

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20456

研究課題名(和文) 歯髄細胞特異的因子によるマクロファージからのTNF- α 発現誘導機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the induction mechanism of TNF-alpha expression from macrophages by dental pulp cell specific factors

研究代表者

永安 慎太郎 (Nagayasu, Shintaro)

広島大学・医歯薬保健学研究所(歯)・助教

研究者番号：60635192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究室では歯髄細胞の培養上清をマクロファージに添加した場合、マクロファージからのTNF- α 産生能が顕著に亢進し、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯周靭帯細胞の培養上清では亢進しないことを示した。これらの結果は、歯髄細胞が分泌する何らかの因子がマクロファージの炎症を惹起する可能性を示唆している。またこれら培養ヒト歯髄細胞上清からexosomeを単離しその炎症促進活性を検討すると、培養上清と同様にマクロファージでの炎症性サイトカイン発現が上昇した。このことから、exosomeを含む細胞外微粒子が培養ヒト歯髄細胞上清中の炎症促進活性因子であると考えた。

研究成果の概要(英文)：In our laboratory, when the culture supernatant of dental pulp cells is added to macrophages, TNF-alpha producing ability from macrophages is remarkably enhanced, and it does not increase in culture supernatant of human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells. These results suggest that some factor secreted by dental pulp cells may cause macrophage inflammation. Moreover, when exosome was isolated from the culture supernatant of cultured human dental pulp cells and its inflammation promoting activity was investigated, inflammatory cytokine expression increased in macrophages like culture supernatant. From this, it was considered that extracellular microparticles including exosome are proinflammatory active factors in the supernatant of cultured human dental pulp cell.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：マクロファージ 歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

抜髄後は歯根破折や二次カリエスなどのリスクが高まることから、無髄歯が有髄歯より長期予後が悪いのはよく知られている事実である。強い疼痛を伴う不可逆的歯髄炎に抜髄処置を選択することは当然であるが、一方で、歯髄充血や歯髄充血から単純性歯髄炎への移行期などの可逆的・軽微な炎症時には可及的に歯髄保存的処置を選択することは歯の寿命を延長するうえで重要な要素である。歯髄炎に限らず炎症の初期反応では、患部に樹状細胞やマクロファージなどの炎症性細胞浸潤が認められ、炎症の成立に重要な役割を果たしていると考えられている。特にマクロファージが産生する炎症性サイトカインは炎症反応カスケードの最上流に位置すると考えられており、他の免疫細胞の活性化や分化などの機能調節を担っている。一方、歯髄組織は一旦炎症が起こると不可逆的変化に陥りやすく、閉鎖空間であるという解剖学的形態を考慮しても、歯髄組織中の主たる細胞である歯髄細胞がマクロファージと相互作用し歯髄組織特有の炎症の成立に寄与している可能性が考えられる。そこで、申請者が所属する研究室では、これまでに歯髄炎を想定した「歯髄細胞とマクロファージの共培養系」を確立し、単培養と比較して共培養系では、マクロファージからの炎症性サイトカイン産生性が相乗的に亢進することを明らかにしてきた (Yonehiro J, et al., Int Endod J, 2012.)。マクロファージが産生する炎症性サイトカインの中でも、TNF- α は非常に強力な前炎症性サイトカインとして知られ、一連のサイトカインネットワークの最上流に位置するとも言われている。申請者はマクロファージからの TNF- α 産生誘導因子を歯髄細胞が特異的に産生し、その液性因子が炎症早期に歯髄患部への走化性を誘導し、更には浸潤してきたマクロファージでの TNF- α などの炎症性サイトカイン産生・分泌を亢進させることで、歯髄組織では炎症が短期間に急性化するのではと仮説を立てた。そこで申請者は、不死化ヒト歯髄細胞、ヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯周靭帯細胞の培養上清をマクロファージ単独培養培地に添加した場合、歯髄細胞の上清を添加したときのみマクロファージから TNF- α の産生誘導が生じることを先行研究にて明らかにした (第 137 回日本歯科保存学会, 2012.)。更に、歯髄細胞から分泌される TNF- α の産生誘導因子の活性はグラム陰性菌由来内毒素(LPS)の活性より強かったことから、歯髄細胞が産生する分子は非常に強力な炎症誘導能を有すると考えられた。歯髄線維芽細胞の培養上清中の TNF- α 誘導因子の候補としてタンパク質、核酸、脂質などが挙げられ、マクロファージの活性に影響を与えていると考えられる。申請者はヒト不死化歯髄細胞とヒト歯肉線維芽細胞、および初代ヒト培養歯髄細胞とヒト歯肉線維芽細胞の間で発現遺伝子

