

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592871

研究課題名(和文) 歯髄炎の病態形成における炎症 - 抗炎症バランス制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of a balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory pulpal responses in the pathogenesis of pulpitis

研究代表者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：00217770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕が進行すると、歯髄組織にエフェクターT細胞が浸潤し、プロスタグランジン(PG)などの炎症関連因子の産生が顕在化する。本研究では、歯髄炎の病態形成における炎症 - 抗炎症バランスの役割について、歯髄細胞を用いて検討した。エフェクターT細胞から産生されるインターロイキン-17は歯髄細胞に対し、サイトカインであるCXCL10やCCL20の産生を誘導することが示された。一方、PGF2は、活性化歯髄細胞におけるCCL20産生を増強させるがCXCL10産生を抑制させることが示された。

研究成果の概要(英文)：With advance of dental caries, the infiltration of effector T cells and the production of various inflammatory mediators such as prostaglandin (PG) in the dental pulp tissue become apparent. In this study, we evaluated the role of a balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in the pathogenesis of pulpitis using dental pulp cells. As a result, interleukin-17 from effector T cells induced the production of cytokines such as CXCL10 and CCL20 in the dental pulp cells. In contrast, PGF2 up-regulated CCL20 production and down-regulated CXCL10 production in the activated dental pulp cells.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄炎 歯髄細胞 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎の病態は、歯髄の保存が可能な可逆性歯髄炎から歯髄除去せざるを得ない不可逆性歯髄炎へと進展するとされているが、その境界は明瞭ではない。臨床的に不可逆性歯髄炎と診断された歯髄組織におけるリンパ球浸潤の実態について検討してきたわれわれのこれまでの研究成果を踏まえ、今回、炎症性病変の進展には免疫応答の正および負に制御する機構が働いていることに注目し、免疫応答において主要な役割を果たすとされるエフェクターT細胞から産生されるサイトカインに加え、作用する環境によっては抗炎症性に働くとされるプロスタグランジンの歯髄炎における役割に着目した。研究開始当初、Th17細胞から産生されるインターロイキン(IL)-17の歯髄炎における役割については明らかにされておらず、プロスタグランジン(PG)F₂の調節的役割も追究されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄炎の病態形成における炎症・抗炎症バランス制御機構を解明することを目的とし、エフェクターT細胞とTreg細胞の発現を比較し、さらにエフェクターT細胞から産生されるサイトカインやプロスタグランジンが歯髄組織を構成する中心的細胞である歯髄細胞に与える影響について、炎症メディエーターの発現状況から解析することとした。また、外来刺激に対する最初の防御線となる象牙芽細胞における自然免疫反応についても検討を加えることとした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄組織におけるエフェクターT細胞の発現と歯髄細胞におけるレセプター発現：臨床的に不可逆性歯髄炎と診断された炎症歯髄組織を採取し、ホルマリン固定・パラフィン包埋したのち、薄切組織切片を作製し、Th17マーカーとされるCCR6発現について

検討した。さらにTh17細胞から産生される液性因子が歯髄細胞に与える影響について検討するため、まず代表的な液性因子であるIL-17に対するレセプター発現をフローサイトメトリーにて解析した。

(2) Th1サイトカインおよびTh17サイトカインに対する歯髄細胞の炎症メディエーター発現：Th1サイトカインであるインターフェロン- (IFN-)ならびにTh17サイトカインであるIL-17を歯髄細胞に作用させたときの炎症メディエーター(CXCL10, CCL20等)産生をELISA法にて検討した。

(3) 活性化歯髄細胞に対するPGF₂の影響：炎症歯髄で産生亢進が認められているPGF_{2α}に着目し、まずPGF₂に対するレセプターが歯髄細胞において発現しているかどうかをウエスタンブロット法にて検討したうえで、自然免疫受容体TLR2シグナルにより活性化された歯髄細胞における炎症メディエーター産生に対するPGF_{2α}の影響をELISA法にて検討した。

(4) 象牙芽細胞における自然免疫反応性：象牙芽細胞様細胞として樹立されたラットKN-3細胞を用いて自然免疫受容体に対するリガンド刺激を行ったときのサイトカイン産生についてELISA法にて検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織学的検索により、炎症歯髄組織において、T細胞の集積が認められる領域にTh17細胞のマーカーとされるCCR6陽性細胞が存在していることを確認した。また、歯髄細胞におけるIL-17レセプター発現をフローサイトメトリー解析したところ、IL-17RAおよびIL-17RCが歯髄細胞に発現していることが示された。

