

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861803

研究課題名(和文) 歯髄炎の病態形成におけるAlarminレセプターの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Alarmin receptors in the pathogenesis of pulpitis

研究代表者

平尾 功治 (HIRAO, Kouji)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：00581399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： Alarminは細胞が壊死すると分泌される内因性の免疫賦活物質であり、敗血症において症状の重篤化を生じさせる重要な因子であり、歯髄炎においても急速な歯髄壊死に重要な役割を担っているものと考えられる。そこで本研究ではalarminとそのレセプターに焦点を当て、歯髄炎におけるalarminの役割と機能について解析し、歯髄炎治療の可能性を検討した。

その結果、ラット象牙芽細胞にはalarminレセプターであるMincleが発現し、その発現は細菌関連因子刺激により自然免疫を介して増加すること、さらにMincleリガンドであるTDMがKN-3のCCL4産生を増強することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Alarmins, endogenous immunofactors secreted to necrosis are an important factor that becoming serious of sepsis, it hypothesized to have an important role to rapid progression of pulp necrosis in pulpitis. In this study, I focused on alarmin and its receptor, analyzed for alarmin role and function in pulpitis.

As the result, Mincle which is one of the alarmin receptor is expressed in rat odontoblastic cells (KN-3) and, its expression is increased by stimulation with Pathogen-associated molecular patterns. Moreover, I demonstrated that CCL4 mRNA expression is up-regulated by the stimulation with TDM which is Mincle ligand.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄炎 象牙芽細胞 alarmin Mincle

1. 研究開始当初の背景

昨今、口腔の健康が健康で質の高い生活を営む上で重要な役割を果たしていることが明らかとなり、また平成 23 年に歯科口腔保健の推進に関する法律(歯科口腔保健法)が制定されたことにより、歯科界にはいっそう歯を残すことへの期待が高まっている。

歯髄炎はう蝕に继发する感染症であり、一旦感染源が歯髄組織に波及すると早期に歯髄壊死となり、歯髄組織を除去せざるを得ないことが知られている。しかしながら、歯髄を除去された歯は脆く破折等の転機を辿ることも多く、予後は必ずしも良好ではなく、歯を喪失する原因となっている。

そのため、近年、歯髄を温存することを目指して、歯髄炎の病態の把握や歯髄保存のための材料の開発が行われている。申請者は、これまでに培養歯髄細胞を用いた歯髄炎モデルにおいて、細菌由来因子が歯髄の免疫応答を誘発し炎症性サイトカインを産生するメカニズムや、自然免疫の歯髄炎における役割について解析し、培養歯髄細胞において細菌の構成成分である Pam3CSK4 や LPS, MDP といった細菌の構成成分が Toll-like receptor (TLR)2 ,TLR4 ,Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)2 等の自然免疫に参与するレセプターを介して炎症性サイトカインを産生させることを報告している。(Hirao et al. J Dent Res. 2009)。また、申請者らはポリフェノール類の一種であるカテキン、特に Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG)が歯髄細胞において、このような自然免疫に参与する細菌由来物質によって産生された炎症性サイトカインやケモカインの発現を抑制することを報告している(Hirao et al. Life Sci. 2010)。

近年 Heat shock protein や High mobility box1 (HMGB1)等の alarmin と総称されるタンパク質が自然免疫や細胞死に関連して産生、放出されることが明らかとなった。alarmin はアポトーシスではなくネクローシス細胞や免疫担当細胞から産生、分泌され、自然免疫系を含む受容体を介して免疫応答を賦活化する内因性物質であると定義される。これら alarmin は敗血症において、重症化し細胞壊死が生じると細胞外に放出され、症状の重篤化を引き起こすことが明らかとなってきた。すなわち、alarmin は病態の重症化を促す後期メディエーターとして重要な役割を果たしていると考えられる。歯髄組織においても、感染し炎症状態が生じると早期に不可逆変化が生じ、激痛を引き起こす。このような症状の重篤化には alarmin の関与が疑われ、培養歯髄細胞において HMGB-1 や HSP の産生が報告されている。一方、壊死組織から分泌される alarmin を認識する分子として Macrophage-inducible C-type lectin (MINCLE) が着目されている。MINCLE は壊死細胞より放出される

Spliceosome associated protein (SAP)130 を認識するほか、種々の細菌を認識することが明らかとなってきており、自己組織の破壊の感知のみならず、自然免疫にも関与するレセプターとして注目されている。

しかしながら、歯髄組織において、alarmin を認識するレセプターについては調査されておらず、また、臨床的に歯髄組織における alarmin の存在も未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

歯髄をより積極的に保存すべく、歯髄炎憎悪もメカニズムの解明は急務である。本研究では歯髄炎の急速な進行に参与すると考えられる alarmin に着目し、歯髄炎における alarmin とそのレセプターの役割と機能について解析し、新たな歯髄炎治療の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラット象牙芽細胞様細胞として、KN-3 細胞を使用した。なお、培養には 10% FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレptomycin (life technologies, Carlsland, CA, USA) を添加した α -Eagle's Minimal Medium (life technologies)を用い、5% CO₂ 存在下、37 °Cにて培養した。

