

令和元年5月17日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17135

研究課題名(和文)象牙質基質タンパク質 Phosphophoryn による抗炎症作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the anti-inflammatory mechanism by dentin matrix protein, phosphophoryn

研究代表者

小武家 誠司(Kobuke, Seiji)

広島大学・医歯薬保健学研究所(歯)・専門研究員

研究者番号：50744794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄組織は、う蝕などで象牙質が露出した後も免疫応答によって不可逆性炎症への移行を抑制している。この研究では、象牙質・歯髄複合体に存在する多量な非コラーゲン性タンパク質の一つであるPhosphophoryn(PP)に着目し、PPが抗炎症能を持つかを検討した。その結果PPは、LPSに直接的に結合してTNF- α 産生量を有意に減少させた。またLPS誘導による敗血症モデルマウスでは、PPの前投与はマウス致死率を有意に抑制した。さらに肝臓中の炎症性サイトカイン遺伝子(IL-6, IL-1, TNF- α)の発現を有意に抑制した。以上の結果から、PPが炎症制御因子として機能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

今回の研究によってPhosphophoryn (PP) が抗炎症作用を有していることが明らかとなった。このことからPPは、抗炎症作用と硬組織誘導能によって歯髄の恒常性維持に関与していることが示唆された。う蝕などの歯の硬組織疾患の初期段階において象牙質が脱灰した際には、PPは溶出し露出した象牙細管を通じて歯髄組織内に流入し、外来刺激に暴露された歯髄組織における炎症の初期反応を抑制する因子として機能している可能性が考えられる。このような炎症制御因子としての機能に着目し、PPを新たな覆髄剤として応用するための研究へとつながったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Phosphophoryn (PP) is the most abundant non-collagenous protein in dentin. The purpose of this study was to investigate the effects of PP on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses. rPP reduced the expression of LPS-induced inflammatory genes, such as TNF- α , IL-1, and IL-8, and TNF- α protein secretion from the macrophages. In addition, rPP was able to physically bind to LPS. LPS-induced sepsis model mouse, rPP significantly reduced case fatality rate. Furthermore, rPP significantly reduced the expression of LPS-induced inflammatory cytokine gene (IL-6, IL-1, TNF- α) of livers. These results suggested that rPP inhibited LPS-induced inflammatory responses by binding to LPS.

研究分野：歯内療法

キーワード：炎症抑制 象牙質・歯髄複合体

1. 研究開始当初の背景

う蝕などによってエナメル質や象牙質に実質欠損が生じ、象牙質表層が口腔内に露出すると、象牙細管を通して歯髄組織に口腔内の細菌、温熱、化学等の刺激が加わる。このような外来刺激に暴露された歯髄組織では、まず初めに象牙芽細胞周囲にマクロファージや樹状細胞等が浸潤し初期炎症反応が惹起される。しかしながら、このような外来刺激に暴露された歯髄組織において、急性歯髄炎が必ずしも発症するとは限らず、自発痛、冷温水痛等の自覚症状が生じることなく経過することが臨床的に多く観察される。このような臨床的経験から、外来刺激に対する歯髄組織の抗炎症制御のメカニズムにおいて、反応性象牙質形成による歯髄組織の物理的保護のみならず、炎症の初期反応を制御し不可逆性歯髄炎発症を抑制する因子が象牙質歯髄複合体内に存在することが想定される。ヒト象牙質の有機質に含まれる主要なタンパク質は Type I collagen であり、重量比で有機質の約 90% を占める。非コラーゲン性タンパク質のうち最も多く存在するものは Phosphophoryn (PP) であり、質量比でその約 50% を占めている。PP はヒト常染色体 4q21 に存在する *Dentin Sialophosphoprotein (DSPP)* 遺伝子にコードされる DSPP の開裂産物であり、DSPP は Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) ファミリーに属している。これら SIBLING タンパク質は象牙質基質形成やその石灰化に重要な働きを担うことが報告されている。また PP は細胞内のシグナルを活性化することによって MC3T3-E1 細胞などの骨芽細胞分化を誘導する因子としても機能する。

