

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09577

研究課題名(和文)細菌感染による死細胞を認識する自然免疫受容体Mincleの歯髄における役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the roles in the dental pulp of the innate immune receptor, Mincle, which recognizes dead cells by bacterial infection

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(歯学域)・教授

研究者番号：60284303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常及び炎症歯髄組織やラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)においてMincle mRNAの発現が認められた。NOD-1の特異的LigandであるiE-DAPの刺激により、p38 MAPK-AP-1シグナル伝達経路を介してKN-3細胞にMincle mRNAの発現誘導が認められた。さらにiE-DAP刺激後に、Mincle特異的LigandであるTDMで2次刺激した結果、CCL4 mRNA発現が有意に増強した。以上より、象牙芽細胞も細菌感染等により壊死に陥った死細胞の認識機能を有し、歯髄炎の進行あるいは修復・治癒過程にMincleが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌に対する防御機能を担う歯髄は、炎症反応が進行し、細菌感染が強度となると、最終的には歯髄除去療法により除去される。歯髄が除去された歯の予後は悪く、破折等により抜歯を余儀なくされ、歯の喪失を招く。よって、細菌感染等により壊死に陥った細胞を認識するMincleが、歯髄炎の進行に大きく関与することを明らかにした本研究成果は、今後、Mincleを診断マーカーや標的分子とした新規の診断・治療薬の開発に繋がるものと考えられ、歯髄温存し、歯の寿命を延ばすことにより、生活の質の向上にも導くことから、学術的意義に加えて、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Expression of Mincle mRNA was observed in normal and inflamed dental pulp tissues and rat odontoblast-like cells (KN-3). Induction of Mincle mRNA expression in KN-3 cells was observed via the p38 MAPK-AP-1 signaling pathway by stimulation with the NOD-1-specific ligand, iE-DAP. Furthermore, CCL4 mRNA expression was significantly induced in KN-3 cells by the secondary stimulation with the Mincle-specific ligand, TDM, after first stimulation with iE-DAP. These findings revealed that odontoblasts have a function of recognizing dead cells fallen into necrosis by bacterial infection and suggest that Mincle in dental pulp tissues play important roles in the progression or repair / healing process of pulpitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Mincle 自然免疫 細菌感染 歯髄 象牙芽細胞 シグナル伝達経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯髄は、細菌や様々な侵襲に対する防御機能を担うが、一方、炎症反応が進行・持続し、強度となると、不可逆性変化が生じ、歯髄除去療法が行われる。無髄歯の予後は悪く、破折等により抜歯を余儀なくされ、最終的に歯の喪失を招く。この負の連鎖を止める為に、歯髄炎の不可逆性病態への進行過程やホメオスタシス・リモデリング機構を理解し、さらに不可逆性歯髄炎への進行に関する診断マーカーを特定する事は、歯髄炎の予防や歯髄温存療法の確立に繋がり、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、新規の歯髄炎治療や温存療法を開発する為に、歯髄炎の病態や発症メカニズムの解明が必須と考え、齶蝕から歯髄炎への進行において、感染初期に働く自然免疫機構に着目し、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、歯髄炎の進行には NOD2 と TLR2 pathways の相互作用が重要となる事(J Dent Res 2009)や象牙芽細胞には NOD1 が優位に発現し、炎症反応の増強に関与するケモカインの産生誘導機能とそのシグナル伝達経路も明らかにし(BioMed Res Int 2016)、感染において歯髄最表層に存在する象牙芽細胞は、歯髄内で線維芽細胞とは異なる役割を担う事を示した。しかし、可逆性歯髄炎は、細菌感染した軟化象牙質除去や覆髄等の処置により炎症が緩解する事から、歯髄石灰化に加えて、各歯髄構成細胞には、自然免疫に属する何らかの特有のホメオスタシス・リモデリング等に関する機構が存在する可能性があると考えられるが、これに関与する TLR や NOD 以外の自然免疫関連受容体は同定されておらず、その役割も不明のままである。

(3) 近年、病原体感染や細胞傷害等の生体の危機を感知し、免疫応答を始動させて生体の防御に重要な役割を果たす Mincle (Macrophage Inducible C-type Lectin)と呼ばれる新たな自然免疫受容体が同定され、細菌等の非自己のみならず死細胞から放出される核内タンパク質 Spliceosome associated protein 130 (SAP130)を認識して安全と危険を識別し、生体を守る為の反応を促す機構が備わっている(Nature Immunology 2008)ことが報告された。しかしながら、この危険を察知する生体防御機構の組織修復・リモデリング等の詳細な役割や歯髄炎での発現とその役割は不明である。

