

平成21年 6月18日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390508
 研究課題名（和文） 急性歯髄炎に対する PAR-2 SiRNA を用いた分子アナログによる治療応用
 研究課題名（英文） Therapy application of molecular analog using PAR-2 siRNA in the acute pulpitis
 研究代表者
 鳥居 光男（TORII MITSUO）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：30116066

研究成果の概要：

1. 歯髄細胞における gingipain に対する創傷治癒に関するシグナル因子 PI3K-Akt の活性に変化はなかった。ストレス反応性細胞死に関するシグナル伝達因子 p38 MAPK および JNK の活性は優位に増強された。また、NF- κ B および AP-1 の転写因子は gingipain 刺激に対して両社とも活性の上昇を認めた。
2. PAR-2 に対する SiRNA を形質導入した歯髄細胞を gingipain にて刺激したところ、IL-6 および IL-8 の産生は抑制された。
3. 急性歯髄炎と診断された歯髄組織からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットにて分析したところ、PAR-2 抗体に反応するバンドが多数検出された。
4. 歯髄細胞を gingipain にて刺激したところ、濃度依存的に細胞死を誘導していることがわかった。

以上から、急性歯髄炎における PAR-2 の役割は細菌が産生する病原因子であるプロテアーゼを介して、炎症反応および細胞死に関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度	6,400,000	0	6,400,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	15,400,000	2,700,000	18,100,000

研究分野：歯内治療学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：PAR-2, siRNA, 急性歯髄炎

1. 研究開始当初の背景

急性歯髄炎は、日常で直面する大きな痛みを有するものの1つである。多くの場合、その治療方針は歯髄組織の除去を伴う（抜髄処置）ものであり、歯科保存学を研究対象とする中で最も避けたい処置の1つである。歯髄組織を失った歯牙の行末は、いくら補綴処置で修復しようとも、栄養の届かない無味（人工的）なものであり、歯の寿命を短くさせる決定的なものである。そこで我々は、鎮痛・消炎効果のある薬剤の開発のために歯髄細胞を用いた基礎的分析を進める目的で本プロジェクトを計画した。

2. 研究の目的

現在我々は、歯髄炎が神経ペプチドを原因とした神経原生炎症であるという観点から、歯髄炎における神経ペプチドの関連性について研究中である。神経ペプチド（サブスタンスPやカルシトニン遺伝子関連タンパク）が病原細菌のLPSによる炎症を増強させること、およびこれらに対するレセプターが歯髄細胞に発現していることなどを報告してきた。また、病原細菌由来のプロテアーゼ（Gingipain）が歯髄細胞表面上のプロテアーゼ活性化受容体（PAR-2）を介して、神経ペプチド（サブスタンスP、CGRP）を誘導することを明らかにした。

歯髄細胞に炎症が起ると、肥満細胞をはじめとした各種炎症性細胞が局所に集積し、それらは多くの炎症性メディエーターを発する。その中のひとつであるプロテアーゼは血漿中の凝固一線溶系、キニン-カリクレイン系および補体系などのプロテアーゼカスケードは白血球、血管内皮細胞と呼応しつつ、炎症反応の発現および進展に深く関わっている。各プロテアーゼによるタンパク質分解は不可逆であるため、生態は多量のプロテアーゼ阻害剤を用意して、過剰なタンパク質分解が起こらないように絶えず調節している。しかし、その防御をかいくぐって過剰のタンパク質分解が起こる時、病的異常が発生する。歯髄感染性の細菌が産生するトリプシン様プロテアーゼ（Gingipain）は、マトリックスタンパク質を分解し、歯髄組織を直接破壊する病原因子として注目されている。また、同酵素はプロテインカスケードを修飾することも明らかになった。今村らは、この酵素がブラジキニン産生、フィブリノーゲン/フィブリン分解、さらに血液凝固第X因子の活性化を促し、凝固一線溶系およびキニン-カリクレイン系のカスケード反応を攪乱して、組織局所の炎症反応を強力に惹起する可能性を示唆した。Gingipainに対する阻害剤は生体内にまったく存在しないため、Gingipainによる組織破壊は、急速にかつ不可逆的に進行することとなる。このようなことから、同酵素に対する阻害剤

