

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17118

研究課題名(和文) 内在性タンパク質HMGB1による非感染性歯髄炎の発症メカニズムの解明と臨床的展開

研究課題名(英文) Mechanism of non-infectious pulpitis caused by HMGB1, endogenous protein, and its clinical application

研究代表者

山本 弥生子 (Yamamoto, Mioko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50732749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：非感染性の炎症疾患に關与するHigh mobility group box 1(HMGB1)と呼ばれる核内タンパク質と歯髄の炎症の關与を調べるために、株化マウス歯乳頭細胞(MDP)を用いて壊死細胞上清を作成し、MDPに添加した。その結果MDPの細胞増殖の抑制、炎症性サイトカインであるInterleukin-6(IL6)の遺伝子発現、IL6タンパク質産生の増加を認め、さらにHMGB1タンパク質の放出を認めた。また、HMGB1タンパク質をMDPに添加したところIL6およびHMGB1の遺伝子発現の増加を認めた。これにより壊死細胞上清中のHMGB1が歯髄の炎症に關与す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

歯を長期にわたって口腔内で保存するためには歯髄の保存が重要である。歯髄炎・歯髄壊死は歯髄を失う原因である。通常の歯髄炎はう蝕によっておこる。しかし、う蝕のない歯においても歯髄炎や歯髄壊死を認めることがあり非感染性の關与が疑われる。High mobility group box 1(HMGB1)と呼ばれる核内タンパク質はダメージを受けた細胞から放出され炎症を修飾する。この研究ではHMGB1と歯髄細胞の炎症との關連について調べた。この研究は歯髄における非感染性の炎症のメカニズムの一端を解明する一助となり将来歯髄炎を抑制する治療戦略の創生につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the involvement of a nuclear protein called high mobility group box 1 (HMGB1), which is involved in non-infectious inflammatory diseases, in pulp inflammation, necrotic cell supernatants were prepared using mouse dental papilla cells (MDP) and added to MDP. The results showed that MDP inhibited cell proliferation, increased gene expression of the pro-inflammatory cytokine Interleukin-6 (IL6) and IL6 protein production, and also released HMGB1 protein. In addition, when HMGB1 protein was added to MDP, gene expression of IL6 and HMGB1 was increased. This suggests that HMGB1 in NCS may be involved in the inflammation of dental pulp.

研究分野：歯内治療

キーワード：HMGB1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯を口腔内で長期に保存するためには歯髄の保存が重要である。歯髄が炎症を起こし不可逆性歯髄炎となると抜髄を行う必要がある。通常の歯髄炎は主にう蝕に继发し、細菌感染によって誘発される生体防御反応がその主体であるが、う蝕に继发しない歯髄炎も存在する。咬合性外傷、矯正治療、バーといった歯科用機材による切削の後に発症する歯髄炎は、細菌感染ではなく物理的侵襲が原因と考えられているがその発症メカニズムはいまだ不明である。

High mobility group box 1 (HMGB1)は、関節リウマチや全身性エリテマトーデス、アテローム性動脈硬化症といった非感染性疾患への関与が報告されている。HMGB1は非ヒストン性核タンパク質であり、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)や damage or danger-associated molecular patterns (DAMPs)の刺激により細胞から放出される。HMGB1はToll-like受容体(TLR) 2,4などに結合し、NF- $\kappa$ Bを活性化し炎症を惹起する。歯髄におけるHMGB1の発現、あるいは歯髄炎発症時でのHMGB1の発現増加などの報告がある。しかし、非細菌性歯髄炎とHMGB1の関連についてはいまだに明らかでない。

### 2. 研究の目的

申請者はHMGB1に着目し歯髄におけるHMGB1と炎症のかかわりについて解明することを目標とした。非感染性の歯髄の炎症を調べるためにHMGB1が含まれると考えられる壊死細胞上清(NCS)を刺激として用いた。NCSを歯髄細胞に添加し歯髄炎におけるHMGB1の役割について検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1)壊死細胞上清の作成

壊死歯髄細胞より放出されるHMGB1の作用を検討する目的で、不死化したマウス歯乳頭細胞(MDP)のNCSを用いた。NCSは、MDPの凍結融解を5回繰り返した後遠心して作成した。

#### (2)細胞増

細胞毒性検討するためにNCSをMDPに添加し12時間後にミトコンドリア活性をWSTアッセイ(cell counting kit-8, Dojindo)を用いて検討した。

#### (3)炎症性サイトカインの発現

MDPにNCSを添加後、2、6、12時間後にmRNAを抽出し、Interleukin-6(IL6)、Interleukin-1 alpha(IL1)を特異的プライマーを用いて定量PCRおよびELISA(Mouse IL-6 DuoSet ELISA, R&D Systems)で検討した。

#### (4)HMGB1の発現

NCS中及びNCS添加後の細胞上清中のHMGB1タンパク量をELISA(HMGB1 ELISA Kit Exp, シノテスト)にて検討した。

#### (5)HMGB1タンパク質添加

HMGB1タンパク質を添加後にmRNAを抽出し特異的プライマーを用いて定量PCRにて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞増殖

