

平成 30 年 6 月 5 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：15K11117

研究課題名(和文) エピジェネティクス・転写後発現調節機構の解析による新規歯髄温存・石灰化療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel dental pulp preservation and calcification therapies by analyzing epigenetics and post-transcriptional regulation mechanism

研究代表者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：60284303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：象牙芽細胞様細胞株(KN-3)は、自然免疫レセプターNOD1とp38-AP-1を介してケモカイン産生を増強したが、ポリフェノールのCaffeic Acid Phenethyl Esterは、その産生誘導を抑制し、さらに石灰化誘導条件下でもVEGFの産生を増強した。また象牙芽細胞や歯髄線維芽細胞で、自然免疫応答Tolerance現象が生じた。遺伝子転写後発現調節に関与するmicroRNA(miRNA)について、KN-3細胞で発現が2倍以上増減しているmiRNAを特定した。以上より、CAPEやmiRNA等の転写後調節の応用が、歯髄温存ならびに石灰化・再生療法に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Odontoblast-like cell line (KN-3) enhanced chemokines production through the innate immune receptor NOD1 and p38-AP-1 signaling pathway. Caffeic Acid Phenethyl Ester, which is one of polyphenols, reduced their production but induced VEGF production even under calcification induction conditions. Regarding the innate immune response, tolerance was observed in both odontoblasts and dental pulp fibroblasts. microRNAs (miRNAs) involve in the regulation of gene post-transcription and miRNAs whose expression was changed 2-fold in KN-3 cells were identified. These findings suggest that the applications of CAPE and post-transcriptional regulation, such as miRNA, may be useful for dental pulp preservation and calcification / regeneration therapies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：象牙芽細胞 自然免疫 遺伝子発現 シグナル伝達 ポリフェノール ケモカイン VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯髄は、細菌に対する免疫反応や様々な侵襲に対する防御機能を担うが、齶蝕による細菌感染や様々な刺激により、炎症性反応が惹起されて進行・持続し、強度となると、不可逆性変化が生じ、歯髄除去療法（抜歯）が行われる。さらに無髄歯の予後は、有髄歯と比較して悪く、特に破折等の理由により抜歯を余儀なくされるという負の連鎖により、最終的に歯の喪失を招く。現在、加速度的に進んでいる超高齢社会において、歯の喪失がQOLや健康寿命の低下へ導く事からも、この負の連鎖を止める為に、歯髄炎の予防や歯髄温存療法の確立、さらに歯髄の加齢的变化とその特徴を理解する事は、歯科界が果たすべき喫緊の大きな課題・責務であると考えられる。

(2) 我々は、これまでに新規の歯髄炎の治療や歯髄温存療法を開発する為に、まず歯髄炎の病態や発症メカニズムを解明する事が必須と考え、齶蝕から歯髄炎への進行において、その感染初期に働く自然免疫機構に着目し、細菌学的及び分子細胞生物学的解析を行ってきた(J Endod 2014, 2005, 2001, 1995, J Dent Res 2007, 2009, Oral Microbiol Immunol 2008, Jpn Dent Sci Rev 2011)。特に、歯髄自然免疫応答に関して歯髄線維芽細胞における Pattern Recognition Receptors 発現とその機能を明らかにし、歯髄炎の進行における NOD2 と TLR2 pathways の相互作用が重要な調節機構となる事を報告した(J Dent Res 2009)。興味深い事に、象牙芽細胞には NOD1 が優位に発現し機能している事を明らかにし、感染防御において歯髄最表層に存在する象牙芽細胞は、歯髄内でも線維芽細胞とは異なった役割を担う事を示唆した。これらの結果より、象牙芽細胞と歯髄線維芽細胞の分子発現や機能の相違が強く示唆され、細菌感染や外界刺激と加齢が発端となるエピジェネティクス

制御にも各歯髄構成細胞特有の機構が存在する可能性がある。さらに、Polyphenol の 1 種であるカテキン類がこの歯髄の自然免疫反応を抑制する効果を有する事を報告した(Int Endod J. 2014, Eur J Oral Sci. 2010, Life Sci. 2010)。