解析をマイクロアレイの手法を用いて行い、歯髄細胞系の細胞に共通して高発現していた一連の分子群の中からいくつかの候補タンパク質の同定に成功している。また、興味深いことに、歯髄細胞培養上清を非特異的なタンパク質分解酵素である proteinase-K で処理した後にマクロファージ上清に添加すると、その TNF- α 産生性は優位に低下するものの、非処理と比較して 50%程度の低下に留まることが明らかとなった。尚、この proteinase-K 処理で培養上清中のタンパク質が完全に分解されることを銀染色法にて確認している。上記研究結果から、TNF- α 産生誘導因子はタンパク質のみではなく、核酸や脂質など、タンパク質やペプチド以外の歯髄細胞からの分泌因子もマクロファージに作用し、TNF- α 産生誘導に寄与している可能性が強く示唆された。そこで歯髄細胞がタンパク質に加えて、核酸を介してマクロファージから TNF- α の産生誘導を特異的に起こしているのではと考えるに至った。

2. 研究の目的

申請者はこれまで歯髄細胞の培養上清をマクロファージに添加した場合、マクロファージからの TNF- α 産生能が顕著に亢進し、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯周靭帯細胞の培養上清では亢進しないことを明らかにした。更に、タンパク質を不活性化した歯髄培養上清をマクロファージに添加した場合でも TNF- α の産生誘導が見られたことから、タンパク質に加えて核酸や脂質など複数の因子がマクロファージに作用し TNF- α 産生誘導に寄与している可能性が考えられる。本研究の目的は、これら歯髄細胞特異的なマクロファージからの TNF- α 誘導因子を同定し作用機序を解明することである。複数の因子が相互作用することで TNF- α の産生誘導が生じていることが予想できるため、本研究では 1) 歯髄細胞培養上清中の核酸(DNA, RNA)に焦点を絞り、マクロファージに対する TNF- α 誘導因子の同定を行い、2) それぞれの候補因子(核酸、タンパク質)を組み合わせた場合の相互作用についても検討を行う。候補因子が同定できた段階で 3) 同定した核酸・タンパク質によるマクロファージにおける TNF- α 誘導メカニズムの解明、特に受容体を確認することは作用機序の全容解明に大きく貢献すると考えられる

3. 研究の方法

【平成 28 年度】

候補核酸の同定と TNF- α 産生誘導能の確認

供試細胞：ヒト不死化歯髄細胞、ヒト歯髄細胞、ヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯周靭帯細胞をコンフルエントまで培養し、その後非血清の調整培地に交換、24 時間後にその上清を回収する。不死化歯髄細胞の性状は (Kamata N et al., J Oral Pathol Med, 2004.) に記載。

培養上清からの mRNA の回収: Oligo(dT)25 をコートした磁気ビーズ (Dynabeads, Life

and Technologies)を回収した培養上清と混合させ、培養上清中に微量に存在する mRNA を濃縮・回収する。死細胞から放出された偽分泌 mRNA のコンタミネーションを避けるために、細胞上清の回収は無血清調整培地に交換後 24 時間のみとする。必要経費で計上した卓上遠心機を使用し回収の効率化を図る。これまでの研究結果から、24 時間では顕微鏡下でこれら細胞の接着性は維持され、浮遊細胞が認められないことを確認している。

