

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17143

研究課題名(和文) 歯髄におけるKLKB1刺激によるPAR-1を介した炎症の解明

研究課題名(英文) KLKB1 promotes inflammation in dentaru pulp via PAR-1

研究代表者

葉山 朋美 (HAYAMA, Tomomi)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：10778278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究において、ヒト歯髄培養細胞にてKLKB1は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、COX-2遺伝子とそのタンパク質の発現量が増加し、そしてPGE2産生を促進し、その効果はcalcineurin阻害剤であるFK506で抑制された。同じセリンプロテアーゼであるplasmin、PAR-1活性化剤であるSFLLRNでもほぼ同様の結果が得られた。KLKB1はPAR-1を介してCOX-2、PGE2を産生することで歯髄炎を増悪させる可能性があり、またその細胞内シグナル伝達においてcalcineurinが関与されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄の生死がその歯の寿命に大きく関与していることは臨床上周知の事実であるが、歯髄の炎症時における細胞機能的な特徴については不明な点が多く残されている。申請者は歯髄炎の病態の確立、新薬開発、既存の薬品の応用を目的として、ヒト歯髄細胞を用いてKLKB1によるPAR-1活性化におけるIL-1やTNF- α 産生、そしてCOX-2産生によるPGE2合成促進は炎症を引き起こす一方で、歯髄では修復象牙質の形成に関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, human dental pulp cells responded to KLKB1 stimulation by increasing intracellular Ca^{2+} , upregulating cyclooxygenase-2, secreting prostaglandin E2, and PAR-1 participated in this course. FK506(the calcineurin inhibitor) inhibits KLKB1-dependent COX-2 mRNA expression. Inhibition of KLKB1-induced COX-2 protein expression by FK506.

研究分野：分子生物学

キーワード：KLKB1 PAR-1 human dental pulp inflammation plasmin

1. 研究開始当初の背景

歯髄は細胞、細胞外基質、脈管、神経から構成される疎線維性結合組織であり、機械的、熱的、化学的、細菌学的刺激に対して炎症が生じる。炎症が極めて軽度で滲出液量の制御により防御反応がおきれば一過性のものとして治癒する。一方で閉鎖的空間である歯髄内では側副循環が存在しないため、炎症が進行すると循環障害に陥りやすく、歯髄壊死がおこる。すなわち歯髄は組織再生による治癒の望めない特殊な組織である。歯髄の生死はその歯の寿命に大きく関与しているのは臨床上周知の事実であるが、歯髄の炎症時における細胞機能的な特徴については不明な点が多く残されている。

歯髄に対するストレスは、interleukin (IL) -1 β , tumor necrosis factor (TNF) - α といった炎症性サイトカインや、cyclooxygenase (COX), prostaglandin (PG), の生産を誘発する¹⁾。Protease Activated Receptors (PARs) は元々 thrombin の受容体として発見され、これまでに4種の subtype が明らかになっており、歯髄においては、歯髄培養細胞で PAR-1, 3, 4 が発現するという報告²⁾がある一方で、う蝕に罹患した歯髄の培養細胞では健常のものに比べ PAR-2 が上昇³⁾する。Kamio ら⁴⁾は歯髄では恒常的に PAR-1, 2, 4 が発現し、PAR-1 の活性化が IL-8 遺伝子発現量増加と PGE₂遊離を引き起こすことや PAR-1 活性化に plasmin も関わり、それが歯髄炎の一端を担っている可能性を報告している。

一方で、同じセリンプロテアーゼである Plasma kallikrein (KLKB1) は基質である kininogen を限定分解し kinin を産生するため、急性炎症反応や高血圧発症、発痛等に深く関わるメディエーターの1つ^{5, 6)}であることは周知の事実である。kallikrein-kinin 系の制御は抗炎症作用につながると考えられ、kallikrein family のプロテアーゼ活性が PARs に働きシグナル伝達を引き起こす可能性があり、歯髄も例外ではないと思われる。また、KLKB1 は plasmin の前駆体である plasminogen の活性化にも関与する。すなわち KLKB1 による制御は KLKB1-kinin 系だけでなく PAR 活性化、plasmin-PAR 活性化のコントロールにまで関わる可能性があるが未だ明確になっていないため、KLKB1 と PARs の関係に焦点をあて検討した。結果として KLKB1 は基質を分解し kinin を産生させるだけでなく、[Ca²⁺]_i を上昇させることで PAR-1 を活性化し、COX-2 遺伝子発現量、タンパク質量、PGE₂産生を促進することにより、歯髄炎を進行させる因子の1つになるということを申請者は報告した⁷⁾。