(2) KN-3 細胞の自然免疫応答の解析

まず、KN-3 細胞の免疫応答能を調査するため、KN-3 細胞を 24-well plate に播種し、サブコンフルエントまで培養後、2% FBS 含有培地に交換し 24 時間後に TLR2 リガンドである Pam3CSK4 (invivogen, San Diego, CA, USA)、TLR4 リガンドである LPS (invivogen)、NOD1 リガンドである iE-DAP (invivogen)、NOD2 リガンドである MDP (Sigma-Aldrich)や炎症性サイトカインである TNF- α (PEPROTECH, Rocky Hill, NJ, USA)で一定時間刺激し、培養上清、細胞蛋白、total RNA を回収した。

培養上清は RayBio Cytokine Antibody Array (RayBiotech, USA)を用い、培養上清中のサイトカイン濃度の増加を網羅的に解析するとともに、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法を用い、そのプロトコールに従い、培養上清中の CCL20 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、CINC1 (R&D), CINC2 (R&D), MCP-1 (PEPROTECH)といったサイトカインの濃度を定量した。

細胞蛋白は、RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, USA)にて回収し、BCA 法を用い蛋白濃度を定量後、SDS-PAGE を行い、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法にて蛋白発現の解析を行った。

total RNA は NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL, Germany)を用い、

回収・精製後、PrimerScript RT Master Mix (タカラバイオ、滋賀)にてcDNA合成を行い、半定量的RT-PCRならびにreal-time RT-PCR法にてmRNAの発現解析を行った。

(3) フローサイトメトリー法

KN-3細胞を6-well plateに播種し、セミコンフルエントまで培養後、Trypsin-EDTA溶液にて回収し、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、TLR2 (BioVision Milpitas, CA USA), TLR4 (IMGENEX, San Diego, CA USA), NOD1 (NOVUS BIOLOGICALS, Littleton, CO USA), NOD2 (Abnova, Jhouzih St, Taipei, Taiwan)の特異的抗体にて1次標識を行った。FITC標識された2次抗体にて反応後、フローサイトメーター (EPICS XL; Beckman Coulter, USA)を用い、細胞膜上に発現する蛋白の解析を行った。なお、NOD1, NOD2といった細胞質内蛋白の確認には、Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences, San Jose, CA USA)を用い、細胞膜透過性を亢進させた後、1次標識を行った。

(4) KN-3細胞のalarminレセプター発現と機能解析

KN-3細胞をiE-DAPで刺激した後、total RNAを回収し精製後、alarminレセプターであるMINCLEのmRNAの発現をStepOnePlus real-time System (applied biosystems)を用いreal-time RT PCR法にて解析した。

さらに、MINCLEの特異的リガンドであるtrehalose 6, 6'-dimycolate; TDM (Innaxon, UK)でKN-3細胞を刺激し、total RNAを回収、精製しRT2 Profiler PCR Array (QIAGEN)を用い、MINCLEを介した免疫反応について網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

(1) KN-3細胞の自然免疫応答解析

KN-3細胞に発現する自然免疫系レセプター (PRRs: Pattern recognition receptors)である、TLR-2, TLR-4, NOD-1, NOD-2の発現をフローサイトメトリー法を用いて解析を行ったところ、TLR2とTLR4の発現は微弱であり、NOD1, NOD2の細胞内での発現が認められた(図1)。

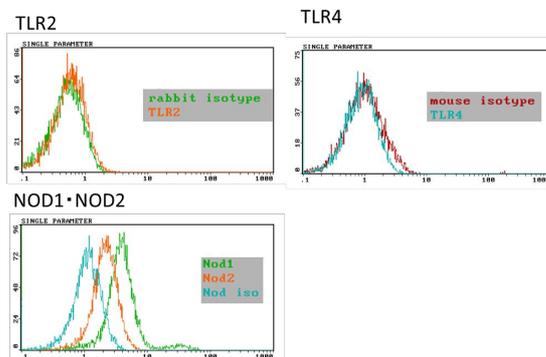


図1 KN-3細胞におけるPRRsの発現

次に、各種自然免疫レセプターの特異的リガンド (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns)にてKN-3細胞を24時間刺激し、培養上清、total RNAを回収した。Cytokine antibody arrayならびにELISAの結果、NOD1リガンドであるiE-DAP刺激において、CCL20, CXCL2/3, MCP-1, CINC-1の産生増強が確認された(図2A)。また、mRNAについても、同様にCCL20, CXCL2/3, MCP-1, CINC-1の発現増強が認められた(図2B)。