2. 研究の目的

本研究では PP が歯髄組織の恒常性維持に寄与する因子であることを明らかにするために、recombinant PP (rPP) を作製し、*in vitro* と *in vivo* で rPP の抗炎症機能を評価した。

3. 研究の方法

まず rPP の抗炎症作用に関して、LPS 刺激マクロファージ様細胞を用いた *in vitro* 炎症モデルにおいて検討を行った。ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1 細胞) を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によって 24 時間刺激し、マクロファージ様細胞へ分化誘導後、様々な濃度の rPP (0.01 ~ 1 μ M) と共に LPS (10 ng/ml) で刺激した。24 時間培養後に total RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を合成、得られた cDNA を鋳型として各種プライマーを用いた quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法によって炎症性サイトカイン (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-8*) 遺伝子発現を調べた。また、様々な濃度の rPP (0.01 ~ 1 μ M) と LPS (10 ng/ml) で刺激した後に培養上清を回収した。回収した培養上清中の TNF- α 量を ELISA 法を用いて測定した。さらに rPP (0 ~ 100 pmol) を 96 well プレートに添加し 16 時間静置した。非

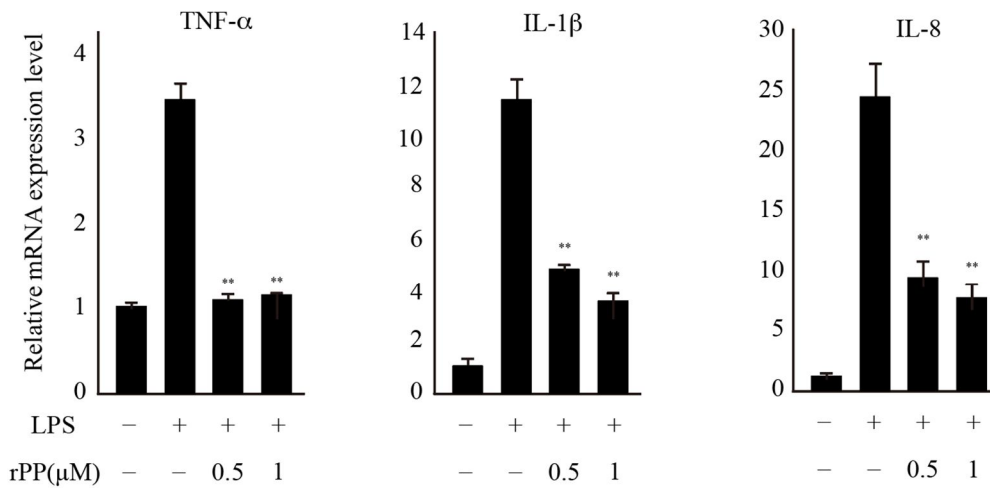
接着余剰 rPP を PBS で洗浄除去し、ブロッキングを行った。引き続き、ビオチン化 LPS を各 well に添加し、ウェル上の rPP とビオチン化 LPS との結合を streptavidin-HRP および TMB 溶液を用いた発色量で調べた。

次に LPS 依存性炎症反応に対する rPP の抑制効果を *in vivo* で検討するため、rPP 投与が D-GalN / LPS 誘導性マウス敗血症モデルにおける致死性炎症を抑制できるかについて検討した。D-GalN (800 mg / kg) と LPS (1 μ g / kg) を腹腔内投与し、敗血症モデルマウスを作製した。rPP 投与群では、rPP (0.1 μ mol / kg) 投与後 30 時間までの生存率を 5 時間ごとに算出した。コントロールとして、0.1 μ mol / kg の recombinant DMP-1(rDMP-1)を使用した。致死性炎症の抑制については生存率、肝臓の病理組織学的観察、および肝臓組織内における各種炎症性サイトカインの遺伝子発現によって評価した。

