

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670824

研究課題名(和文) 歯髄細胞由来TNF誘導因子(DPTIF)受容体の探索研究

研究課題名(英文) Investigation for the receptor of dental pulp cell-derived tumor necrosis factor-alpha inducing factor (DPTIF)

研究代表者

西村 英紀(NISHIMURA, FUSANORI)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80208222

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)：歯髄細胞(線維芽細胞様細胞)はマクロファージからのTNF- α 産生を誘導する因子を分泌することを見出し、本分子を歯髄細胞由来腫瘍壊死因子誘導因子(Dental Pulp Cell-derived Tumor Necrosis Factor- α Inducing Factor: DPTIF)と命名した。本研究では、その性状を明らかにし、対応する受容体を探索することを目的とした。その結果、DPTIFはトリプシン感受性のあるタンパクを含む細胞外に放出される微粒子に関連した分子であること、したがって表層の受容体は存在しない可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously found that dental pulp cells produces molecules inducing tumor necrosis factor alpha from macrophages, and named this factor Dental Pulp Cell-derived Tumor Necrosis Factor- α Inducing Factor: DPTIF. In this study, we aimed to unveil the nature of this molecule and to investigate the possible receptor and/or binding proteins. The results indicated that DPTIF contains trypsin sensitive protein molecule but is associated with extracellular microvesicles. Therefore, it appeared that DPTIF is directly incorporated into macrophages rather than binding to the cell surface receptor.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄細胞 急性炎症 マクロファージ TNF- α 内毒素

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、歯髄細胞(線維芽細胞様細胞)はマクロファージからの TNF-α 産生を誘導する因子を分泌することを見出し、本分子を歯髄細胞由来腫瘍壊死因子誘導因子(Dental Pulp Cell-derived Tumor Necrosis Factor-Inducing Factor: DPTIF)と命名した。歯髄組織でひとたび炎症が惹起されると、局所で激しい炎症反応が持続し、組織は急激に融解壊死を起こし、通常数日以内に完全に失活する。すなわち、この病態形成に DPTIF が重要な役割を担っていると推察される。しかしながら、DPTIF の本態については依然、不明なままである。

2. 研究の目的

申請者らは、歯髄細胞を human telomerase reverse transcriptase (hTERT) と simian virus 40 (SV40) を導入することで不死化した細胞株 DP-1、埋伏第三大臼歯抜去歯から採取した歯髄組織より分離し、DPTIF 活性の存在を確認している primary 歯髄細胞(hDC)の両者を保有している。不死化細胞は安定的な材料の供給を可能とするとともに、正常ヒト歯髄細胞で TNF-α 誘導能が確認されたことは、DPTIF が少なくとも正常組織で発現していることを強く示唆している。

そこで、本研究では DPTIF の本態を明らかにし、その活性が受容体を介したものであるかについての探索を行い、受容体の性状を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DPTIF の同定を行う目的で、DP-1 と DPTIF 活性のないヒト歯肉由来線維芽細胞(GF) hDC と GF に発現する遺伝子群をマイクロアレイの手法を用いて網羅的に解析し、DP-1 と hDC に高発現する遺伝子を抽出する。

(2) 無血清培地で大量に培養した DP-1 の培養上清を回収し、LS/MS/MS システムを用いたプロテオミクス解析(タンパク質発現・相対定量解析)にかけ、上清中のタンパクの定量解析を行う。既存のデータベースに基づき分泌タンパクを抽出する。

(3) 上記で抽出した遺伝子やタンパクの組み換え製品を用いて、ヒト不死化単球(THP-1 細胞)からの TNF-α 産生性を検証する。

(4) 組み換えタンパクの入手が困難な場合は、small interfering RNA (siRNA) を用い、標的遺伝子をノックダウンした細胞培養上清を採取し、上清中の DPTIF 活性を確認することで、DPTIF の同定を試みる。

(5) 活性が確認された場合、組み換えタンパクに対する抗体を作製あるいは入手し、細胞破碎画分を用いた免疫沈降によって DPTIF に結合するタンパクをプロテオミクスの手法を用いて同定する。