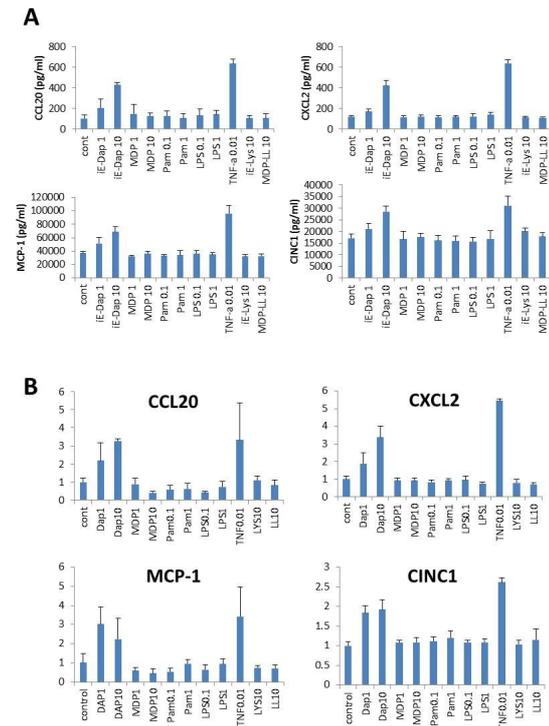


図2 KN-3細胞の自然免疫応答

(2) KN-3細胞におけるalarminレセプターの発現解析

KN-3細胞においてalarminレセプターの発現を調査した。リアルタイムPCRの結果、KN-3細胞はMINCLEのmRNAを発現し、その発現はiE-DAP刺激により増強することが明らかとなった(図3)。

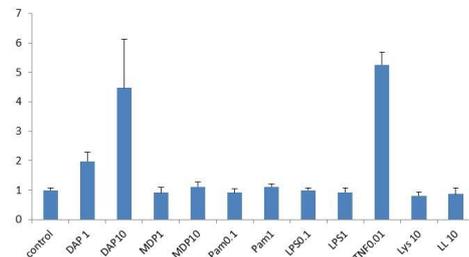


図3 KN-3におけるPamps刺激でのMINCLE mRNAの発現

さらに、MINCLE蛋白の発現をウェスタンブロット法を用いて調査を行ったが、明らかな発現は認められなかった。

(3) KN-3 細胞における MINCLE の機能解析

KN-3 細胞における MINCLE の機能を解析するため、KN-3 細胞を iE-DAP にて 24 時間刺激し、total RNA を回収後、PCR array 法を用い、発現が増強されるサイトカインの網羅的な探索を行った。その結果、KN-3 細胞は TDM 刺激により CCL4 の mRNA を増加されることが明らかとなった。

次に、iE-DAP 刺激によって増加した MINCLE の発現を確認するため、KN-3 細胞を iE-DAP で 24 時間刺激し、PBS にて洗浄後、TDM にて一定時間刺激し、total RNA を回収し、リアルタイム PCR 法を用い、CCL4 の mRNA 発現を解析した。その結果、iE-DAP 前処理群において顕著な CCL4 の mRNA 発現増加が認められ、iE-DAP 刺激によって発現が増加した MINCLE が CCL4 の産生に関与していることが示唆された(図 4)。

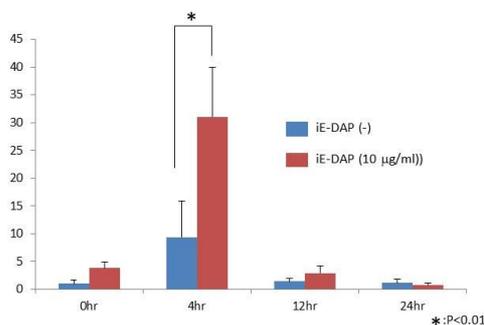


図4 iE-DAP前処理におけるKN-3細胞のTDM 刺激に対する、CCL4 mRNA発現の変化

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)

Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R, Miyake Y. Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *Journal of applied microbiology*, 2013 Jul;115(1):260-270. doi: 10.1111 査読有

[学会発表](計4件)

Kouji Hirao, Hiromichi Yumoto, Yuki Hosokawa, Chihiro Shinohara and Takashi Matsuo. Functional Roles of NOD1 in Odontoblasts on Pulp innate Immunity. 第62回国際歯科研究学会 日本支部総会・学術大会 2014年12月5日 KKR ホテル大阪 (大阪府・大阪市)

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 (KN-3) 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 日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会 2014 年 6 月 20 日 滋賀県立芸術劇場 (滋賀県・大津市)

平尾功治、湯本浩通 細菌関連病原因子によるラット象牙芽細胞の自然免疫反応の解析 第87回日本細菌学会総会 2014年3月26日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Hiromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Kouji Hirao, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake and Takashi Matsuo. Pathogenic roles of Streptococcal histon-like protein in microbial infection. The 13th Joint Scientific Meeting of JSCD-KACJ 2013年11月23日 The K Hotel&Resort (Gyeongju, Korea)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平尾 功治 (HIRAO, kouji)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00581399