は、抗炎症薬としてきわめて有効な治療薬となりえる。

セリンプロテアーゼ阻害剤の一つであるメシル酸ナファモスタット（nafamostat mesilate, NM）は、急性膵炎の治療薬として最近開発されたものであり、セリン蛋白分解酵素を阻害し、各種実験的急性膵炎に対し有効であることが報告されている。プロテアーゼ阻害剤は、病気の進展を阻止するため生体にとっては必要不可欠なものであり、NMをはじめとするプロテアーゼ阻害剤の体外からの投与は、有効な治療法の一つとして臨床的に脚光を浴びている。NMは急性膵炎の治療薬として認可されており、その安全性は十分検討されている。今回、歯髄への覆膜剤に含ませる形で用いても、その作用は極めて局所的なものであり全身的な副作用をおこす可能性は低いと考えられる。

一方、RNA干渉（SiRNA）は最も進んだ遺伝子治療戦略のひとつであり、従来のアンチセンスRNA法に比べて微量で特異的に目的の遺伝子の転写活性を抑制するため、臨床応用的にその安全性と効果において最近脚光を浴びている。医学的には加齢性黄斑変性、HCV、癌、およびハンチントン病（HD）ではすでに本手技による薬剤がアメリカで臨床試験の段階であり、動物実験はすでにクリアされている。

これらの事実をふまえて、我々は強力なセリンプロテアーゼの阻害剤であるNafamostat mesilate（NM）に注目し、またPAR-2のシグナル伝達を分析することで、標的分子のSiRNAを作製し、この薬剤の急性歯髄炎に対する局所的抗炎症剤としての可能性をさぐることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞におけるPAR-2を介するシグナル伝達機構の解明（作田）

- ・ 歯髄細胞におけるgingipainに対する創傷治癒に関するシグナル伝達因子（PI3K-Akt）の活性機構を調べる。
- ・ 歯髄細胞におけるgingipainに対するストレス反応性細胞死に関するシグナル伝達因子（ERK, p38 MAPK, JNK）の活性機構を調べる。
- ・ 歯髄細胞におけるgingipainに対する炎症性メディエーターを誘導する転写因子（NF- κ B, AP-1 etc）の活性経路を調べる。

(2) 歯髄細胞における、セリンプロテアーゼ阻害剤の効果分析（徳田）

- ・ 歯髄細胞におけるPAR-2の発現状態を免疫蛍光試験にて確認する。
- ・ Gingipainのproteolytic activity

に対するNMの抑制能力を分析する。対象として同様のプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ガベキサート (gabexate mesilate) を用いる。

- ・ 歯髄細胞におけるgingipain, trypsinによる炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-6, IL-8等) の産生に対するNMの抑制効果 (mRNA, protein level) を調べる。
- ・ 歯髄細胞におけるgingipain, trypsinによる神経ペプチド (CGRP, Substance P) の産生に対するNMの抑制効果 (mRNA, protein level) を調べる。
- ・ 歯髄細胞におけるgingipain, trypsinによるシグナル伝達物質 (各種MAPK) の活性経路に対するNMの影響 (Western Blot analysis) を調べる。
- ・ 歯髄細胞におけるgingipain, trypsinによる転写因子 (NF- κ B, AP-1 etc) の活性経路に対するNMの影響 (Gel shift assay) を調べる。

- (3) 分子アナログを用いた歯髄炎制御の可能性の検討 (鳥居)

標的遺伝子 (PAR-2) に対するSiRNAオリゴヌクレオチドをSantaCruz者より購入する。歯髄細胞培養系に添加後、同トランスフェクタント培養系にgingipain等のプロテアーゼを添加して、炎症性のメディエーターであるIL-6, IL-8等の発現抑制を分析する。同時に、シグナル伝達因子および転写因子に対する同因子の抑制効果も分析する。