(4) 現在、歯髄温存に関して、歯髄炎の可逆・不可逆の診断マーカーは無く、さらに歯髄組織のホメオスタシスや組織修復/リモデリング機構も解明されておらず、石灰化等の組織修復を促進する薬剤・材料・方法も未だに開発されていない。現在の歯髄温存療法は、水酸化カルシウムや MTA (Mineral Trioxide Aggregate)等を応用した覆髄法が主体で、歯髄の可逆/不可逆性変化の診断に基づく治療はなされておらず、成功率や Minimal Intervention の概念を考慮すると、歯髄における組織ダメージを認識する機構の解明とその診断・治療法の開発が今後の課題として残されている。

(5) そこで、感染やストレスによる生体組織のダメージを速やかに感知するセンサーである新たな自然免疫受容体 Mincle に着目することにより、歯髄炎発症・進展機序を詳細に解明すると共に、可逆/不可逆性歯髄炎の診断マーカーの同定と歯髄炎抑制や石灰化等の組織修復を促進する新規材料や方法の開発に繋がるのではないかという発想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、未だに診断基準がグレーゾーンとして残されたままである歯髄炎の不可逆性病態の解明に関して、細菌感染等による歯髄の自然免疫機構に着目し、歯髄炎の進行過程あるいは組

織修復・再生の両観点から、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の開発を目的に、感染やストレス等による大量の細胞死や組織ダメージを危険として速やかに認識・感知して免疫応答を始動させて生体の防御に重要な役割を果たす活性化受容体：Mincle の役割について、細胞生物学的及び分子生物学的に、その発現機構や局在に加え、歯髄構成細胞や免疫細胞に及ぼす影響やその制御機構を解明する事を目的とする。これらの成果は、歯髄炎の進行過程や歯髄組織における自然細胞死・ホメオスターシスやリモデリングに関わる機序の解明が期待できるのみならず、歯周病等の他の細菌 Biofilm 感染症や炎症に対する診断・治療法に関して、組織ダメージ認識・組織修復/リモデリングという新たな視点からのアプローチとなり、新規標的マーカーとして Mincle 及びそのシグナルを標的とした新たな診断・治療薬の開発に結び付く可能性がある。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床歯髄サンプル及びラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)における Mincle mRNA 発現解析：徳島大学病院歯科を受診し、臨床的に便宜抜髄が必要となった正常歯髄、ならびに不可逆性歯髄炎と診断され抜髄が必要となった歯髄を採取した。採取した歯髄組織は、NucleoSpin RNA XS を用い mRNA を抽出し、逆転写後、Mincle mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。なお、本研究は徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認のもと（承認番号：No. 329-5）、被験患者に本研究の内容を説明し同意を得たうえで行った。また、サブコンフルエントまで培養した KN-3 細胞（九州歯科大学、北村知昭教授・西原達次教授より恵与）から total RNA を抽出・精製し、Mincle mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

(2) 象牙芽細胞様細胞や単球系細胞(THP-1)における Mincle 発現誘導因子の同定：*Streptococci* の *hlp* 遺伝子をクローニング後、大腸菌で発現誘導させ rS-HLP を精製した。THP-1 細胞を *Streptococcus mutans* 生菌・死菌ならびに LPS, Pam3CSK4 や *Streptococci* の *hlp* 遺伝子をクローニング後、大腸菌で発現誘導させて精製した rS-HLP にて 4 時間刺激し、total RNA を抽出・精製後、Mincle の mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。さらに、KN-3 細胞を iE-DAP (1 or 10 µg/ml)、MDP (1 or 10 µg/ml)、Pam3CSK4 (0.1 or 1 µg/ml)、*E. coli* LPS (0.1 or 1 µg/ml)、iE-Lys (10 µg/ml)、MDP-LL (10 µg/ml)あるいは TNF- $\alpha$  (0.01 µg/ml)で 4 ~ 24 時間刺激した後、total RNA を抽出・精製後、Mincle の mRNA 発現 level を real-time PCR にて解析した。