培養上清からの DNA の回収：溶液からの DNA 回収用にデザインされた磁気ビーズ (63006 Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal) を回収した培養上清と混合させ、培養上清中に微量に存在する DNA を濃縮・回収する。

エキソソームからの核酸の回収：歯髄細胞から分泌されるエキソソーム内に目的の mRNA や DNA を含む核酸物質が内包されてマクロファージへと受け渡されている可能性がある。この場合は、超遠心分離法にショ糖密度勾配液、またはショ糖 クッション溶液を組み合わせて培養上清中からエキソソームを他の小胞体や粒子から分離し回収する。その後エキソソームから目的の DNA、mRNA を回収する。

TNF- 産生能：回収した mRNA 及び DNA をそれぞれ無血清標準培地に混合し、マクロファージをこの培地で 24 時間培養する。24 時間の形態変化を観察、記録すると共に、24 時間後の上清を回収し、上清内の TNF- 量を ELISA (Bio-Rad) キットで測定する。また、DNAase あるいは RNAase 処理による影響をそれぞれ調べる。

核酸とタンパク分子との相互作用：回収した核酸と先行研究で同定した候補タンパク質を単独あるいは同時にマクロファージの培養上清に添加し、マクロファージからの TNF- 産生の違いを比較検討する。

【平成 29 年度】

mRNA または DNA 責任配列の同定：mRNA の場合には、コントロールとして用いる歯肉線維芽細胞培養上清から同様の方法で単離した mRNA との発現比較をマイクロアレイ (Genechip, affymetrix) にて解析する。そして、歯髄線維芽細胞培養上清に高分泌される mRNA について、通法に従い cDNA に逆転写した後に、制限酵素サイトのついた PCR プライマーで目的配列を増幅し pBluescript-SK(+) vector にライゲーションする。その後、このベクターの T3 または T7 RNA プロモーターを利用し、目的 RNA を大量に精製する。その後、得られた RNA を無血清標準培地に加えマクロファージを刺激し、その目的配列が TNF- 産生能を誘導する責任配列であるかを確認する。一方、DNA にマクロファージにおける TNF- 産生能が認められた場合には、mRNA のように既知配列をターゲットとしたマイクロアレイ解析法が確立されていないため、サブトラクション法 (PCR-select Bacterial Genome Subtraction

Kit, Clontech Laboratories, Inc.) によって配列を決める。

新規同定した核酸と、すでに同定している候補タンパク質による TNF- 誘導メカニズムの解析

(1) 候補タンパク質の受容体の同定：受容体を同定するために候補タンパク質がマクロファージにおいて結合した蛋白を単離する。まず Glutathione s-transferase (GST) 融合タンパク合成用のベクターを用いて GST 融合候補タンパク質を合成する。特異抗体によるウェスタンブロット法での検出で最終的に組み換え体を確認する。次にプルダウンアッセイによって候補タンパク質に結合するタンパク質の単離を行う。マクロファージから膜画分と細胞質画分を調整し各々の画分と glutathione-Sepharose 4B beads に結合させた GST 融合組み換え候補タンパク質を反応させる。DPTIF 結合蛋白を溶出後、2 次元電気泳動で展開し、GST 融合組み換え候補タンパク質のみをサンプルとして用いた系をコントロールとし、膜画分、細胞質画分それぞれの泳動パターンで特異的に検出されるスポットを検出し、目的とする受容体タンパク質の候補分子とする。スポットを溶出しマトリックス支援レーザ脱離イオン化法、飛行時間型質量分析法を用いて受容体の同定を行う。