(3) 近年、胃がんの原因菌である *Helicobacter pylori* や性感染症細菌である *Chlamydia* のネズミへの感染が、胃上皮細胞において miRNA-120 の発現を抑制する事や生殖管における miRNA 発現を調節している事が報告されている(Nat Commun. 2014, Am J Reprod Immunol. 2014)。さらに Polyphenol が免疫機構の調節における Epigenetics に関して生物学的効果を有する事(Epigenetic diet)が報告されている(Nutrients 2013, Free Radic Biol Med. 2013, Epigenetics 2011)。

(4) さらに我々は、殺菌と Biofilm や自然免疫反応の抑制手段の開発を目的として、LED パルス照射は、大腸菌や *Candida* の Biofilm 形成を顕著に抑制し(J Appl Microbiol 2010)、高周波・電磁波照射は、口腔細菌を殺菌し、病原性を減弱させること(J Appl Microbiol 2012)や MPC-polymer 表面処理は、Hydroxyapatite や上皮細胞への口腔細菌の付着・Biofilm 形成や異種細菌間の付着を抑制し、また含嗽により *S. mutans* の増殖を抑制し(J Dent Res 2011)、また上皮細胞の処理により、TLR2 を介した自然免疫応答を抑制する事や細胞障害性刺激から細胞を保護する事(J Biomed Mater Res Part A 2014)を報告した。

(5) これらの成果による歯髄の自然免疫反応や防御機能の役割に加え、生体応答現象として後天的遺伝子発現制御機構を考慮すると、細菌感染・外界刺激や加齢が発端となる Epigenetics 制御による歯髄特有の宿主応答を遺伝子・分子レベルで網羅的かつ詳細に解析

する事で、新規の歯髄温存療法や石灰化等の組織リモデリング促進法を開発できるのではないかという発想を得た。

## 2. 研究の目的

新規の歯髄炎の治療や歯髄温存療法を開発する為に、抗炎症作用、抗酸化作用、抗アレルギー作用、免疫調節やアポトーシス誘導等の様々な生理活性を有する Polyphenols に着目し、歯髄の自然免疫反応を抑制する機構に加え、石灰化等の組織リモデリングを促進する機能についても検討を行う。さらに、歯や歯髄は、慢性的に細菌感染や外界刺激に繰り返しさらされており、Tolerance 様の応答を示すことも考えられるため、この現象についても検討を行う。さらに、加齢や外界刺激等の変化に対する生体応答現象である後天的なゲノム修飾等による遺伝子発現制御機構・Epigenetics に着目し、Epigenetics という新たな視点から、Epigenetics 制御による歯髄特有の宿主応答制御機構を解明する事を目的として、まず Polyphenol に対する歯髄構成細胞の miRNA 発現変化について解析を行う。これらの解析は、歯髄炎の誘発並びに歯髄組織応答成立までの時系列的かつ包括的分子機構の解明に結びつき、歯髄炎発症や病態等や石灰化等の組織リモデリングに関わる機序の解明が期待でき、新規の治療材料や薬剤の開発に導く可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) Polyphenols の歯髄象牙芽細胞に対する細胞障害性能の有無の検討：サブコンフルエントまで培養したラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) に、0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$  濃度の Caffeic acid、Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) あるいは Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) を添加して 24 時間培養し、細胞障害性について、細胞形態を顕微鏡下で観察し、加えて LDH Cytotoxicity Assay にて解析を行った。

(2) Polyphenols による歯髄象牙芽細胞におけるケモカイン産生や Inducible nitric oxide synthase (iNOS) 発現に対する影響についての解析：サブコンフルエントまで培養した KN-3 細胞を 1 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の Caffeic acid、CAPE あるいは EGCG の存在下で、NOD1 リガンドである iE-DAP (0.01  $\mu\text{g/ml}$ ) や炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) にて 24 時間刺激し、培養上清中のケモカインの産生量を ELISA にて定量し、iNOS の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。

(3) CAPE による歯髄象牙芽細胞における Osteogenesis 関連遺伝子発現に対する影響についての解析：10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 存在下で 6 時間培養した KN-3 細胞から精製した

total RNA を cDNA へ逆転後、Osteogenesis 関連遺伝子の発現変化を PCR array にて解析した。

(4) Polyphenols による歯髄象牙芽細胞における VEGF 発現と産生に対する影響についての解析：10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の Caffeic acid、CAPE あるいは EGCG で 6 あるいは 24 時間処理した KN-3 細胞から total RNA 精製と培養上清の回収を行い、精製 RNA は逆転写後に real-time PCR 法に、培養上清は ELISA に供して VEGF の発現ならびに産生量を解析した。同様に、iE-DAP や TNF- $\alpha$  刺激による VEGF 発現と産生についても検討を行った。さらに、石灰化誘導培地 (1% Fetal Bovine Serum; FBS, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate ならびに 50  $\mu\text{g/ml}$  ascorbic acid 添加) にても同様に解析を行った。

