

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20450

研究課題名(和文) 歯髄創傷治癒におけるプロスタグランジンE2の役割：輸送担体発現と受容体の機能解析

研究課題名(英文) The role of prostaglandin E2 for wound healing of dental pulp : focusing the transporters and prostaglandin E2 receptors

研究代表者

大倉 直人 (Naoto, Ohkura)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：00547573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロスタグランジンE2(PGE2)の細胞外への輸送経路、および歯髄創傷治癒時に展開されるprostaglandin transporterおよびEPレセプターの時空間的局在を解明するために、歯髄修復治癒モデルラットやヒト培養歯髄組織を用いて、遺伝子発現解析および免疫組織化学的解析によるPGE2輸送経路とその後のレセプターとの結合によって誘起される生体反応について解析を行った。その結果、ラット臼歯部での歯髄創傷治癒過程ではPGTによってPGE2が輸送され、その後、EP2やEP4と結合することで修復象牙質形成、血管新生および神経保護に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

プロスタグランジンE2 (PGE2)は炎症などの治癒過程に関与する生体内物質として知られており、輸送タンパク(PGT)によって細胞の中から外へ運ばれ、その後、特異的な受容体(EP)と結合することでその機能を発揮する。我々の研究グループは、歯髄組織を治癒に導かせるモデルラットを作製し、治癒過程におけるPGTおよびその受容体であるEP2に関する発現部位とその役割について解析した。その結果、歯髄創傷治癒部で認められる歯を作る細胞(象牙芽細胞)において、PGTとEP2が発現していることを確認し、細菌が損傷部に侵入するのを早急に防ぐための歯の形成に関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to analyze the mRNA expression and localization of prostaglandin transporter (PGT) and prostaglandin receptors (EPs) receptors using real-time PCR and immunohistofluorescent staining in a rat model of pulpotomy with mineral trioxide aggregate capping. Moreover, to elucidate the angiogenesis stimuli on the EPs signaling pathway, mRNA expression levels of PGT, EP2, and EP4 were analyzed in cultured human pulp tissues challenged with EPs agonists. This study provides insights into the functions of PGE2 via PGT and EPs in the healing dentin/pulp complex, angiogenesis, and neuroprotection in the rat dental pulp, whereas PGE2 via MRP4 might mediate angiogenesis induced in acute phase. Further studies may be helpful developing new therapeutic targets for dental disease.

研究分野：歯内療法

キーワード：プロスタグランジンE2 トランスポーター EP2 EP4 PGT MRP4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン(PG)E₂は血管拡張などの炎症性変化に関与する代表的化学伝達物質であり、歯髄炎においてもこの種の関与が確認されている。また、PGE₂は特異的レセプターであるEP2あるいはEP4を介した血管新生の促進など、創傷治癒過程においても重要な役割を演じる。この際、PGE₂は受動輸送のみならず、種々の膜輸送担体(トランスポーター)と呼ばれる細胞膜上に発現するタンパク質によって細胞内から細胞外へ輸送された後、標的細胞の膜表面の特異的レセプターと結合することで機能を発揮すると考えられる。

申請者らは上記の点に着目して検索を行っており近年、歯髄炎モデルラットを用いた実験系において、**multidrug resistance associated protein (MRP)4**と呼ばれるトランスポーターの血管内皮細胞における発現を見出すとともに、**MRP4**がPGE₂排出輸送に寄与することを報告している(Ohkura N *et al*, *J Endod*, 2014)。また、PGE₂の代謝経路(細胞外から細胞内へのPGE₂取り込み輸送)についてはプロスタグランジントランスポーター(PGT)と呼ばれるトランスポーターの関与が確認されており、申請者らはPGTがラット歯髄において血管内皮細胞に発現している所見を得るとともに、歯髄炎モデルラットでPGTの遺伝子発現レベルが著明に増加していることも確認している。さらに申請者は、培養ヒト歯髄スライス組織への**lipopolysaccharide (LPS)**添加によって、炎症時に活性化されるPGE₂生合成関連酵素(**cyclooxygenase-2**、**microsomal PGE synthase-1**)ならびにEP2およびEP4のmRNA発現量が著明に上昇する事、およびEP2およびEP4が象牙芽細胞や血管内皮細胞に局在していることを確認しており、LPS刺激に対する歯髄の応答へのEP2およびEP4を介した情報伝達経路の関与を推定している。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの炎症歯髄組織における解析結果を更に発展させるために企画されたものであり、以下に詳細を記す。