(3) ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)における iE-DAP 刺激による Mincle mRNA 発現誘導機序の解析：MAP Kinases や AP-1 阻害剤により前処理した KN-3 を iE-DAP (10 µg/ml)で 24 時間刺激した後、total RNA を抽出・精製し、Mincle の mRNA 発現 level を real-time PCR にて解析した。さらに、MAP Kinases や AP-1 阻害剤による前処理を行った場合の Mincle mRNA 発現 level も real-time PCR にて解析した。

(4) ヒト単球系細胞(THP-1)における rS-HLP 刺激による Mincle mRNA 発現誘導機序の解析：各シグナル阻害剤で 1 時間前処理した THP-1 細胞を rS-HLP で 4 時間刺激した後、Mincle mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析し、さらに、シグナル分子のリン酸化をウエスタンブロット法にて確認した。

(5) rS-HLP 刺激による THP-1 細胞における MINCLE 蛋白発現：チャンバースライドに播種した THP-1 細胞を rS-HLP にて刺激後、免疫染色にて MINCLE 蛋白の発現を蛍光顕微鏡にて観察し

た。

(6) Mincle 特異的 ligand 刺激による網羅的 mRNA 発現解析: Mincle 特異的 ligand である Trehalose dimycolate (TDM; 10 µg/ml) で KN-3 細胞を 24 時間刺激し、RT<sup>2</sup> Profiler PCR array (Rat Inflammatory Response and Autoimmunity: QIAGEN)にて炎症性 mediators の mRNA 発現 level を網羅的に解析した。

(7) ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)におけるMincleの機能解析: 自然免疫機構に関するレセプターの1つである NOD-1特異的LigandであるiE-DAP(10 µg/ml)の刺激によりKN-3細胞において発現増強されたMincleの機能解析を行うため、iE-DAP刺激後に、Mincle特異的Ligandである trehalose dimycolate (TDM: 10 µg/ml)で4時間刺激し、CCL4 mRNA発現levelをreal-time PCRにて解析した。

(8) ヒト単球系細胞(THP-1)におけるMincleの機能解析: 上記項目(7)と同様に、歯髄炎症組織に浸潤する単球系細胞におけるMincleの機能解析を行うため、rS-HLP刺激したTHP-1細胞をさらにTDMで2次刺激後、CXCL1 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 1)/GROα; (growth-related protein α) の mRNA発現及び蛋白産生をそれぞれreal-time PCR及びELISAにて解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 正常及び炎症歯髄サンプルとともに、Mincle mRNAの発現が認められた。また、ヒト培養歯髄細胞においてはMincle mRNAの発現は認められなかったが、KN-3においてMincle mRNA発現が認められた(図1)。

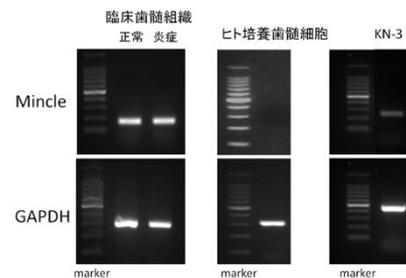


図1 臨床歯髄組織・培養歯髄細胞のMincle mRNA発現

(2) う蝕病原細菌 *S. mutans* 生菌刺激により、THP-1 細胞の Mincle mRNA 発現の増加が認められたが、死菌での刺激においては Mincle mRNA の発現増加は認められなかった(図 2)。また、LPS, Pam3CSK4, rS-HLP 刺激によっても、THP-1 細胞の Mincle mRNA 発現は濃度依存的に優位に増加した(図 3)。さらに、KN-3 細胞において、自然免疫機構に関するレセプターの 1 つである NOD-1 に対する特異的 Ligand である iE-DAP や炎症性サイトカイン TNF-α刺激で Mincle mRNA 発現が増強し、その発現は経時的に増強した(図 4)。