(5) CAPE 処理による歯髄象牙芽細胞の VEGF 産生増強に関するシグナル伝達経路の解析：各シグナル阻害剤にて歯髄象牙芽細胞を前処理後、CAPE を添加し、VEGF 産生量を ELISA にて定量した。

(6) CAPE 処理による歯髄象牙芽細胞の VEGF 産生増強に関する転写因子の解析：GFP レポーターシステムを用いて、5 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 処理した歯髄象牙芽細胞における NF- $\kappa$ B の転写因子活性を測定した。

(7) Polyphenols 処理による骨芽細胞における VEGF 発現と産生に対する影響についての解析：10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の Caffeic acid、CAPE あるいは EGCG で 6 あるいは 24 時間処理したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) から total RNA 精製と培養上清の回収を行い、精製 RNA は逆転写後に real-time PCR 法に、培養上清は ELISA に供して VEGF の発現ならびに産生量を解析した。同様に、iE-DAP, MDP (Muramyl dipeptide; NOD2 ligand), Pam3CSK4 (TLR2 ligand), LPS や TNF- $\alpha$  刺激による VEGF 発現と産生についても検討を行った。

(8) CAPE 処理による骨芽細胞の VEGF 産生増強に関するシグナル伝達経路の解析：各シグナル阻害剤にて骨芽細胞を前処理後、CAPE を添加し、VEGF 産生量を ELISA にて定量した。

(9) 自然免疫応答 (TLR signaling 等) の Tolerance 機構の解析：ヒト歯髄線維芽細胞を 0.01 ~ 1  $\mu\text{g/ml}$  濃度の Lipopolysaccharide (LPS) にて 12 時間刺激後、細胞を洗浄し、再度、0.01 ~ 0.1  $\mu\text{g/ml}$  濃度の LPS で 12 時間刺激し、培養上清中の Interleukin (IL)-8 の産生量を ELISA にて定量した。

(10) iE-DAP 刺激による象牙芽細胞での miRNA 発現の解析：iE-DAP で 12 時間処理した KN-3 細胞から miRNA を抽出し、miRNA

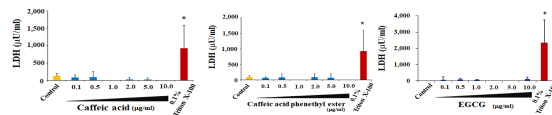
発現 Pattern について Microarray 解析を行った。

(11) Pam3CSK4 及び MDP 刺激によるヒト歯髄線維芽細胞での miRNA 発現の解析：Pam3CSK4 や MDP で 12 時間処理したヒト歯髄線維芽細胞から miRNA を抽出し、miRNA 発現 Pattern について miRNA PCR array 解析を行った。

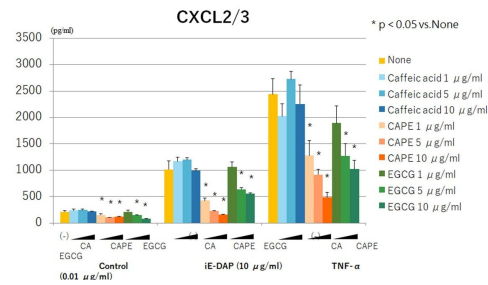
(12) CAPE 処理による象牙芽細胞での miRNA 発現の解析：CAPE で 8 時間処理した KN-3 細胞から miRNA を抽出し、miRNA 発現 Pattern について miRNA PCR array 解析を行った。

#### 4. 研究成果

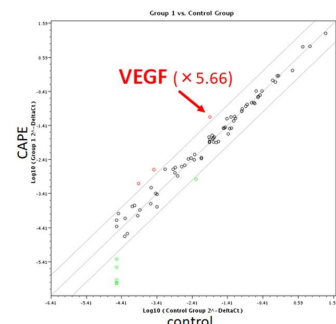
(1) 顕微鏡下での細胞形態観察と LDH Cytotoxicity Assay による解析の結果、0.1 ~ 10.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では、Caffeic acid、CAPE や EGCG は、KN-3 細胞に対して細胞障害性は、認められなかった。