4. 研究成果

(1) DPTIF の活性確認

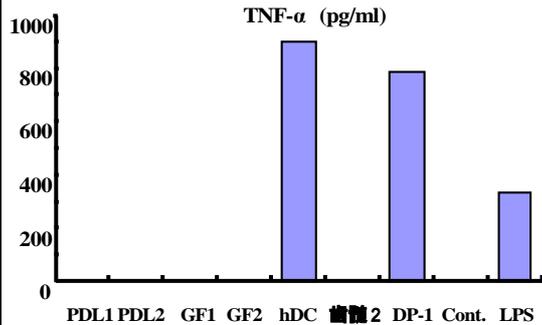


図1 各種培養上清による THP-1 からの TNF-α 産生量

まず、保有する hDC ならびに DP-1 の培養上清を回収し、DPTIF の活性確認を行った。図1に示すように hDC および DP-1 培養上清には強い DPTIF 活性が確認された。この活性は 1ng/ml の E.Coli LPS に匹敵もしくは凌ぐものであり、DPTIF 活性が非常に強いことを示している。

(2) マイクロアレイによる DPTIF 候補分子の探索

hPC>GF	共通	DP-1>GF
MX1	MX1	CXCL1
TFPI2		CXCL1
CXCL1	CXCL1	RPL28
LOC645638		CSF2
LOC645638		TMEM203
IFIT2	IFIT2	OASL
IFIT2	IFIT2	IFI27
SRGN		PITX1
MX2	MX2	CXCL2
SMCR7L	SMCR7L	IL8
KRTAP1-5		CD70
LZTS1		LOC285628
IFIT3	IFIT3	CXCL3
NPM2		
BAMBI		OAS1
OAS2	OAS2	CXCL6
OAS3	OAS3	C3
CTGF		APOBEC3B
LOC400550		PRUNE2
NPR3		CSF3
CCL2		MX1
CCL2		SAA2
CCL2		CXCL2
CCL2		HOXB6
CCL2		PDLIM3
IFIT1	IFIT1	C4orf7
CCL2		RSAD2
CCL2		PNMA2
ERAP2	ERAP2	C3
CCL2		INPP5D
CNN1		NFIB
BATF2	BATF2	TNNT1
CCL2		CLMN
CCL2		HLA-DOA
RAB11FIP1		APOC1
IL6	IL6	GPAT2
SLC2A1		IL1B
IFI6	IFI6	NGEF
EPSTI1	EPSTI1	C1QL4
KRTAP1-5		EYA4

次に、hDC と DP-1 に共通して強く発現している遺伝子群をマイクロアレイの手法を用いて解析した。両細胞で歯肉線維芽細胞との比較で強く発現している遺伝子群の多くは、*cc12* や *cxcl1* などのケモカイン遺伝子や *MX1* や *IFI* などのインターフェロン誘導遺伝子群であった。これらの組み換えタンパクを入手し、DPTIF 活性の確認を試みた。また、組み換えタンパクの入手が困難な分子についてはノックダウンの手法を用い、培養上清を回収後、活性の低下確認を行った。しかしながら、これらのアプローチで活性の確認には至らなかった。

(3) DPTIF のトリプシン感受性試験

上記(2)の遺伝子発現解析で活性の確認に至らなかったことから、DPTIF の本態がタンパクであるか否かについての検証を行うため培養上清をトリプシン消化し、活性の変化を観察した。

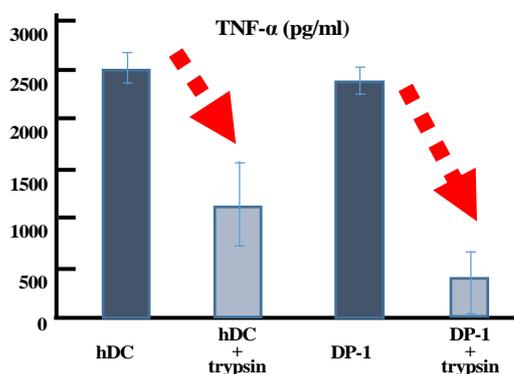


図2 上清のトリプシン処理による活性の変化

図2に示すように、培養上清をトリプシン消化することにより、hDC、DP-1 とともにDPTIFの活性は著明に低下した。

(4) DP-1 培養上清のプロテオミクス解析

上記(3)の結果を受け、DPTIFの本態が少なくとも一部タンパクを含むものと判断し、プロテオミクスの手法を用いて解析を行った。具体的には以下の手順に従った。

DP-1 からの conditioned medium の回収 : DP-1 を通報に従って培養し、細胞がコンフルエントになった時点で、血清無添加の調整培地 (conditioned medium: CM) に培地を交換し、24 時間×2 回、48 時間培養を続けることで、CM を回収する。尚、予備実験において、無血清培地で培養後、回収した培養上清中における DPTIF 活性は確認済みである。また、大量培養 (10L の CM

を回収) については、通常の培養フラスコよりもサイズの大きい付着面積が 225 cm² の培養フラスコを用いた。

LC/MS/MS システムを用いた受託解析によるタンパク発現・定量解析 (受託解析)

受託解析サービスを利用し、1) で回収した上清について、buffer 置換 LC/MS/MS 質量分析によるスペクトル解析 データベースサーチまで受託サービスを利用した (Filgen 社)。

AHNAK Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
VIM Vimentin
BASP1 Isoform 1 of Brain acid soluble protein 1
MYH9 Isoform 1 of Myosin-9
MAP1B Microtubule-associated protein 1B
AKAP12 Isoform 1 of A-kinase anchor protein 12
MAP4 245 kDa protein
MARCKS Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
- 21 kDa protein
PLEC Isoform 1 of Plectin
ACTB Actin, cytoplasmic 1
TUBA1B Tubulin alpha-1B chain
CAST Isoform 6 of Calpastatin
NUCB1 Nucleobindin-1
TUBB2C Tubulin beta-2C chain
RPLP2 60S acidic ribosomal protein P2
SF3B1 Splicing factor 3B subunit 1
TMSB4X TMSB4X protein (Fragment)
B2M Beta-2-microglobulin
TMPO Isoform Beta of Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma

同定されたタンパクの上位 20 について表に示す。多くは、遺伝子発現解析で抽出したものと異なる結果であった。まず、これらを含む上位 300 種類のタンパクデータベースの中から、細胞外への分泌が報告されているタンパクについて、前述した方法で組み換えタンパクあるいはノックダウンの手法で活性の解析を試みた。しかしながら、調べた分泌タンパクに DPTIF 活性は確認できなかった。そこで、プロテオミク

スの結果を詳細に検討した結果、一部細胞外微粒子に関連したタンパクであることが判明した。これを受け、細胞外微粒子を回収し、活性を確認したところ DPTIF 活性の確認ができた。細胞外微粒子はタンパク以外に脂質、マイクロ RNA、mRNA を含有し、目的細胞に取り込まれ作用することから、細胞表層に受容体は存在しないことが推察された。今後、粒子内部の活性を示す分子の確認が重要となるものと結論付けた。

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6件)

1) Takano A, Fukuda T, Shinjo T, Iwashita M, Matsuzaki E, Yamamichi K, Takeshita M, Sanui T, Nishimura F. Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of osteoblast differentiation. *Metabolism* 査読有 69:157-170, 2017.

doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.006

2) Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, Hirata M, Nishimura F. Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts. *Bone* 査読有 93:1-11, 2016.

doi: 10.1016/j.bone.2016.09.003

3) Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T, Shi S, Nishimura F, Yamaza T. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. *Sci Rep* 査読有 6:19286, 2016

doi: 10.1038/srep19286.

4) Fujii S, Fujimoto K, Goto N, Kanawa M, Kawamoto T, Pan H, Srivatanakul P, Rakdang W, Pornprasitwech J, Saskianti T, Suardita K, Nishimura F, Kato Y. Characteristic expression of MSX1, MSX2, TBX2 and ENTPD1 in dental pulp cells. *Biomed Rep* 査読有 3(4):566-572, 2015.

5) Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Hirata M, Nishimura F. Sphingosine-1-phosphate inhibits differentiation of C3H10T1/2 cells into adipocyte.

Mol Cell Biochem 査読有 401 (1-2): 39-47, 2015.

doi: 10.1007/s11010-014-2290-1.

6) Suzuki S, Kobuke S, Haruyama N, Hoshino H, Kulkarni AB, Nishimura F. Adhesive and migratory effects of phosphophoryn are modulated by flanking peptides of the integrin binding motif. *PLoS One* 査読有 (11):e112490, 2014.

doi: 10.1371/journal.pone.0112490

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 英紀 (NISHIMURA, Fusanori)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 80208222

(2) 研究分担者

讃井 彰一 (SANUI, Terukazu)

九州大学・病院・講師

研究者番号: 70507780

(3) 研究分担者

福田 隆男 (FUKUDA, Takao)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 80507781