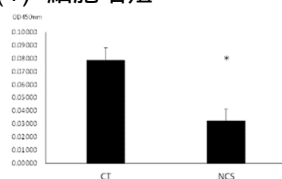
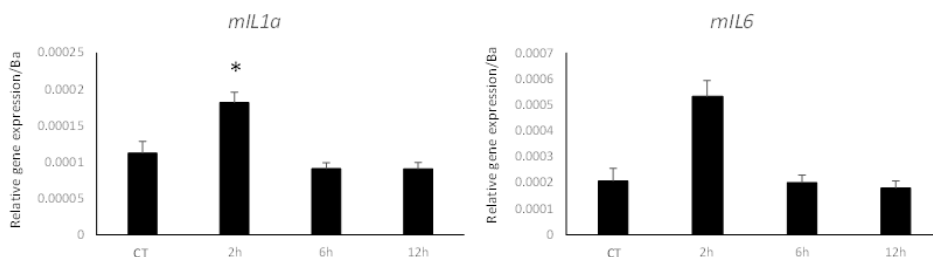


図1 NCS添加12時間後の細胞毒性

NCS添加後12時間で細胞増殖の抑制が認められた。

#### (2)炎症性サイトカインの発現



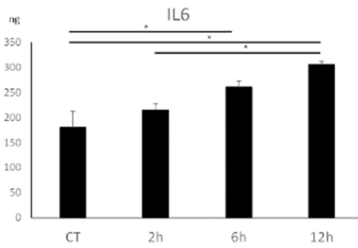


図2 NCS 添加後の炎症性サイトカインの発現遺伝子発現(上図)と IL6 タンパク質の産生(左図)

炎症性サイトカインの遺伝子発現は NCS 添加後 2 時間で優位に上昇した。IL6 タンパク質の産生は NCS 添加によって増加した。

#### (4) HMGB1 の発現

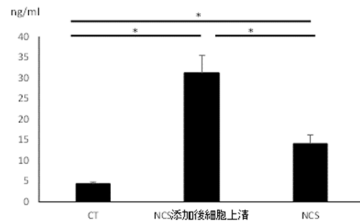


図3 NCS および NCS 添加後の細胞上清中の HMGB1 タンパク質

HMGB1 タンパク質量は NCS 添加後の細胞上清で添加した NCS 中よりも増加した。

#### (6) HMGB1 タンパク質の影響

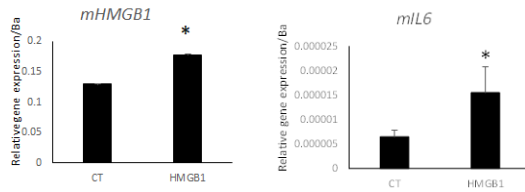


図4 HMGB1 タンパク質添加後の遺伝子発現

MDP に HMGB1 タンパク質を添加したところ 2 時間で HMGB1 および IL6 の遺伝子発現の増加が認められた。

以上の結果をまとめると、MDP において NCS 添加は 1 2 時間において細胞の増殖を抑えることが確認された。また NCS 添加 2 時間後には IL6 および IL1 の遺伝子発現が上昇し、NCS 添加後 6 時間以降での IL6 タンパク質の産生が増加した。ヒト歯髄細胞を用いた実験でも同様の結果が認められた。MDP では NCS 添加後の細胞上清中において HMGB1 タンパク質の放出も確認された。HMGB1 タンパク質添加においても HMGB1 および IL6 の遺伝子発現が増加した。以上のことから NCS には HMGB1 を含む DAMPs が含まれておりそれが炎症性サイトカインの発現に参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3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sonoko Noda, Nobuyuki Kawashima, Mioko Yamamoto, Kentaro Hashimoto, Keisuke Nara, Ichiro Sekiya, Takashi Okiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Cell Culture Density on Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells With Reference to Osteogenic Differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 5430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41741-w.	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 橋本 健太郎, 川島 伸之, 野田 園子, 山本 弥生子, 野崎 浩佑, 興地 隆史	4. 巻 40
2. 論文標題 Bioactive Glass配合根管シーラーの特性に与える加熱処理の影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20817/jeajournal.40.3_167	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 Noda Sonoko, Kawashima Nobuyuki, Yamamoto Mioko, Hashimoto Kentaro, Nara Keisuke, Sekiya Ichiro, Okiji Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of cell culture density on dental pulp-derived mesenchymal stem cells with reference to osteogenic differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41741-w	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Orikasa S, Kawashima N, Fujii M, Yamamoto M, Hashimoto K, Tazawa K, Okiji T.
2. 発表標題 Hypoxia-inducible factor 1 induces osteo-/odontoblast differentiation of mouse dental papillae cells via Bcl9 and Bcl9l, Wnt/ -catenin transcriptional cofactors
3. 学会等名 バランスユニット研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Orikasa S, Kawashima N, Fujii M, Yamamoto M, Hashimoto K, Tazawa K, Okiji T.
2. 発表標題 Hypoxic condition induces hypoxia-inducible factor 1 and upregulates Wnt/ $\beta$ -catenin transcriptional cofactors, Bcl9 and Bcl9l, in mouse dental papillae cells
3. 学会等名 The 21st KACD-JSCD Joint Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------