①MTAによる直接覆髄モデルラットを用いた創傷治癒過程の解析

PGE₂の輸送に関連するトランスポーター(PGT, MRP4)およびPGE₂レセプター(EP2およびEP4)を分子細胞生物学的/免疫組織化学的検索することで、これまで不明確であった歯髄創傷治癒過程で展開されるPGE₂の輸送動態およびPGE₂レセプター(EP2およびEP4)の時空間的局在変化を解明することを目的とする。

②特異的作動薬を添加した歯髄組織培養モデルを用いた*in vitro*での血管新生動態解析

創傷治癒に必須の生体反応である血管新生に着目し、EP2およびEP4作動薬添加後の血管新生関連分子のタンパク、遺伝子レベルでの発現解析ならびに血管系の形態学的変動に関する免疫組織化学的解析によって、歯髄における血管新生へのPGE₂レセプターサブタイプとの関与の実態に検討を加えることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット臼歯に**mineral trioxide aggregate (MTA)**で直接覆髄後、下記の解析を行った(承認番号 27, 新潟大学動物実験倫理委員会 新大研第 79号 1)。

〔分子細胞生物学的解析〕

①PGE₂輸送関連トランスポーター(MRP4およびPGT)およびPGE₂レセプター(EP2およびEP4)

の歯髄組織修復時における遺伝子発現量について、**MTA** で直接覆髄されたモデルラット歯冠部歯髄を試料としてリアルタイム **PCR** 法を用いて正常歯髄との経時的な比較解析を行った。

②矯正治療で抜歯適応と診断されたヒト抜去歯をスライスしたのち組織培養を行い(新潟大学歯学部倫理委員会 承認番号 **21-R17-09-10**)、**EP2** および **EP4** の特異的作動薬(**butaprost :EP2** 作動薬、**rivenprost :EP4** 作動薬)を添加あるいは非添加の条件で、血管新生に深く関与している **vascular endothelial growth factor (VEGF)**や **fibroblast growth factor (FGF)-2** に対する遺伝子発現解析(リアルタイム **PCR** 法)を実施した。

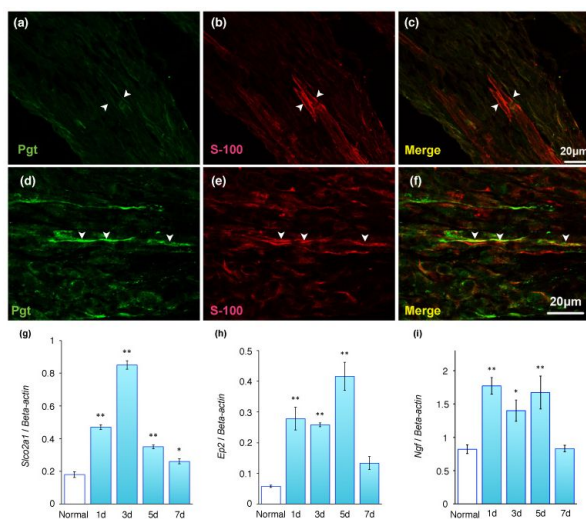
【免疫組織化学的解析】

①**MRP4**、**PGT** および **EP2**、**EP4** に対する特異抗体を使用して、正常および我々が開発した歯髄創傷治癒モデルラットを使用して、ラット臼歯の歯髄組織におけるこれらの局在を酵素抗体法および蛍光抗体法を用いて解析した。

②検索条件をヒトへ移行し、培養ヒト歯髄組織における **MRP4**、**PGT** および **PGE₂** レセプター(**EP2** および **EP4**)について、正常歯髄あるいは **EP2(butaprost)**あるいは **EP4(Rivenprost)**作動薬添加時の局在変化を酵素抗体法および蛍光抗体染色法を用いて比較解析した。さらに **CD31**(血管内皮細胞マーカー)に対する免疫組織化学的解析によって血管系の形態学的変化を解析した。

4 . 研究成果

(1)歯髄創傷治癒モデルラットを用いた解析



正常ラットの臼歯歯髄では **PGE₂** のトランスポーターである **Pgt**、特異的レセプターである **Ep2** と **Ep4** が象牙芽細胞あるいは血管内皮細胞・シュワン細胞に局在していることが確認された。

