

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792039

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PKCの活性化

研究課題名(英文) Involvement of plasmin-induced COX-2 expression and PKC activation.

研究代表者

神尾 直人(Kamio, Naoto)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10508774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、plasminによるCOX-2産生シグナルにおけるPKCの関与について解明することにある。結果としてplasminによるCOX-2産生は、細胞内カルシウムプールからのカルシウムイオンの放出と細胞外からの流入により構成されることが推察された。また、COX-2産生にはPKCシグナルが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the involvement of Plasmin-induced COX-2 and PKC activation. As a result, plasmin evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and COX-2 expression, which consisted of Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular pools and Ca<sup>2+</sup> entry from extracellular sites in human dental pulp cells. Further, PKC signaling is also involved in COX-2 production by Plasmin

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：歯髄 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 Plasmin の protease activated receptors (PARs) を介したシグナル伝達と、それによる歯髄炎への影響について検討し、Plasmin がヒト歯髄培養細胞において、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、1 時間後に PGE<sub>2</sub> 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、Plasmin による COX-2 産生には細胞内における Ca<sup>2+</sup>-カルシニューリンシグナリングを介すること、カルシニューリンの標的転写因子である nuclear factor of activated T cell (NFAT) が核内輸送され COX-2 プロモーター配列に結合することまで明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本申請の目的は上記した背景を詳細に説明することにある。すなわち 細胞外 Ca<sup>2+</sup>非存在下、および Thapsigargin 作用下の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、COX-2 mRNA 発現の変化の検索。PKC 活性化剤、阻害剤による NFAT 挙動および COX-2、PGE<sub>2</sub> 産生量の変化の検索。を行うことでプラスミンが PAR-1 を介して COX-2 を産生し新たな炎症カスケードを惹起することが詳細に解明される。特に、Ca<sup>2+</sup>/Cn/NFAT シグナリングが COX-2 の産生を誘導する報告は少なく、さらに PKC による複雑な調節機構の一部が解明されることで、歯髄特有の急性的な臨床症状さらには不可逆的な進行の病態の究明に結びつくのではないかと申請者は期待する。

## 3. 研究の方法

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。

細胞外 Ca<sup>2+</sup>非存在下、および Thapsigargin 作用下の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、COX-2 mRNA 発現の変化の検索。

### 1) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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 カバーク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った。

### 2) RT-PCR 法

10 cm cell culture dish にて培養された歯髄細胞の total RNA を RNeasy kit (QIAGEN<sup>®</sup>) にて抽出した。0.1mg total RNA を COX-2 および GAPDH の各プライマーを用い One step RT-PCR kit (QIAGEN<sup>®</sup>) にて cDNA 合成および増幅反応した。Pre-denaturation は 30min 50 と 15min 95、Denature: 94 30 秒、Annealing: 55 30 秒、Extension: 72 30 秒-----25cycles、Final extension 72 10 分の条件で行った。

Plasmin、PMA の COX-2 タンパク質産生量に対する PKC 阻害剤の影響。

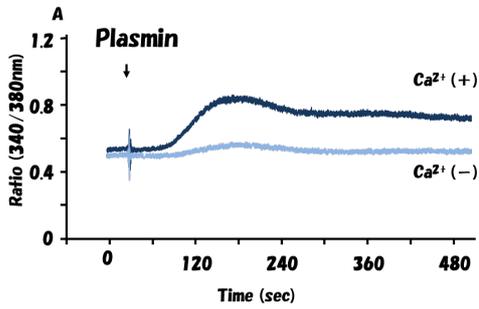
### ・ウェスタンブロット法

細胞内 COX-2 タンパク質の検出は、ヒト歯髄培養細胞を EGTA、EDTA 添加 Lysis Buffer にて回収後、SDS sample buffer にてサンプルを調整した。サンプルは SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、ニトロセルロース膜へ転写した。抗 COX-2 抗体に anti COX-2 monoclonal antibody; Cayman を、二次抗体として HRP 標識 抗ラビット IgG 抗体を作用させた後、ECL kit を用いて化学発光を行い、X 線フィルム上に感光し観察した。

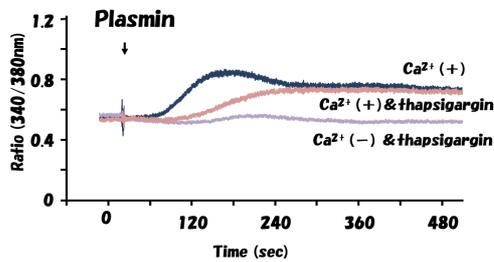
## 4. 研究成果

1) Plasmin による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に与える細胞外 Ca<sup>2+</sup> および小胞体 Ca<sup>2+</sup> ATPase 阻害剤の影響

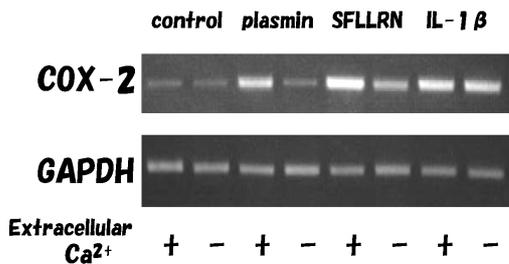
細胞外カルシウム非存在下では、Plasmin による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は有意に抑制された。