COX-2 発現は PAR-1 の発現に依存すると考えられるため、PAR-1 発現に関与する因子を検索することが今後の研究には重要であると思われる。

2. 研究の目的

歯髄の生死がその歯の寿命に大きく関与していることは臨床上周知の事実であるが、歯髄の炎症時における細胞機能的な特徴については不明な点が多く残されている。申請者は歯髄炎の病態の確立、新薬開発、既存の薬品の応用を目的として、ヒト歯髄細胞を用いて plasma kallikrein (KLKB1) が細胞膜に存在する protease activated receptor-1 (PAR-1) を活性化させ、細胞内カルシウムイオン濃度 [Ca²⁺]_i を上昇させ、PGE₂ の産生を促進することを解明した。

KLKB1 による PAR-1 活性化における IL-1 β や TNF- α 産生、そして COX-2 産生による PGE₂ 合成促進は炎症を引き起こす一方で、歯髄では修復象牙質の形成に関与する可能性がある。そこで本研究では KLKB1 による COX-2 産生機序と IL-1 β や TNF- α 産生機序、そして kinin による相乗効果に焦点をあて検討する。

3. 研究の方法

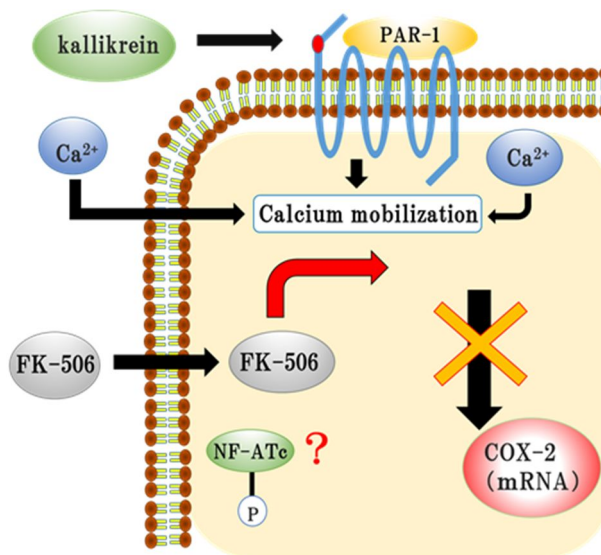
ヒト歯髄培養細胞は、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会の承認事項に基づき、研究のインフォームドコンセントを十分に行って同意を得られた患者の、矯正学的理由によって抜去された健康な歯牙から歯髄組織を無菌的に取り出し、10%牛胎児血清を含む α -MEM を用いて 5-9 代継代し、37℃、5% CO₂ 条件下で培養を行った。ヒト歯髄培養細胞における cyclooxygenase (COX)-2 mRNA 発現量の変化を RT-PCR 法、realtimePCR 法、タンパク質発現を western blot 法にて検討した。

4. 研究成果

ヒト歯髄培養細胞において、KLKB1 は COX-2 mRNA 発現量を促進し、その効果は calcineurin 阻害剤である FK506 で抑制された。KLKB1 の添加により COX-2 タンパク質発現量も増加したが、FK506 で抑制された。同じセリンプロテアーゼである plasmin, PAR-1 活性化剤である SFLLRN でもほぼ同様の結果が得られた。

KLKB1 は PAR-1 を介して COX-2、PGE₂ を産生することで歯髄炎を増悪させる可能性があり、またその細胞内シグナル伝達経路において calcineurin が関与することが示唆された。

今後の展望として、calcineurin は活性化することで転写因子である NF-ATc の脱リン酸化することで核内転写因子を形成することが報告されているため、KLKB1 刺激時においても同様の経路を辿り炎症性サイトカイン遺伝子のプロモーター領域を活性化させるのかを検討していく予定である。



<引用文献>

- 1) Selzer S, Bender IB (eds) : The dental pulp : biologic considerations in dental procedures, Philadelphia : JB Lippincott Company, 1984.
- 2) Gruber R, Jindra C, Kandler B, et al. : Proliferation of dental pulp fibroblasts in response to thrombin involves mitogen-activated protein kinase signaling, Int Endod J, 37: 145-150, 2004.
- 3) Lundy FT, About I, Curtis TM, et al. : PAR-2 regulates dental pulp inflammation associated with caries, J Dent Res, 89: 684-688, 2010.
- 4) Kamio N, Hashizume H, Nakao S, et al. : Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp, Biochem Pharmacol, 75: 1974-1980, 2008.
- 5) 大石幸子: カリクレイン-キニン系 その基礎と臨床, 日本臨床雑誌, : 36, 30-40, 1978.
- 6) Francel PC: Bradykinin and neuronal injury, J Neurotrauma 9 Suppl, 1:S27-S45, 1992.
- 7) Hayama T, Kamio N, Okabe T, et al. : Kallikrein promotes inflammation in human dental pulp cells via protease-activated receptor-1, Journal of Cellular Biochemistry : 2015.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

渡邊昂洋、神尾直人、葉山朋美、深井譲滋、松島潔、ヒト歯髄培養細胞における MIF の COX-2 発現による炎症メカニズムの探索、日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会 (第 148 回)

6. 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究者の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。