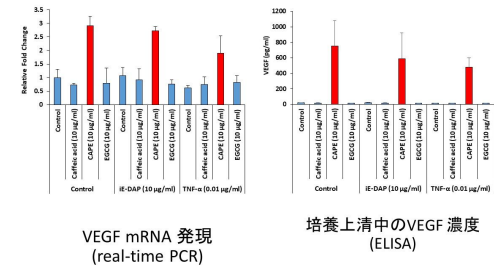
(2) CAPE と EGCG の存在下での KN-3 細胞において、iE-DAP 刺激により増加したケモカイン(CINC-1、CXCL2/3、MCP-1)の産生は抑制され、その効果は濃度依存的であった。また、iE-DAP や TNF- $\alpha$ によって発現が誘導された iNOS は、10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の EGCG と CAPE によって有意にその遺伝子発現が抑制された。しかしながら、Caffeic acid の存在下では、それらの有意な減少は認められなかった。



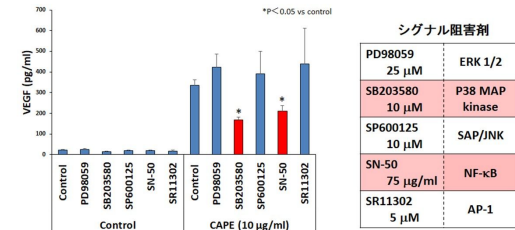
(3) Osteogenesis 関連遺伝子発現変化について PCR array 解析を行った結果、10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 処理した KN-3 細胞において、Vascular endothelial Growth Factor (VEGF)の遺伝子発現が 5.7 倍増加した。



(4) real-time PCR の結果、EGCG と Caffeic acid 処理群においては、VEGF の mRNA 発現増強は認められなかったが、10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 処理群においてのみ有意な VEGF mRNA の発現増強と VEGF 濃度の増加が認められた。また、iE-DAP や TNF- $\alpha$ 刺激により VEGF 発現や産生誘導は認められなかった。さらに、石灰化誘導培地においても、10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 処理群のみで有意な VEGF mRNA の発現増強と VEGF 産生増加が認められた。この石灰化誘導培地下での VEGF 発現増強では、低濃度(0.01  $\mu\text{g/ml}$ )の CAPE 処理でも認められた。

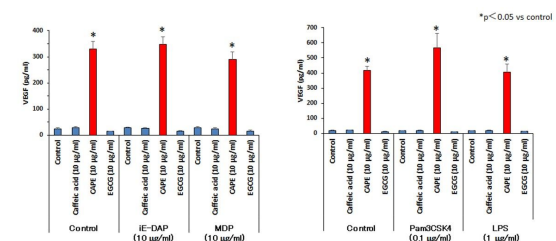


(5) KN-3 細胞における CAPE 処理による VEGF 産生増強は、10  $\mu\text{M}$  の p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)及び 75  $\mu\text{g/ml}$  の NF- $\kappa\text{B}$  阻害剤添加により有意に減少した。

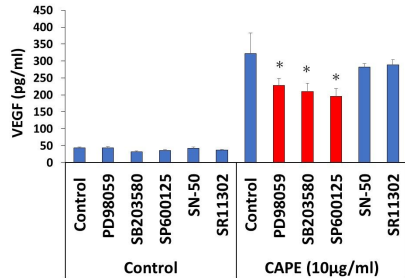


(6) CAPE 処理により KN-3 細胞において、NF- $\kappa\text{B}$  の転写因子活性の増強が認められ、その効果は濃度依存的であった。

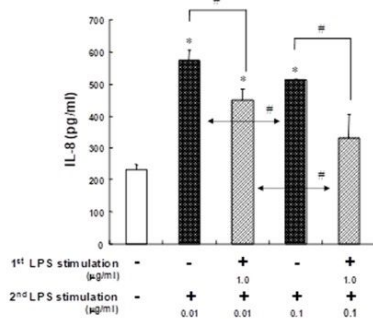
(7) 象牙芽細胞様細胞と同様に、real-time PCR の結果、EGCG と Caffeic acid 処理群においては、VEGF の mRNA 発現増強は認められなかったが、10  $\mu\text{g/ml}$  濃度の CAPE 処理群においてのみ有意な VEGF mRNA の発現増強と VEGF 濃度の増加が認められた。また、iE-DAP, MDP (Muramyl dipeptide; NOD2 ligand), Pam3CSK4 (TLR2 ligand), LPS や TNF- $\alpha$ 刺激により VEGF 発現や産生誘導は認められなかった。