(2) エフェクター細胞であるTh17細胞の

歯髄炎における役割を検討するため、IL-17を歯髄細胞に作用させたときの炎症メディエーター発現について検討した。その結果、IL-17濃度依存的にCXCL10, CCL20やvascular endothelial growth factor (VEGF)の産生が上昇することが示されたが、cyclooxygenase-2 (COX-2)の発現は認められなかった。また、歯髄細胞において恒常的に発現が認められるheat shock protein 27 (Hsp27)については、IL-17の影響はみられなかった。さらに、IL-17刺激したヒト歯髄細胞に、炎症性サイトカインであるIL-1を加え共刺激したときの炎症メディエーター発現について検討したところ、CXCL10ならびにCCL20産生誘導が相乗的に増強されることが示された。一方、Th1サイトカインのインターフェロン- γ は歯髄細胞に対しCXCL10産生を強力に誘導したが、VEGFやCOX-2の発現は誘導されず、Hsp27発現にも影響を及ぼさなかった。これらの結果より、歯髄細胞は自然免疫応答に加え、エフェクターT細胞から産生される液性因子に対する反応性を有することから、歯髄炎の病態形成における役割の一端を担っている可能性が示唆された。

(3) 炎症歯髄で産生亢進が認められているPGF_{2 α} に着目し、TLR2シグナルにより活性化された歯髄細胞に対するPGF_{2 α} の影響について炎症メディエーター(IL-8, CXCL10, CCL20)産生の観点から検討した。歯髄細胞にPGF_{2 α} を単独に作用させたところ、IL-8の産生が僅かながら亢進したが、CXCL10およびCCL20の産生亢進は認められなかった。TLR2リガンドを単独作用させると、これらすべての炎症メディエーター産生が上昇した。さらに、TLR2リガンド刺激した歯髄細胞にPGF_{2 α} を共刺激させたところ、CCL20産生は相乗的に増強された。一方、CXCL10産生はPGF_{2 α} 濃度依存的に抑制され、IL-8

産生は影響を受けなかった。なお、歯髄細胞におけるPGF_{2 α} に対するレセプターであるFP receptor発現については、ウエスタンブロット解析により一定の発現量が維持されていた。これらの結果より、PGF_{2 α} は歯髄細胞における炎症メディエーター産生を調節している可能性が示唆された。

(4) 歯髄の最外側に位置し外来刺激に対する最初の防御線となる象牙芽細胞に着目し、象牙芽細胞様細胞として樹立されたラットKN-3細胞を用いて、自然免疫受容体に対するリガンド刺激を行ったときのサイトカイン産生について検討した結果、NOD1リガンド刺激によりKN-3細胞におけるCCL20やMCP-1の発現誘導が認められたが、NOD2, TLR2またはTLR4リガンド刺激に対してはそれらサイトカインの発現は誘導されなかった。これは、歯髄細胞がこれらの自然免疫受容体に対するリガンド刺激に対し様々なサイトカイン産生を示したのと比較して、KN-3細胞は異なる反応性を示すことが明らかになった。

以上の成果は、歯髄炎の病態形成における炎症・抗炎症バランス制御機構の一端を明らかにできたと考えている。現在のところ、IL-17が歯髄細胞の炎症メディエーター産生に影響を与えるという報告はなく、またPGF₂の調節的役割も言及されておらず、新しい知見として発信できる。今後は、今回の研究期間で明らかにできなかったTreg細胞の役割や自然免疫機構との関係、さらには石灰化機構との関わりを追究することが期待される。

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)

Nakanishi T, Mukai K, Hosokawa Y, Takegawa D, Matsuo T. Catechins inhibit vascular endothelial growth factor

production and cyclooxygenase-2 expression in human dental pulp cells. International Endodontic Journal 48, 277-282, 2015 年 (査 読 有) DOI:10.1111/iej.12312

Takegawa D, Nakanishi T, Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Matsuo T. Modulatory roles of interferon- through indoleamine 2,3-dioxygenase induction in innate immune response of dental pulp cells. Journal of Endodontics 40, 1382-1387, 2014 年 (査 読 有)

DOI:10.1016/j.joen.2014.03.018

松尾敬志、尾崎和美、中西 正、湯本浩通、高橋加奈子、平尾功治、武川大輔．歯髄疾患の病態と診断．日本歯内療法学会雑誌 34, 67-76, 2013 年 (査 読 な し)

〔学会発表〕(計4件)

Nakanishi T, et al、Interleukin-17 regulates inflammatory mediator expression in IL-1 -stimulated dental pulp cells、2015 IADR General Session and Exhibition、2015 年 3 月 13 日、ボストン(アメリカ合衆国)

中西 正 ほか、Interleukin-17 がヒト歯髄線維芽細胞の炎症メディエーター発現に及ぼす影響、日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会(第 141 回)、2014 年 10 月 30 日、山形テルサ (山形県・山形市)

Nakanishi T, et al、Prostaglandin $F_{2\alpha}$ regulates cytokine expression in dental pulp cells、2013 IADR General Session and Exhibition、2013 年 3 月 23 日、シアトル(アメリカ合衆国)

中西 正 ほか、Prostaglandin $F_{2\alpha}$ は歯髄細胞における炎症メディエーター発現を調節する、日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会(第 136 回)、2012 年 6 月 29 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：00217770

(2) 研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60284303

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90346601