(2) 同定した核酸の細胞内への移行について：同定した核酸による TNF- 誘導が同様のシグナルパスウェイを介するのかわを TLR の中和抗体を用いて検討する。また、特に同定核酸が mRNA であった場合、一般的に全長は数千 bp であるので、細胞膜や細胞質に受容体は存在せず、直接マクロファージの核内に取り込まれて転写されている可能性を考えている。そこで、同定した mRNA または DNA を cy3 または cy5 で標識し、マクロファージ上清中に添加し、経時的にその細胞内への取り込みを解析することで、その受容体が細胞膜上、細胞質内、核内かを併せて検討する。

4. 研究成果

我々の研究室では歯髄細胞の培養上清をマクロファージに添加した場合、マクロファージからの TNF- 産生能が顕著に亢進し、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯周靭帯細胞の培養上清では亢進しないことを示した。これらの結果は、歯髄細胞が分泌する何らかの因子がマクロファージの炎症を惹起する可能性を示唆している。また、歯髄培養上清による TNF- 産生誘導への NF- κ B の関与も検討した。培養上清をマクロファージに添加しサンプルを回収後、NF- κ B サブユニット p65 のリン酸化蛋白をウェスタンブロット法にて検出した結果、マクロファージの p65 のリン酸化は歯髄培養上清添加によって顕著に促進した。またこれら培養ヒト歯髄細胞上清から exosome を単離しその炎症促進活性を検討すると、培養上清と同様にマクロファージでの炎症性サイトカイン発現が上昇した。このこ

とから、exosome を含む細胞外微粒子が培養ヒト歯髄細胞上清中の炎症促進活性因子であると考えた。我々は培養ヒト歯髄細胞上清中から回収した微小小胞 (microvesicles : MVs) とマクロファージの炎症促進活性の関連について検討した。精製した細胞外微粒子を分化 THP-1 に作用させ TNF- α 産生量を測定した。0.8 μ m で限外濾過した培養上清は無濾過と同等の TNF- α 産生誘導を認めたが、0.45 μ m で限外濾過した培養上清には産生誘導能がほとんどなかった。さらに遠心法で得られた歯髄細胞由来 MVs で分化 THP-1 を刺激すると、100ng/ml の低濃度刺激下で培養上清と同等の著明な TNF- α 産生誘導を認めた。一方、ヒト歯肉線維芽細胞から得られた MVs には活性がなかった。今後、歯髄細胞からの MVs や exosome などの細胞外微粒子の放出や、その反応として引き起こされる免疫応答およびその抑制機構を解明することで、歯髄炎のみならず炎症性疾患の成因を明らかにできる可能性がある。

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)

The Inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiyama A, Nagasaka S, Nishimura F. *Nephrol Dial Transplant*. 2014.Mar;29(3):611-8.(査読有り).

Smoking and adipose tissue inflammation suppress leptin expression in Japanese obese males: Potential mechanism of resistance to weight loss among Japanese obese smokers. Shintaro Nagayasu, Shigeki Suzuki, Akiko Yamashita, Ataru Taniguchi, Mitsuo Fukushima, Yoshikatsu Nakai, Naoya Watanabe, Shoichiro Nagasaka, Daisuke Yabe, Kazuko Nin, Fusanori Nishimura. *Tobacco Induced Diseases*.2012.Feb 28;10:3.(査読有り).

Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. Hideo Nakarai, Akiko Yamashita, Shintaro Nagayasu,

Misaki Iwashita, Sonoko Kumamoto, Hideki Ohyama, Masaki Hata, Yoshihiko Soga, Akifumi Kushiyama, Tomoichiro Asano, Yoshimitsu Abiko, Fusanori Nishimura. *Innate Immun*. 2012.Feb;18(1):164-70.(査読有り).

[学会発表] (計 1 件)

永安慎太郎、鈴木茂樹、小武家誠司、柴秀樹 培養ヒト歯髄細胞上清からの炎症促進 Microvesicles の単離 第 147 回日本歯科保存学会学術大会 岩手 26,27

Oct 2017

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

永安 慎太郎 (NAGAYASU SHINTARO)

広島大学・医歯薬保健学研究所(歯)・助教

研究者番号 : 60635192