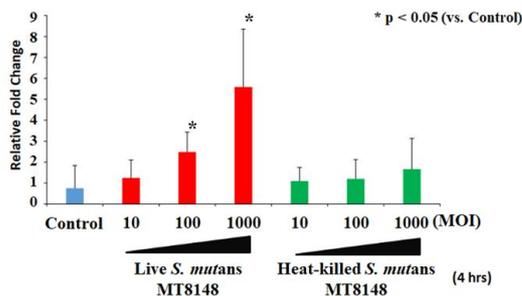


図2 *S. mutans*刺激によるMincle mRNA発現

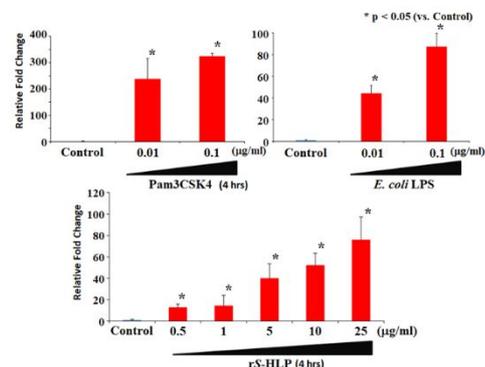


図3 Pam3CSK4, LPS, rS-HLP刺激によるMincle mRNA発現

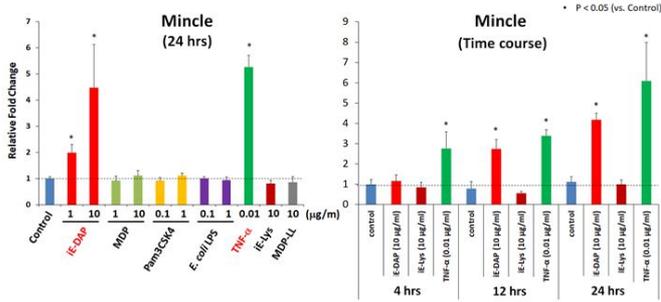


図4 各PAMPs刺激における Mincle mRNA発現

(3) KN-3において、iE-DAP刺激によるMincle mRNA発現誘導は、p38 MAPK inhibitor (10 µM) や AP-1 inhibitor (5 µM) の前処理により有意に抑制されたが、ERK1/2、SAP/JNKやNF-kB特異的阻害剤では抑制されなかった。

(4) rS-HLP刺激によりTHP-1細胞におけるMincle mRNA発現誘導は、PI3K-Akt特異的阻害剤により有意に抑制されたが、ERK1/2、P38 MAPKやSAP/JNKの特異的阻害剤では抑制されなかった。さらに、ウエスタンブロット法においてrS-HLP刺激30分、60分後にAktのリン酸化の亢進が認められた

(5) rS-HLP 刺激した THP-1 細胞における Mincle 蛋白の産生増強は、免疫蛍光染色により観察された。

(6) TDM で KN-3 細胞を 24 時間刺激し、PCR array を用いて炎症性 mediators の mRNA 発現 level を網羅的に解析した結果、CCL4 の mRNA 発現誘導が認められた(図 5)。

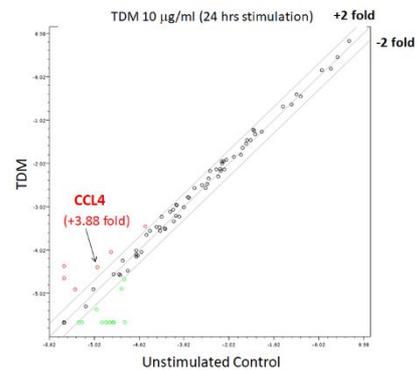


図5 PCR array

(7) iE-DAP 刺激した KN-3 細胞をさらに TDM で 2 次刺激した結果、CCL4 mRNA 発現が有意に増強した(図 6)。

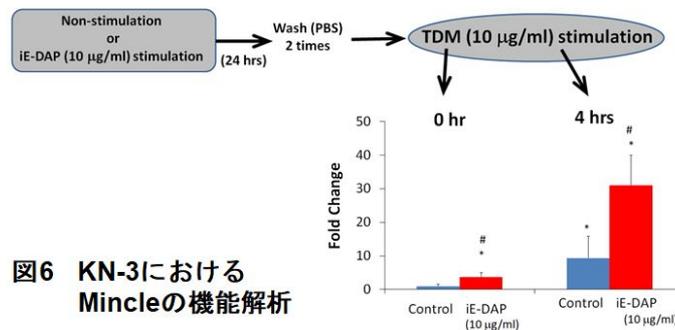


図6 KN-3における Mincleの機能解析

(8) rS-HLP刺激によりTHP-1細胞にMincleの発現が誘導されることを確認し、さらにTDMで2次刺激した結果、CXCL1/GROαの mRNA発現及び蛋白産生が有意に増強した(図7)。

