

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592870

研究課題名(和文) 歯髄炎の病態形成における象牙芽細胞の細菌侵襲に対する免疫機構の解明

研究課題名(英文) The analyses of the immune system of odontoblast in the pathogenesis of pulpitis

## 研究代表者

高橋 加奈子 (TAKAHASHI, Kanako)

徳島大学・大学院・特任講師

研究者番号：80403715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄炎の原因は細菌であり、歯髄固有である象牙芽細胞に発現した自然免疫に關与するレセプターと細菌性因子との相互作用について解析したところ、ラット由来の象牙芽細胞様細胞であるKN-3細胞においてPattern Recognition Receptor (PRR) の中でもNOD-1およびNOD-2の発現が認められ、PRR特異的リガンドあるいは炎症性サイトカインによりKN-3を刺激するとAlarminやケモカインの産生が認められた。またHMGB1についてはカテキンの添加によりその産生誘導が抑制された。本研究により歯髄炎の病態形成時に象牙芽細胞層においても固有の免疫機構が働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulpitis is an infectious disease followed dental caries, and it finally leads to dental pulp necrosis. The aim of this study was to analyze the interaction of pattern recognition receptor and bacterial factor on dental pulp, especially focused on odontoblast. The expression of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-1 and NOD-2 on KN-3 (Cell lines derived from rat) was observed. So KN-3 was stimulated with PRR specific ligands or inflammatory cytokine, the production of alarmin (HMGB1) and chemokine (MCP-1, CCL20, CXCL3) was observed. HMGB1 production was inhibited by the addition of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). These results indicated that odontoblast may be play a part in the immuno response in pulpitis.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：歯髄炎 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

現在の臨床において、歯髄を保存できる可逆性歯髄炎か(覆髄適応)除去せざるをえない不可逆性歯髄炎か(抜髄適応)についての診断基準は確立されておらず、歯髄保存の可否に関して正確な診断を行うことができれば、覆髄処置自体が予知性の高い処置になりうると考えられ、従来の覆髄処置の枠を超えた積極的な歯髄保存へと繋がる可能性があり、その貢献度は高いと考えられる。これらのためには、歯髄炎における歯髄細菌の侵襲に対する歯髄免疫応答のメカニズムを理解することは必要不可欠であり、解明すべき重要課題といえる。

歯髄において歯髄細菌の侵入を最初に認識するのは歯髄最表層部に位置する象牙芽細胞であり、象牙芽細胞層は歯髄炎が惹起される際の歯髄細菌に対する第一の防波堤とも言える。歯髄の組織構造として上皮を欠失していることは他の組織と比較して非常に特異な点である。上皮組織は細菌感染に対する第一の防波堤として機能しており、歯髄においては象牙芽細胞が上皮に代わりその役割を担っていることが予想される。通常、上皮には樹状細胞が常駐しており外敵を効率よく察知し監視できるよう長い突起を四方に拡げている。歯髄においても樹状細胞様の細胞が存在することは報告されており、その局在は象牙芽細胞層前線に認められることが報告されている。このことから象牙芽細胞が歯髄の免疫応答開始において重要な役割を果たしていることが推測される。

一般に哺乳類では、病原因子を特異的に認識し病原体を排除する獲得免疫がよく発達しているが、感染初期においては、広範な病原因子を認識する自然免疫が働き、獲得免疫が賦活されるまでの宿主抵抗性に重要な役割を果たしている。このような自然免疫に関与するレセプター(Pattern Recognition Receptor; PRR)としては、Toll like receptor (TLR) や nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) が報告されており、これらのレセプターは様々な病原微生物の特有の構造(pathogen associated molecular pattern; PAMP)(ペプチドグリカン、リポタイコ酸、リポ多糖、iE-DAP、MDP など)を特異的に認識し、自然免疫にかかわる細胞を活性化させることにより病原性細菌に対する抗菌作用を示し、様々な炎症性メディエーター(サイトカインやケモカイン)を産生するようになる。象牙芽細胞においてもTLRが発現していることがStaquetらにより(Adv Dent Res, 2011)、またそれらを介してPAMPsを認識しさまざまなケモカインを産生することがFargesらにより報告されている(J Exp Zool, 2009)。また歯蝕により象牙芽細胞を主軸としたサイトカインネットワークが展開され、樹状細胞やマクロファージとの連携や免疫担当細胞の遊走に重要な役割を果たしていること