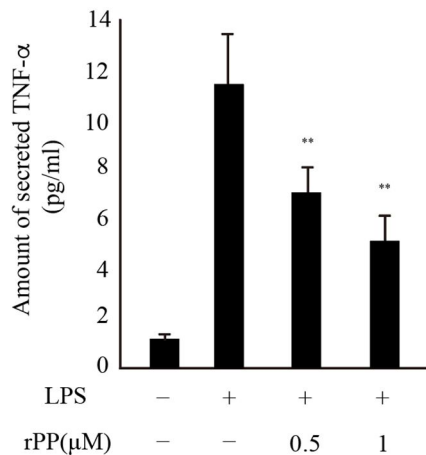
4 . 研究成果

in vitro 炎症モデルでの実験では、rPP は LPS 刺激によって亢進されたマクロファージ様細胞における *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-8* 遺伝子発現を抑制した (図 1)。続いて、LPS 刺激時の *TNF- α* 分泌量に対する rPP 同時投与の影響を検討したところ、濃度依存的に *TNF- α* 分泌が抑制された (図 2)。次に、rPP と LPS の直接的介合の有無を検討するため、ビオチン化 LPS の結合量を検討したところ、LPS の rPP への結合量は rPP の量依存的に増加することが明らかとなった。

また rPP の炎症抑制効果を *in vivo* LPS 誘導性マウス敗血症モデルで検討したところ、LPS 投与群 (n=18) の生存曲線は経時的に低下し、投与後 30 時間においては 7% に至った。rPP を前投与 (n=15) することによって投与後 30 時間において生存率は 66% となり有意に改善を示した。一方、rDMP-1 を前投与しても生存率は改善しなかった。続いて、肝臓の肉眼所見を比較したところ、LPS 投与群では、投与後 7.5 時間では肝臓の顕著な鬱血、肥大を示すのに対して、LPS / rPP 投与群ではこれらの所見が改善されていた。一方で LPS / rDMP-1 投与群では鬱血、肥大は改善しなかった。H-E 染色による組織学的解析では、LPS 投与群においては肝小葉の肝細胞の正常な配列が崩壊しているが、LPS / rPP 投与群では細胞配列が保たれていた。LPS / rDMP-1 投与群では、細胞配列は崩壊しており、LPS / rPP 投与群で観察されたような配列の改善は観察されなかった。各群の肝臓組織における各種炎症性サイトカイン (*IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α*) の遺伝子発現を検討したところ、LPS 投与群で上昇した各遺伝子発現は、rPP 投与によって有意に抑制されたが、rDMP-1 投与群では抑制されなかった。



(図1) LPS誘導炎症性サイトカイン遺伝子発現にrPPが与える影響



(図2) LPS誘導性TNF-α分泌量にrPPが与える影響

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Suzuki S, Hoshino H, Yoshida K, Nakanishi J, Tsuchiya-Hirata S, Kobuke S, Haruyama N, Nishimura F, Shiba H. Genome-wide identification of chromatin-enriched RNA reveals that unspliced dentin matrix protein-1 mRNA regulates cell proliferation in squamous cell carcinoma. Biochemical and Biophysical Research Communications. 496, 2303-2309, 2018, 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbrc.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 鈴木茂樹、吉田和真、中西惇、土屋志津、小武家誠司、永安慎太郎、本山直世、柴 秀樹、クロマチン局在 DMP-1 遺伝子による細胞増殖制御機構の解明、日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会（第 147 回）、2017 年
2. 中西惇、鈴木茂樹、吉田和真、本山直世、小武家誠司、永安慎太郎、土屋志津、柴秀樹、Phosphoryn の持つ抗炎症機能領域の探索、日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会（第 147 回）、2017 年
3. 永安慎太郎、鈴木茂樹、中西惇、吉田和真、小武家誠司、本山直世、土屋志津、西村英紀、柴秀樹、培養ヒト歯髄細胞上清からの炎症促進 Microvesicles の単離、日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会（第 147 回）、2017 年