歯髄創傷治癒モデルラットを用いた解析では、処置後 **5** 日目で **PGT** および **EP2** 陽性反応が象牙芽細胞様細胞の突起部分に特異的に局在していることを確認した。また、処置後 **3-5** 日目の歯髄内の末梢神経において **PGT** の発現を認め、さらに **mRNA** の発現上昇も認められ

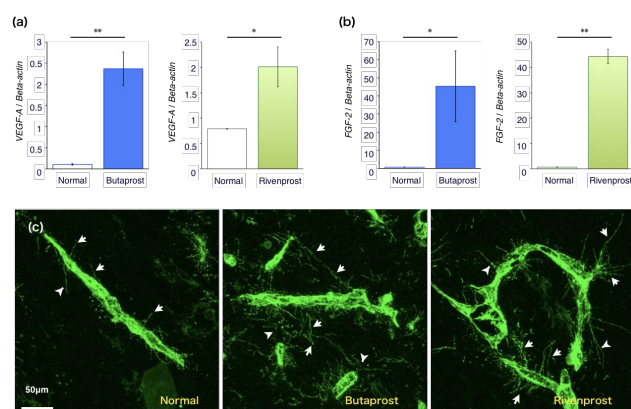
た。

(歯髄創傷治癒モデルラットの歯髄組織内における末梢神経に関する研究結果 (Ohkura N et al Sci Rep, 2017))

以上の結果から、象牙芽細胞や血管内皮細胞、末梢神経に局在している **PGT**、**EP2** および **EP4** は正常歯髄や創傷治癒時に展開される血管新生、修復象牙質形成ならびに末梢神経の保護に関与している可能性が示唆された。

(2)ヒト歯髄組織培養モデルを用いた解析

ヒト歯髄組織において、**PGE₂**を産生させる **microsomal PGE₂ synthase** が象牙芽細胞、血管内皮細胞および樹状細胞に局在していることが確認された。同様に **PGE₂**のトランスポーターである **MRP4** および **PGT**、さらに **PGE₂**の特異的レセプターである **EP2** および **EP4** に関しても象牙芽細胞、血管内皮細胞あるいは樹状細胞に局在していることが確認された。従って、これらの細胞において **PGE₂**の標的細胞として性質を備えることが示唆されるとともに、**PGE₂**の循環経路の存在と、特異的レセプターとの結合を介して、状態時の血流調整、急性炎症時の疼痛や血管反応、さらには象牙芽細胞の機能調節などのさまざまな役割を演じることが推定された。



続いて **EP2** および **EP4** の生理機能を解析するために、各アゴニスト (**EP2: Butaprost, EP4:Rivenprost**) を添加して 1 週間培養した歯髄組織を用いてリアルタイム PCR 解析を行ったところ (a, b)、**VEGF-A** および **FGF-2** ともに著明に増加した。さらに、**anti-human CD31** 抗体を用いた蛍光抗体染色による病理組織学的解析を行ったところ (c)、血管新生初期に認め

られる **tip-cell** 様の所見を呈し、作動薬非添加時の組織と比較して長く、かつ多数の傾向を示した。

以上の結果から、象牙芽細胞と血管内皮細胞に発現している **EP2** および **EP4** が各作動薬と結合することで、**VEGF-A** ならびに **FGF-2** の mRNA 発現が亢進するとともに、**CD31** 陽性 **tip-cell** 様細胞の出現から **EP2** および **EP4** ともに血管新生に関与している可能性が示唆された。また、**EP2** は筋線維芽細胞から **FGF-2** の産生を促し、オートクライン的に活性化する経路が存在しており、ここにも関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- ①大倉直人, 山本信一, 阿部達也, 竹内亮祐, 遠間愛子, 枝並直樹, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 野杵由一郎: マイクロスコップを用いた再歯根尖切除術の 1 例. 新潟歯学会誌. **48(1): 29-35, 2018.**
- ②大倉直人, 野杵由一郎: 歯髄創傷治癒のメカニズム. 歯内療法学会雑誌. **39(3): 120-125, 2018.**
- ③Yoshida N, Edanami N, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Hosoya A, Noiri Y, Nakamura H, Yoshida K. Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. *Int Endod J.* **51(11): 1187-1195, 2018.**
- ④Ohkura M, Ohkura N, Yoshida N, Yoshida K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Saito I, Okiji T. Orthodontic force application upregulated pain-associated prostaglandin-I2/PGI2-receptor/TRPV1 pathway-related gene expression in rat molars. *Odontology.* **106(1): 2-10, 2018.**
- ⑤Ohkura N, Edanami N, Takeuchi R, Tohma A, Ohkura M, Yoshida N, Yoshida K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Okiji T, Noiri Y. Effects of pulpotomy using mineral trioxide aggregate on prostaglandin transporter and receptors in rat molars. *Sci Rep* **7(1): 6870, 2017.**