- (4) 急性歯髄炎歯髄組織におけるプロテアーゼ等、誘発分子の動態解析 (作田)
- ・ 急性歯髄炎歯髄組織を摘出し、各10試料をホモジナイズし、二次元電気泳動を使って抗プロテアーゼ抗体により誘導されるプロテアーゼを分析する。
 - ・ 同様にDNAチップを用いて、プロテアーゼ誘導分子を分析する。
- (5) 歯髄細胞をgingipain, trypsin等プロテアーゼで刺激し、細胞死をApoptosis, Necrosis抗体にて判定する (フローサイトメトリー分析)。さらにNMおよびGMの細胞死に対する抑制効果を同試験に加え、DNA破壊試験および蛍光免疫試験などを用いて評価する。(徳田)
- (6) 平成17年度の各種予備データを元に、動物実験で用いるセリンプロテアーゼ阻害剤やSiRNAの候補薬を数種評価比較し選定する。(鳥居、徳田)
- (7) (6)にて選定したセリンプロテアーゼ阻害剤もしくはPAR-2 SiRNAオリゴヌクレ

オチドを動物に用いる際の濃度の検討や綿密な実験計画スケジュールを立てる。

(鳥居、作田)

- (8) 動物実験(1) : 7、の計画の下、まず使用するラット数十匹を用いて、薬剤の静注による濃度依存検査および致死量を決定する。
- (9) 動物実験(1) : ラット切片を用いて、露髄した歯牙にプロテアーゼ阻害剤もしくはSiRNAを含ませた仮封セメントにて覆髄処置を行い、歯牙および下顎骨を摘出後、経時的組織変化を免疫染色にて観察する。おもに新生象牙質の形成と歯髄の組織壊死の程度を記録し、定量評価は歯髄の生死で判定する。(鳥居)
- (10) 動物実験(2) : 挙動試験 : 痛みを定量化する方法として、各種刺激下のラットの足の伸張を挙動の変化を観察する。定量は、Caterinaらの知覚過敏分析法、すなわち刺激後の手足の伸縮反応時間を用いて行う。(作田、徳田)

4. 研究成果

われわれは、急性歯髄炎におけるPAR-2の動態を探るために、まず歯髄を取り巻く各種細胞におけるPARの発現を確認した。使用した細胞は、Astrocyte, monocyte, pulp cell, および対照として歯肉線維芽細胞を用いた。得られた結果を以下に記す。

RT-PCRによるPAR-1, 2, 3, および4の発現は、monocyteを除いてPAR-1, 2, および3が発現していた。PAR-1の発現は他に比べて弱く、PAR-4はどの細胞にも発現が見られなかった。PAR-4発現陽性細胞として、上皮系細胞で確認予定である。

これらのことから、PAR-2および3のagonistを用いて、Astrocytomaにおける炎症性のサイトカイン (IL-6およびTNF- α) の発現をみる予定である。さらに、PARを介するシグナル伝達経路については、創傷治癒に関与すると言われるPI3K-Aktやストレス反応性のp38 MAPKやJNKなどを調べる予定である。

PAR-2のSiRNAのトランスフェクションについては、各々の細胞の特徴を見て主に神経

細胞系 (Astrocytoma, Neuroblastoma) での炎症や創傷治癒に関する因子の発現について検討する。

現在、予備実験的な領域を出ていないため、早期に PAR の歯髄炎に関するシグナル因子を同定し、SiRNA 作製の候補因子を絞り込むことが今後の目標である。

(1) 歯髄細胞における **gingipain** に対する創傷治癒に関するシグナル因子 PI3K-Akt の活性に変化はなかった。ストレス反応性細胞死に関するシグナル伝達因子 p38 MAPK および JNK の活性は優位に増強された。また、NF- κ B および AP-1 の転写因子は **gingipain** 刺激に対して両社とも活性の上昇を認めた。

(2) PAR-2 に対する SiRNA を形質導入した歯髄細胞を **gingipain** にて刺激したところ、IL-6 および IL-8 の産生は抑制された。

(3) 急性歯髄炎と診断された歯髄組織からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットにて分析したところ、PAR-2 抗体に反応するバンドが多数検出された。

(4) 歯髄細胞を **gingipain** にて刺激したところ、濃度依存的に細胞死を誘導していることがわかった。

以上から、急性歯髄炎における PAR-2 の役割は細菌が産生する病原因子であるプロテアーゼを介して、炎症反応および細胞死に関与することが示唆された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 光男 (TORII MITSUO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30116066

(2) 研究分担者

徳田 雅行 (TOKUDA MASAYUKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：20253891

作田 哲也 (SAKUTA TETSUYA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：20284888