpha$ 、LPSおよびアデノシンにて24時間処置後、上清中のMMP-2、MMP-9をザイモグラフにより算出した。上清中のMMP-1、MMP-3、MMP-8、MMP-13はウエスタンブロッティングにより検討した。

(4)MMP産生のメカニズムについて解析するために、PI3-K阻害剤についてウエスタンブロッティングを用いて検討した。

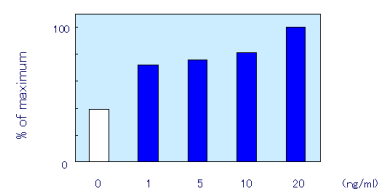
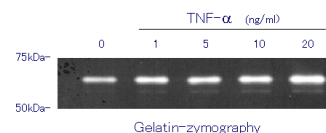
(5)乳歯歯髄由来線維芽細胞に特有な遺伝子発現を確認するために、マイクロアレイを行った。

### 4. 研究成果

(1)乳歯歯髄由来線維芽細胞(■)は、永久歯(□)と比較して有意に高い細胞増殖能を示した。

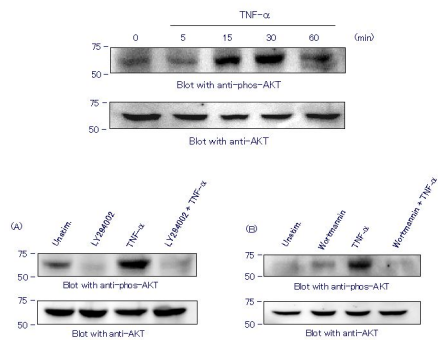


(2)MMP産生については、LPS、TNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ いずれについても、MMP-2産生を有意に増強した。



TNF- $\alpha$  刺激による MMP-2 産生の変動

(3) TNF- $\alpha$ によるMMP-2産生について焦点を絞り、PI3-K阻害剤を用いてその経路について検討を行った結果、TNF- $\alpha$ によるAKTのリン酸化がPI3-K阻害剤LY294002およびWortmanninにより抑制された。



### TNF- $\alpha$ 刺激によるAKTのリン酸化とPI3-K阻害剤の影響

(4) 乳歯歯髄細胞において、2倍以上の遺伝子発現増強がみられた遺伝子について「Gene Ontology」で分類したところ、「Cell communication」「Cell growth and maintenance」「Development」に分類される遺伝子発現が数多く、永久歯歯髄と比較して有意に増加していた。またインスリン様増殖因子や血管内皮増殖因子といったような、増殖因子の有意な増強が認められた。(表1)

### Biological process (DPFD>DPFP)

<b>cell communication</b>	<b>35.44% (28)</b>
cell-cell signaling	8
cell recognition	1
host-pathogen interaction	5
response to external stimulus	1
signal transduction	13
<b>cell growth and maintenance</b>	<b>39.24% (31)</b>
cell cycle	4
cell growth	5
cell organization and biogenesis	2
cell proliferation	3
metabolism	9
response to stress	1
transport	7
<b>Death</b>	<b>3.8% (3)</b>
cell death	3
<b>Development</b>	<b>20.25% (16)</b>
cell differentiation	4
embryonic development	1
growth	3
regulation of gene expression, epigenetic	7
reproduction	1
<b>viral life cycle</b>	<b>1.27% (1)</b>
	1
<b>Total</b>	<b>100% (79)</b>

表1: 永久歯歯髄 (DPFP) と比較した乳歯歯髄 (DPFD) における「Biological process」分類

### 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)

Kawai S, Harada K, Daito K, Arita K, Ohura K. TNF- $\alpha$  and LPS enhance MMP production in human dental pulp cells of deciduous teeth Journal of Hard Tissue Biology 2012;21(2):151-156. (査読有)

Kawai S, Harada K, Nagata S, Ohura K, Arita K. Effect of 6-bromoindirubin-3'-oxime on human deciduous tooth dental pulp cells Oral Therapeutics and Pharmacology 2012;31(3):87-95. (査読有)

〔学会発表〕(計 5件)

Kyoko Harada, Saki Kawai, Masaharu Takeyasu, Sachiko Nagata, Kenji Arita Effect of 6-bromoindirubin-3'-oxime on human deciduous tooth dental pulp cells 46th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research 2013.9.5 Florence, Italy

河合咲希、原田京子、竹安正治、永田幸子、有田憲司  
ヒト乳歯歯髄由来細胞の未分化能増殖  
第51回日本小児歯科学会  
2013年5月23日 岐阜県

原田京子、河合咲希、岡井有子、大浦清、有田憲司. 無血清培地を用いた乳歯歯髄由来細胞培養における遺伝子発現について. 第22回日本歯科医学会, 2012年11月10日 大阪市

Takeyasu M, Okai Y, Harada K, Kawai S, Kato M, Arita K Expressions of HSP in dental pulp cells of deciduous teeth. Japan China Dental Conference 2012 2012年4月27日 中国成都

Harada K, Kawai S, Okai Y, Takeyasu M, Nagata S, Arita K. Characteristic of dental pulp cells from deciduous teeth by DNA microarray analysis. Japan China Dental Conference 2012 2012年4月27日 中国成都

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田京子 (HARADA, Kyoko)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80434794