⑥Edanami N, Yoshiba N, Ohkura N, Takeuchi R, Tohma A, Noiri Y, Yoshiba K. Characterization of dental pulp myofibroblasts in rat molars after pulpotomy. J Endod. 43(7): 1116-1121, 2017.

⑦Shigetani Y, Ohkura N, Yoshiba K, Ohshima H, Hosoya A, Yoshiba N, Okiji T. GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. Oral Dis. 22(5): 399-405, 2016

〔学会発表〕(計 10 件)

①Yoshiba K, Edanami N, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Yoshiba N, Noiri Y. Biocompatibility evaluation of calcium silicate-based materials in rat subcutaneous tissue. 2018 IADR/PER General Session, London, England, July 27, 2018.

②Yoshiba N, Yoshiba K, Edanami N, Tohma A, Takeuchi R, Ohkura N, Oda Y, Hosoya A, Noiri Y, Nakamura H. Bone marrow-derived fibrocytes are involved in human dental pulp repair. 2018 IADR/PER General Session, London, England, July 27, 2018.

③N Edanami, M Shirakashi, K Yoshiba, Razi Saifullah IB, N Ohkura, N Yoshiba, A Tohma, R Takeuchi, Y Noiri: Development of new rat model for studying regenerative endodontic procedures. International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium, Taipei, March 9-10, 2019.

④Razi SIB, Edanami N, Yoshiba K, Shirakashi M, Ohkura N, Yoshiba N, Tohma A, Takeuchi R, Hasegawa T, Noiri Y: Evaluation of pH and Calcium ion release in vitro and assessment of biomineralization activities of different calcium silicate sealers after rat subcutaneous implant. International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Symposium, Faculty of Dentistry Niigata University - Schools of Dentistry National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan, March 9-10, 2019.

⑤大倉直人, 遠間愛子, 竹内亮祐, 枝並直樹, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 野杓由一郎: ラット臼歯歯髄における創傷治癒時のアスコルビン酸輸送経路とその機能解析. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会(第 149 回), 京都, 2018 年 11 月 1-2 日, プログラムおよび講演抄録集 149 回: 33 頁, 2018.

⑥Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Edanami N, Takeuchi R, Tohma A, Oda Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T: Fibrillin-1 microfibrils influence human dental pulp regeneration. IADR Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya. Program and Abstract Book, Page 77.3)

⑦Edanami N, Yoshiba N, Ohkura N, Takeuchi R, Tohma A, Yoshiba K: Myofibroblasts in dental pulp healing after pulpotomy with mineral trioxide aggregate (MTA) in rat molars. IADR Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya. Program and Abstract Book, Page 80.

⑧大倉直人, 枝並直樹, 竹内亮祐, 遠間愛子, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 小田陽平, 興地隆史: 培養ヒト歯髄に対する prostaglandin EP2 レセプターアゴニストの影響. 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会(第 144 回), 栃木, 2016 年 6 月 9-10 日, プログラムおよび講演抄録集 144 回: 124 頁, 2016.

⑨大倉直人, 山本信一, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 野杓由一郎: 再治療の歯根尖切除術～マイクロスコープを使用して～. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会, 愛知, 2016 年 7 月 23-24 日, プログラム: 60 頁, 2016.

⑩大倉直人, 吉羽永子, 吉羽邦彦, 小田陽平, 興地隆史: 培養ヒト歯髄に対する prostaglandin EP4 レセプターアゴニストの影響. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡, 2016 年 10 月 21-23 日, プログラム・抄録集: 94 頁, 2016.