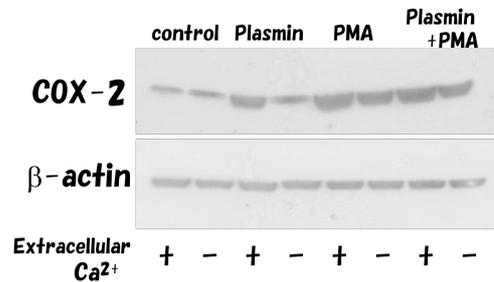
小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤である Thapsigargin 存在下では、Plasmin による  $[Ca^{2+}]_i$  の一過性の流入は抑制された。



細胞外カルシウム非存在下では、Plasmin、SFLLRN の COX-2 mRNA 発現量は減少したが、IL-1 による発現には影響を与えなかった。



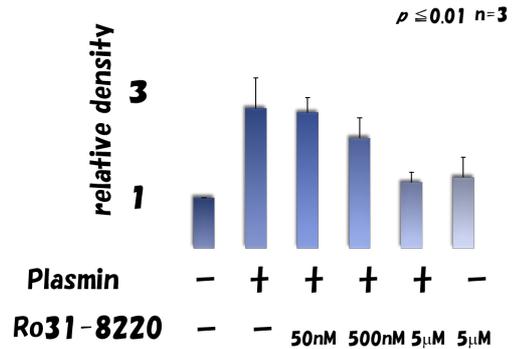
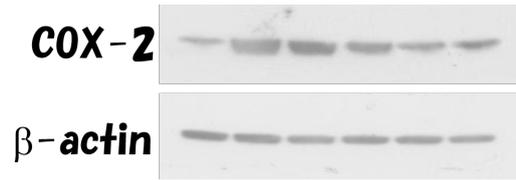
細胞外カルシウム非存在下では、Plasmin の COX-2 タンパク質産生量は減少した。PMA による COX-2 産生はわずかに減少傾向にあった。



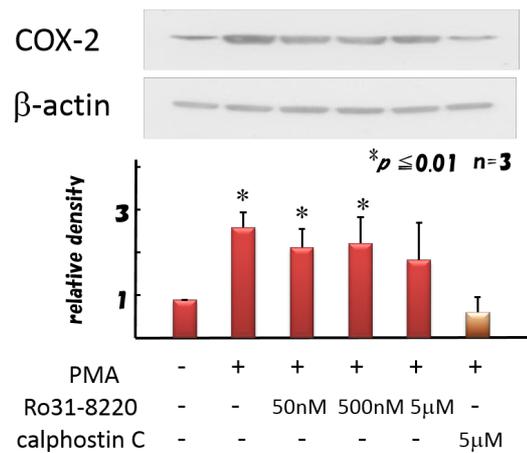
2) Plasmin、PMA の COX-2 タンパク質産生

量に対する PKC 阻害剤の影響。

Plasmin による COX-2 タンパク質産生量は、PKC 阻害剤である Ro31-8220 により濃度依存的に抑制した。



PMA による COX-2 タンパク質産生量は、PKC 阻害剤である Ro31-8220 により濃度依存的に抑制した。



細胞外  $Ca^{2+}$ 非存在下においても Plasmin は  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を引き起こすが有意に減少し、さらに COX-2 タンパク質発現を抑制した。これは、Plasmin による COX-2 タンパク質発現には主に細胞外からの流入による  $Ca^{2+}$  が関与することを意味すると同時に、細胞質内ストアからの  $Ca^{2+}$ 放出メカニズムも存在することが示唆された。細胞外  $Ca^{2+}$ 非存在下で小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤である Thapsigargin は、Plasmin による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を抑制した。このことから、小胞体から

の放出されるメカニズムがあると考えられた。PKC 阻害剤である Ro31-8220 は、Plasmin による COX-2 タンパク質発現を有意に抑制した。これまでに Plasmin による COX-2 タンパク質発現には  $Ca^{2+}$ -calcineurin-NFAT 経路の関与を示してきたが、PKC シグナルも関与することが示唆された。

研究者番号：10508774

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates expression and secretion of urokinase plasminogen activator in human dental pulp cells.

Narita T, Muromachi K, Kamio N, Nakao S, Matsushima K, Hashizume H.

J Oral Sci. 2012;54(4):329-36. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

Plasmin による COX-2 産生シグナルと細胞内カルシウムイオン濃度の変化

神尾直人, 室町 幸一郎, 葉山 朋美, 松島 潔

139 回日本歯科保存学会学術大会

2013.10.18

秋田県秋田市 総合生活文化会館

ヒト象牙質・歯髄複合体におけるメタロプロテアーゼと CTGF/CCN2 発現

室町幸一郎、神尾直人、松島潔

第 55 回 歯科基礎医学会サテライトシンポジウム(第 5 回 日本 CCN ファミリー研究会を兼ねる)シンポジスト講演

2013.9.20

岡山県岡山市 岡山コンベンションセンター

BMP - 1 はヒトう蝕歯でプロテアーゼ活性非依存的に CTGF/CCN2 発現を促進する

室町幸一郎、神尾直人、松島潔

第 9 回世界歯内療法会議

2013.5.25

東京都千代田区 東京国際フォーラム

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔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・助教