も Horst らにより示されている(BMC Immunol, 2011)。

近年、感染や細胞障害により細胞にダメージが蓄積して細胞死が生じると、Alarmin と呼ばれるカテゴリーの細胞内蛋白質(endogenous molecules)が放出され、周囲の組織や細胞へ危険信号を伝達する事が明らかとなった。このような danger signal として、high-mobility-group Box (HMGB) proteins, heat-shock proteins (HSPs), S100 family, IL-1, Hepatoma-derived growth factor (HDGF)、尿酸などが Bianchi (J Leukoc Biol, 2007) により報告されている。また同時に Bianchi は、Alarmin の有する特徴として(1)アポトーシスではない細胞死(nonprogrammed cell death)において放出されること、(2)細胞死以外の場面で産生および放出されることにより免疫担当細胞が誘導されること、(3)樹状細胞を含む自然免疫に関与するレセプターを発現している細胞を活性化し、その結果獲得免疫を賦活化させること、(5)最終的に炎症により破壊された組織を修復することを挙げている。

Park らは Alarmin の一つである HMGB1 が外因性の PAMP と同様に TLR を介して炎症性反応を惹起する事を報告している(J Biol Chem, 2003)。したがって Alarmin は感染時における宿主の生体防御反応において重要な役割を担っていることが推測される。しかしながら歯髄における Alarmin については、Sugars ら(Cell Tissue Res, 2007) が歯髄の発生過程において HMGB1 が発現していることを報告しているのみであり、歯髄炎の病態形成における Alarmin の産生・放出についての報告は皆無である。

## 2. 研究の目的

歯髄炎の病態成立において歯髄固有である象牙芽細胞に焦点を当て、象牙芽細胞に発現した PRR と細菌性因子との相互作用について解析し、象牙芽細胞の細菌侵襲に対する免疫機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 正常あるいは炎症歯髄組織中の象牙芽細胞層における PRR と Alarmin の発現を検索する。
- (2) 培養象牙芽細胞を各 PRR リガンドや炎症性サイトカイン、もしくは歯蝕細菌や細菌性因子(精製した細菌由来タンパクなど)で刺激し、Alarmin の発現・産生について検討する。
- (3) 上記(2)の条件にて刺激を行う際に抗菌物質(カテキンなど)を添加し、その影響を検討する。
- (4) 培養象牙芽細胞を Alarmin で刺激し、炎症性サイトカインやケモカインの産生について検討する。またその産生に関与するシグナル伝達経路を各阻害剤を用いて解析する。

(5) 上記(4)の条件下で抗菌物質(カテキン)を添加し、炎症性メディエーター産生に与える影響を検討する。

#### 4. 研究成果

第一段階としてラット由来の株化細胞で象牙芽細胞の特性を有した KN-3 細胞を使用し、KN-3 細胞上における PRR 発現を FACS にて解析したところ、細胞内レセプターである NOD1 および NOD2 の発現を認めた。しかしながら TLR-2, TLR-4 の発現はほとんど認められなかった。

第二段階として KN-3 細胞を PRR 特異的リガンド (TLR-2; Pam3CSK4, TLR-4; *E. coli* LPS) あるいは炎症性サイトカイン (IL-1, TNF-, IFN-) にて一定時間刺激し、培養上清中への Alarmin (HMGB1) の産生・放出を Western blot 法にて解析した。その結果、各刺激物質により刺激後 24 時間で培養上清中に HMGB1 の放出が認められた。また、この HMGB1 の培養上清中への放出はカテキンの一種である epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の添加により抑制された。この培養上清中への HMGB1 の放出を ELISA 法にて定量したところ、HMGB1 の放出は全ての刺激物質において認められたが、コントロールと比較して各刺激物質との間に有意差は認められなかった。しかしながら EGCG を添加することによってこれらの HMGB1 放出は抑制された。

また KN-3 細胞におけるケモカイン産生について検討するために PRR 特異的リガンドや TNF- にて KN-3 細胞を刺激し、培養上清を回収し抗体アレイ法や ELISA 法にて解析した。その結果、TNF- や NOD1 リガンドである iE-DAP 刺激において培養上清中の MCP-1, CCL20, CXCL3 濃度の上昇が認められた。また、各リガンドで刺激した KN-3 細胞から total RNA を回収し real-time PCR 法にて解析したところ、iE-DAP 刺激において MCP-1, CCL20, CXCL3 の mRNA 発現の増加が認められた。

本研究により歯髄最表層に存在する象牙芽細胞において細菌由来物質により Alarmin やケモカインの産生が誘導されることが確認され、歯髄炎の病態形成時に象牙芽細胞層においても固有の免疫機構が働いている可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

Yumoto H, Hirao K, Tominaga T, Bando N, Takahashi K, Matsuo T  
Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factor via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways  
Cellular Physiology and Biochemistry,

査読有, 35, 2015, 601-605

10. 1159/000369722

Takegawa D, Nakanishi T, Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Matsuo T

Modulatory roles of interferon-through indoleamine 2, 3-dioxygenase induction in innate immune response of dental pulp cells