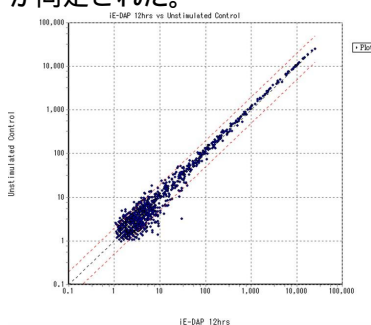
(8) MC3T3-E1 細胞における CAPE 処理による VEGF 産生増強は、10  $\mu$ M の p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) や Stress-activated protein kinase-Jun, NH2-terminal kinase (SAPK/JNK) 及び 25  $\mu$ M の Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) 阻害剤添加により有意に減少した。



(9) 1度 LPS にて刺激されたヒト歯髄線維芽細胞は、2度目の LPS 刺激では IL-8 の産生量は有意に減少していたことから、LPS に対する反応が抑制され、繰り返した LPS 刺激が、ヒト歯髄線維芽細胞に Tolerance を生じさせることが示唆された。

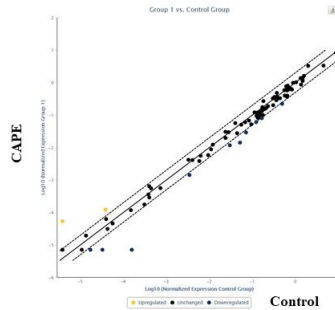


(10) iE-DAP で 12 時間処理した KN-3 細胞において、発現が 2 倍以上変化した 22 の miRNA が同定された。



(11) Pam3CSK4 及び MDP で 12 時間処理したヒト歯髄線維芽細胞において、発現が 2 倍以上変化した miRNA は、それぞれ 14 と 16 であった。

(12) CAPE で 8 時間処理した KN-3 細胞において、発現が 2 倍以上変化した 12 の miRNA が同定された。



## 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 3 件)

Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Yuki Hosokawa, Hitomi Kuramoto, Daisuke Takegawa, Tadashi Nakanishi, Takashi Matsuo: The Roles of odontoblasts in Dental Pulp Immunity; Japanese Dental Science Review. 査読有, In Press, 2018.

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(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. 査読有, Vol. 60, No. 5, 2017, pp235-244. doi:10.11471/shikahozon.60.235.

Yuki Hosokawa, Kouji Hirao, Hiromichi Yumoto, Ayako Washio, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Chiaki Kitamura, Takashi Matsuo: Functional roles of NOD1 in odontoblasts on dental pulp innate immunity; BioMed Research international. 査読有, Article ID 9325436, 2016, doi:10.1155/2016/9325436.

[学会発表](計 12 件)

平尾功治, 蔵本瞳, 湯本浩通, 細川由樹, 松尾敬志: プロポリス生理活性物質 (CAPE; Caffeic Acid Phenethyl Ester)を用いた新規覆髄材の開発; 第 17 回西日本歯内療法学会研修会, 2017.9.10, 大阪歯科大学創立 100 周年記念館 (大阪府大阪市)

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; 第 146 回日本歯科保存学会, 2017.6.9, リンクステーション青森 (青森市文化館) (青森県青森市)

Yuki Hosokawa, Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Hitomi Kuramoto, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Takashi Matsuo: Anti-inflammatory effects of polyphenols on rat odontoblastic cells; 95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2017.3.25, San Francisco (USA)

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

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学術大会、2016.7.23、ウインクあいち（愛知県産業労働センター）（愛知県名古屋市）

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；第 142 回日本歯科保存学会、2015.6.25,26、北九州国際会議場・西日本総合展示場（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；第 142 回日本歯科保存学会、2015.6.25,26、北九州国際会議場・西日本総合展示場（福岡県北九州市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学系)・教授

研究者番号：60284303

### (2) 研究分担者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学系)・教授

研究者番号：30173800

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学系)・准教授

研究者番号：00217770

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

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )