

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11116

研究課題名(和文)自然免疫を介した象牙芽細胞石灰化メカニズムの解明

研究課題名(英文)The analysis of odontoblastic mechanism via innate immune system

研究代表者

平尾 功治(HIRAO, Kouji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：00581399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、口腔の健康が国民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事は明らかである。歯髄炎は齲蝕に继发する感染症であり、その治療には歯髄除去療法を行うことが一般的である。しかしながら、歯髄を除去された歯は予後が悪く、歯を喪失する原因となる。本研究では、新たな歯髄保護療法の開発のため、歯髄細胞の石灰化メカニズムを解明することを目的として研究を行い、ポリフェノールの一種であるCAPEが新たな歯髄保護療法に活用できる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is clear that the oral health plays an important role for quality of life. Pulpitis is an infectious disease following dental caries, causing an irreversible change in the dental pulp tissue at early stage, and is an indication for pulp removal therapy. However, the tooth removed pulp often follows the outcome such as a fracture, and its prognosis is not necessarily good. In this study, to develop a new dental pulp protection therapy, we aimed to elucidate the mineralization mechanism of dental pulp cells. Our results suggested that CAPE which is a type of polyphenol can be utilized for new dental pulp protection therapy.

研究分野：歯科保存学

キーワード：自然免疫 象牙芽細胞 石灰化 VEGF CAPE

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔の健康が国民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事が明らかとなり、平成 23 年に歯科口腔保健法が制定され、また 8020 運動に代表される、多数の歯を残そうという取り組みがなされている。

歯を喪失する疾患としては、齲蝕と歯周病が挙げられるが、歯髄炎は齲蝕に継発する感染症であり、その治療には歯髄除去療法を行うことが一般的である。しかしながら、歯髄を除去された歯は破折や根尖性歯周炎のリスクが高まり、歯を喪失する原因となる。そのため、近年歯髄を保存することを目的として、歯髄炎の病態の解明や、新規歯髄保護剤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、培養歯髄細胞に Toll-like receptor (TLR)2 や TLR4、ならびに Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)1、NOD2 等の自然免疫に関するレセプター (PRRs: Pattern Recognition Receptors) が発現し、TLR2 ligand である Pam3CSK4、TLR4 ligand である lipopolysaccharide (LPS)、NOD2 ligand である muramyl dipeptide (MDP) といった細菌関連因子 (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns) 刺激により、自然免疫応答を誘発し、炎症性サイトカインを産生することを明らかにするとともに、ポリフェノールの一種であるカテキン、特に Epigallocatechin gallate (EGCG) の抗炎症作用が、PAMPs 刺激によって産生される培養歯髄細胞からのサイトカイン産生を抑制し、歯髄炎治療に有用であると報告している。

象牙芽細胞は刺激に対し修復象牙質を形成し、齲蝕から歯髄組織を保護する役割も担っていると考えられ、近年、象牙芽細胞の石灰化能を利用した暫間的間接覆髄法等の新規治療法が開発され推奨されている。慢性齲蝕病巣に近接した歯髄には修復象牙質が添加されることから、齲蝕細菌の刺激により象牙芽細胞が修復象牙質を形成されることが考えられ、そのメカニズムにおいて自然免疫の関与が疑われる。しかしながら、象牙芽細胞の石灰化能と免疫応答に関する報告はなされておらず、そのメカニズムは不明である。我々は既に、ラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) において自然免疫レセプターである NOD1 が他のレセプターと比較して優位に発現し、その ligand である D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) 刺激に対して CINC-2、MCP-1 といったケモカインを産生することを第 140 回日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会にて報告している。また、KN-3 細胞は石灰化誘導培地にて石灰化物を形成することが報告されており (J Endod. 2007 Oct;33(10):1187-91)、齲蝕病巣からの細菌刺激によって、象牙芽細胞が石灰化することが

示唆される。しかしながら、象牙芽細胞における自然免疫と石灰化能についての報告はなく、歯髄保護療法の開発の上でも自然免疫反応を介した象牙芽細胞の石灰化メカニズムの解明が待たれる。

2. 研究の目的

本研究では、より積極的な歯髄保護法の開発が、歯の喪失を減少させ、QOL の向上に寄与すると考えられることから、象牙芽細胞の石灰化メカニズムを解明することを目的とし、象牙芽細胞石灰化のメカニズムと自然免疫の関与を明らかにすることで、新規歯髄保護療法の開発につなげるものである。

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 ストレプトマイシン (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℃にて培養した。

また、石灰化培養として 24 well plate に 3.0×10^3 個/well の濃度で細胞を播種し、継代翌日に 0.5 % FBS 含有 α -MEM 培地に交換し培養を継続したものを、石灰化モデルとして使用した。

また、同様に石灰化を呈する細胞株としてマウス骨芽細胞 MC3TC-E1 も上記条件で培養し実験に供した。

さらに、これら石灰化能を有する細胞と比較する為に、ヒト歯髄線維芽細胞を使用した。培養には、10% FBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (life technologies, Carlsland, CA, USA) 1 mM ビルビン酸ナトリウム (life technologies)、を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用い、5% CO₂ 存在下、37℃にて培養した。

(2) 試薬

iE-DAP、LPS は InvivoGen (San Diego, USA) より、Pam3CSK4、MDP は Sigma-Aldrich より購入した。Recombinant rat Tumor Necrosis Factor (TNF)- α は Peprotech (USA) より、EGCG、CAPE は Sigma-Aldrich より購入し、CAPE はエタノールにその他の ligand、サイトカインはすべて Phosphate-Buffered Saline (PBS, Life Technologies) に溶解、使用した。

(3) 石灰化能の解析

石灰化培地にて培養した KN-3、MC3T3-E1 を継時的にアリザリンレッドにて染色し石灰化能を確認するとともに、骨形成マーカーとして知られる Alkaline

Phosphatase (ALP) 活性をラボアッセイ ALP (Wako 大阪) を用い定量した。

(4) Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

KN-3 細胞を 24 穴プレートに播種しサブコンフルエントまで培養後、Pam3CSK4、LPS、iE-DAP、MDP といった自然免疫に關与する各種レセプターに特異的なリガンド (Pathogen-Associated Molecular Patterns; PAMPs) で刺激をおこない、6 時間後に NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL, Germany) を用いて total RNA を抽出、精製した。次に、20 ng の RNA を PrimeScrip RT Master Mix (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。dentin sialophosphoprotein (DSPP)、Dentin Matrix Protein (DMP)-1、Runt-related transcription factor (Runx)2、Bone morphogenetic protein (BMP)3、BMP6、Smad1、ALP の特異的プライマーを Roche Universal ProbeLibrary Assay Design Center ProbeFiner ソフトウェアを用いて設計し、合成された cDNA にそれぞれ特異的プライマーを加え、Fast SYBR Green Master Mix ならびに StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いアニーリング温度 60°C で real-time RT-PCR を行い、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量をリファレンスとして、各 mRNA 遺伝子発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量した。

(5) 培養上清中の成長因子の定量

KN-3 細胞ならびに MC3T3-E1 を 24 穴プレートに播種しサブコンフルエントまで培養後、各種 PAMPs ならびにポリフェノールで刺激を開始し、24 時間後に培養上清を回収した。培養上清中の成長因子の濃度の定量には市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (R&D Systems, USA) を用い、波長 450 nm での吸光度を iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, USA) にて測定した。

(6) 統計解析

得られたデータは student *t* 検定を用いて統計学的処理を実施し、 $p < 0.05$ で統計学的有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) PAMPs 刺激が KN-3 細胞の石灰化に与える影響の調査

まず、各種 PAMPs が象牙芽細胞の石灰化を促進するか調べるため、KN-3 細胞を Pam3CSK4、LPS、iE-DAP、MDP で 6 時間刺激し、totalRNA を回収、精製後、RT real-time PCR 法にて解析を行ったところ、DSPP、DMP-1、Runx2、BMP3、BMP6、

Smad1、ALP といった、石灰化に關与する遺伝子群の発現に変化は認めなかった (data not shown)。

(2) KN-3、MC3T3 の石灰化モデルの確立

KN-3 を 24 well plate に 3.0×10^3 個/well の濃度で細胞を播種し、継代翌日に 0.5 %FBS 含有 α -MEM 培地に交換し培養を継続した。培養開始、7、14、21 日後に石灰化ノジュールをアリザリンレッドにて染色し、さらに ALP 活性を定量した。その結果、培養開始 7 日後からアリザリンレッド染色による石灰化ノジュールが観察され、その石灰化度は継時的に増加した (図 1)。

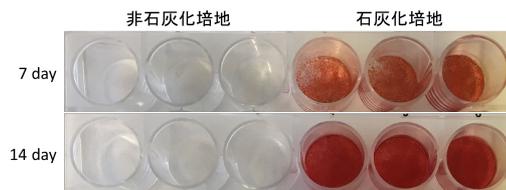


図1. KN-3における石灰化培地培養によるアリザリンレッド染色

さらに、石灰化培地に PAMPs を添加し培養をおこない、同様に継時的に石灰化ノジュールの検出と ALP 活性の測定を行った。しかしながら、PAMPs 刺激は、KN-3 の石灰化能には影響を与えなかった。

(3) ポリフェノール処理による石灰化関連遺伝子の解析

各種 PAMPs の他に、ポリフェノールの一種であり、プロポリスの主要成分とされる caffeic acid phenethyl ester (CAPE) で KN-3 を処理し、石灰化に關与する遺伝子を PCR array を用いて網羅的に解析した。その結果、CAPE 処理された KN-3 において、象牙芽細胞の分化に影響するとされる vascular endothelial growth factor (VEGF) の mRNA の増加が認められた (図 2)。

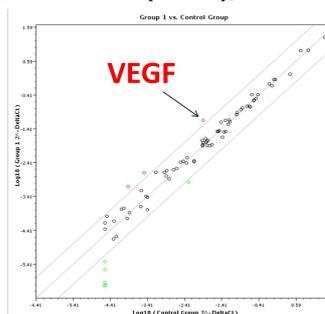


図2. CAPE処理によるVEGF mRNAの発現増強 (PCR array)

また、real-time PCR 法で、代表的な PAMPs として、iE-DAP また、代表的な炎症性サイトカインとして TNF- α を、さらに CAPE 以外のポリフェノールとして caffeic acid ならびに Epigallocatechin gallate (EGCG) で KN-3 を処理し、VEGF mRNA の発現量を解析したところ、PCR array の結果と同様に、CAPE 処理群においてのみ、VEGF mRNA の発現増強が認められ、さらに、ELISA にて培養上清中の VEGF の産生量を定量したところ、real-time PCR の結果と同

様に培養上清中の VEGF 濃度の増加を認めた (図 3)。

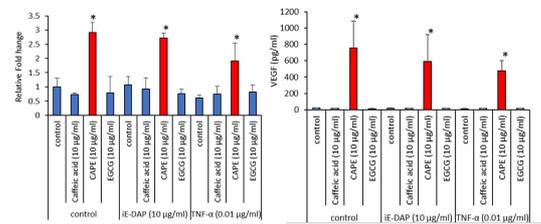


図3. KN-3における各種刺激に対するVEGF発現

(4) マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 ならびにヒト歯髄線維芽細胞における CAPE 処理による VEGF 産生

KN-3と同様にMC3T3-E1並びにヒト歯髄線維芽細胞を各種 PAMPs ならびにポリフェノールにて一定時間処理し、VEGF mRNA の発現量を real-time PCR で、培養上製中の VEGF 濃度を ELISA 法にて定量した。その結果、MC3T3-E1 では KN-3 と同様に CAPE 処理群においてのみ、VEGF mRNA の発現増強 (図 4 A) と、培養上清中の VEGF タンパクの産生増加を認めた (図 4 B)。しかし、ヒト歯髄線維芽細胞においては、VEGF の産生増強は認められなかった (data not shown)。

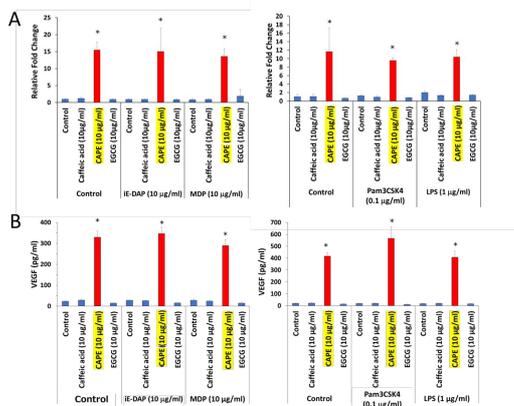


図4. MC3T3-E1における各種刺激に対するVEGF発現

(5) VEGF 産生メカニズムの解析

次に、CAPE による VEGF 産生メカニズムを解明するため、各種シグナル阻害剤を用い VEGF 産生に与える影響の解析を行った。その結果、p-38MAPK と NF- κ B 阻害剤において VEGF 産生が抑制され、CAPE による VEGF 産生は p38MAPK ならびに NF- κ B を介して誘導されることが明らかとなった (図 5)。

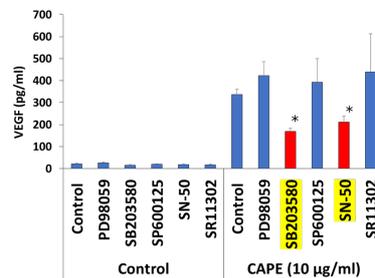


図5. CAPEによるVEGF産生に対するシグナル伝達経路の解析

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)

平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 鷲尾絢子, 中西正, 武川大輔, 北村知昭, 松尾敬志 ラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) におけるカテキンの抗炎症作用 日本歯科保存学雑誌 2017 60 235-244 doi:10.11471/shikahozon.60.235 査読有

Hosokawa Y, Hirao K, Yumoto H, Washio A, Nakanishi T, Takegawa D, Kitamura C, Matsuo T Functional Roles of NOD1 in Odontoblasts on Dental Pulp Innate Immunity. BioMed research international. Epub 2016 Sep 25. doi:10.1155/2016/9325436. 査読有

(学会発表)(計 10件)

平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 松尾敬志 ヒト歯髄組織ならびにラット象牙芽細胞(KN-3)における Mincle 発現と象牙芽細胞での機能解析 第 38 回日本歯内療法学会学術大会 2017年7月22、23日 東京歯科大学水道橋校舎新館(東京都・千代田区)

蔵本瞳, 湯本浩通, 平尾功治, 細川由樹, 中西正, 武川大輔, 松尾敬志 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)のラット象牙芽細胞(KN-3)における VEGF 産生に与える影響 日本歯科保存学会 2017年度春季学術大会(第146回) 2017年6月8日 リンクステーション青森(青森県・青森市)

Yuki Hosokawa, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Takashi Matsuo Anti-Inflammatory Effects of Polyphenols on Rat Odontoblastic Cells The 95th General Session & Exhibition of the IADR 2017年3月25日(サンフランシスコ・アメリカ)

Daisuke Takegawa, Tadashi Nakanishi, Kouji Hirao, Hiromichi Yumoto, Yuki Hosokawa, Takashi Matsuo Interferon-g

modulates Innate Immune Response in Odontoblast-like Cells The 95th General Session & Exhibition of the IADR 2017 年 3 月 24 日 (サンフランシスコ・アメリカ)

Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Kouji Hirao, Hiromichi Yumoto, Yuki Hosokawa, Takashi Matsuo Effect of Interleukin-17A on CCL20 Production from Odontoblast-like Cells The 95th General Session & Exhibition of the IADR 2017 年 3 月 24 日 (サンフランシスコ・アメリカ)

細川由樹、湯本浩通、平尾功治、松尾敬志 ラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) に対するポリフェノールの炎症抑制効果 第 37 回日本歯内療法学会 2016 年 7 月 23 日 ウィンク愛知 (愛知県・名古屋市)

中西正、武川大輔、平尾功治、湯本浩通、松尾敬志 Interleukin-17 が象牙芽細胞様細胞 (KN-3) の CCL20 産生に及ぼす影響 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回) 2015 年 11 月 12、13 日 文京シビックホール (東京都・文京区)

細川由樹、湯本浩通、平尾功治、中西正、武川大輔、松尾敬志 象牙芽細胞が有する Mincle を介した死細胞認識機構とその歯髄炎症反応における役割 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回) 2015 年 11 月 12、13 日 文京シビックホール (東京都・文京区)

平尾功治、湯本浩通、細川由樹、中西正、武川大輔、松尾敬志 ラット象牙芽細胞 (KN-3) の自然免疫反応におけるシグナル伝達経路の解析 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 142 回) 2015 年 6 月 25、26 日 北九州国際会議場 (福岡県・北九州市)

細川由樹、湯本浩通、平尾功治、中西正、武川大輔、松尾敬志 ラット象牙芽細胞 (KN-3) に対するカテキンとカフェイン酸の抗炎症作用 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 142 回) 2015 年 6 月 25、26 日 北九州国際会議場 (福岡県・北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 功治 (HIRAO, kouji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00581399

(2) 研究分担者

中西 正 (NAKANISHI, tadashi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：00217770

湯本 浩通 (YUMOTO, hiromichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：60284303