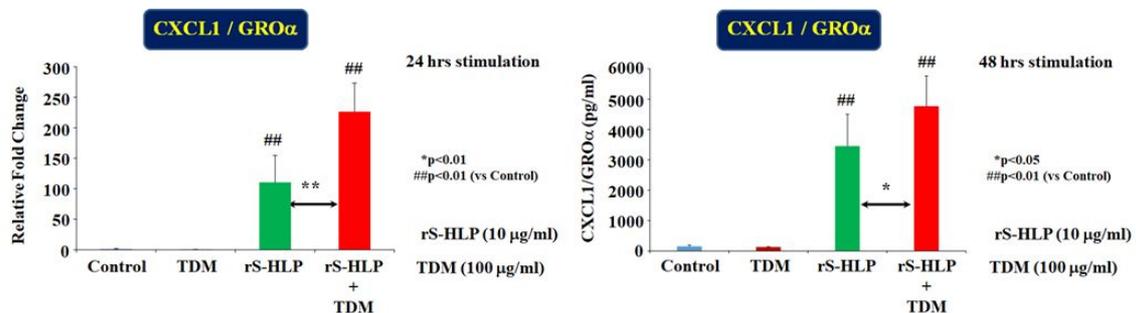


図7 THP-1におけるMincleの機能解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hitomi Kuramoto, Kouji Hirao, Hiromichi Yumoto, Yuki Hosokawa, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Ayako Washio, Chiaki Kitamura, Takashi Matsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induces VEGF expression and production in rat odontoblastic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/5390720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Kouji Hirao, Masami Ninomiya, Keiji Murakami, Hideki Fujii, Yoichiro Miyake	4. 巻 20
2. 論文標題 The Pathogenic Factors from Oral Streptococci for Systemic Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20184571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiromichi Yumoto, Kouji Hirao, Yuki Hosokawa, Hitomi Kuramoto, Daisuke Takegawa, Tadashi Nakanishi, Takashi Matsuo	4. 巻 54
2. 論文標題 The Roles of Odontoblasts in Dental Pulp Innate Immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 105-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2018.03.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 湯本浩通	4. 巻 31
2. 論文標題 口腔Biofilm感染症における病原因子と全身に及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20738/johb.31.1_1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyoshi Kano, Tsuyoshi Morita, Kaori Sumida, Hiromichi Yumoto, Otto Baba	4. 巻 96
2. 論文標題 Expression of fibroblast growth factor receptor1, -2c, and -3c transcripts in mouse molars after tooth eruption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anatomical science international	6. 最初と最後の頁 301-309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-020-00594-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiromichi Yumoto
2. 発表標題 Clinical Technique in Endodontics
3. 学会等名 ConsAsia2019 (The 1st General Meeting of the Asian-Oceanian Federation of Conservative Dentistry [AOFCD]) (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵本瞳, 平尾功治, 細川由樹, 武川大輔, 湯本浩通, 中西正
2. 発表標題 ラット象牙芽細胞(KN-3)におけるVEGFの石灰化誘導作用
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度秋季学術大会(第151回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神尾強司, 守田剛, 角田佳折, 湯本浩通, 馬場麻人
2. 発表標題 萌出後マウス臼歯の歯髄における象牙質形成関連因子の発現解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武川大輔, 中西正, 平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 松尾敬志
2. 発表標題 NODリガンド刺激したヒト象牙芽細胞様細胞におけるインターフェロンガンマの影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2019年度春季学術大会(第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵本瞳, 湯本浩通, 平尾功治, 細川由樹, 松尾敬志
2. 発表標題 Caffeic Acid Phenetyl Ester (CAPE)のラット象牙芽細胞(KN-3)におけるVEGF産生誘導機序の解析
3. 学会等名 第40回日本歯内療法学会学術大会& 第17回日韓合同歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Caffeic Acid Phenetyl Ester (CAPE)の象牙芽細胞と骨芽細胞におけるVEGF産生誘導機序の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2018年度春季学術大会(第148回)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯本浩通
2. 発表標題 口腔バイオフィルム感染症における病原因子
3. 学会等名 四国歯学会(53回例会)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯本浩通
2. 発表標題 歯内療法における技術革新と最近のトレンド・トピックス
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2020年度秋季学術大会(第153回) (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平尾 功治 (HIRAO Kouji) (00581399)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教  (16101)	
研究分担者	木戸 淳一 (KIDO Jun-ichi) (10195315)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授  (16101)	
研究分担者	稲垣 裕司 (INAGAKI Yuji) (50380019)	徳島大学・病院・講師  (16101)	
研究分担者	二宮 雅美 (NINOMIYA Masami) (10291494)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教  (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------