Journal of Endodontics, 査読有, 40, 2014, 1382-1387

10. 1016/j.jopen. 2014. 03. 018

Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R, Miyake Y

Effect of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of *Streptococcus intermedius* biofilm

Journal of Applied Microbiology, 査読有, 115, 2013, 260-270

10. 1111/jam. 12202

Yumoto H, Tominaga T, Hirao K, Kimura T, Takahashi K, Sumitomo T, Bando N, Matsuo T

Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation

Journal of Applied Microbiology, 査読有, 113, 2012, 181-191

10. 1111/j. 1365-2672. 2012. 05307x

[学会発表](計 10 件)

細川由樹, 湯本浩通, 平尾功治, 高橋加奈子, 松尾敬志

イグサ抽出液のオーラルヘルスケア製品への応用に関する研究

第 141 回日本歯科保存学会

2014/10/30-31

山形テルサ(山形県山形市)

平尾功治, 湯本浩通, 中西正, 篠原千尋, 高橋加奈子, 武川大輔, 細川由樹, 松尾敬志

ラット象牙芽細胞様細胞(KN3)における細菌関連病原因子刺激に対する自然免疫反応の解析

第 140 回日本歯科保存学会

2014/6/19-20

滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県大津市)

Nur Asikin, Hirota Katsuhiko, Yumoto Hiromichi, Hirao Kouji, Takahashi Kanako, Murakami Keiji, Miyake Yoichiro

Homologous and heterologous extracellular DNAs affect *Pseudomonas aeruginosa* to produce more pyocyanin without inducing bacterial growth

第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会

2013/10/12-13

広島国際大学メディアホール(広島県呉市)

Nur Asikin, Hirota Katsuhiko, Yumoto Hiromichi, Hirao Kouji, Takahashi Kanako, Murakami Keiji, Matsuo Takashi, Miyake Yoichiro

Effect of extracellular DNA on pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa*

第27回 Bacterial Adherence&biofilm 学術集会

2013/7/12

東京ガーデンパレス(東京都文京区)

弘田克彦, 湯本浩通, 村上圭史, 平尾功治, 高橋加奈子, 松尾敬志, 三宅洋一郎

*Streptococcus intermedius* ヒストン様タンパク質の PAMPS としての解析

第22回 Lancefield レンサ球菌研究会 & 第45回 レンサ球菌感染症研究会

2013/6/28-29

ホテル島根イン青山パインコート (東京都港区)

Nur Asikin, Hirota Katsuhiko, Yumoto Hiromichi, Hirao Kouji, Takahashi Kanako, Murakami Keiji, Miyake Yoichiro

Biological roles of extracellular DNA of *Streptococcus intermedius*

第65回 日本細菌学会中国・四国支部総会

2012/10/20-21

徳島大学長井記念ホール(徳島県徳島市)  
Nur Asikin, 弘田克彦, 湯本浩通, 平尾功治, 高橋加奈子, 村上圭史, 松尾敬志, 三宅洋一郎

Role of extracellular DNA and DNA-binding protein in biofilm formation of *Streptococcus intermedius*

第26回 Bacterial Adherence&Biofilm 学術集会

2012/7/13

大阪ガーデンパレス(大阪府大阪市)

Yumoto Hiromichi, Tominaga Toshihiko, Hirao Kouji, Bando Naoki, Sumitomo Takashi, Takahashi Kanako, Matsuo Takashi

Signaling pathways and gene expression activated by electro-magnetic-wave in osteoblastic-cells

International association for dental research general session

2012/6/20-23

Iguaçu Falls (ブラジルパラナ州)

Hirao Kouji, Yumoto Hiromichi, Hirota Katsuhiko, Liu Dali, Asikin Nur, Takahashi Kanako, Matsuo Takashi, Miyake Yoichiro

Global gene analysis in monocytes stimulated with *Streptococcus* histone-like protein

International association for dental research general session

2012/6/20-23

Iguaçu Falls (ブラジルパラナ州)

Nur Asikin, Hirota Katsuhiko, Yumoto Hiromichi, Hirao Kouji, Takahashi Kanako, Murakami Keiji, Matsuo Takashi, Miyake Yoichiro

Roles of extracellular DNA and DNA-binding protein in cell aggregation, biofilm formation and antibiotic tolerance of *Streptococcus intermedius*

第21回 Lancefield レンサ球菌研究会 & 第44回 レンサ球菌感染症研究会合同開催

2012/6/8-9

大阪大学歯学研究科弓倉記念ホール(大阪府吹田市)

〔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:  
出願年月日:  
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

高橋 加奈子 (TAKAHASHI, Kanako)  
徳島大学・病院・特任講師  
研究者番号: 80403751

### (2) 研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号: 60284303  
平尾 功治 (HIRAO, Kouji)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号: 00581399

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：