

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592212
 研究課題名（和文） 培養ヒト歯髄細胞におけるプロテアーゼ受容体の活性化調節について
 研究課題名（英文） The activation and regulation of protease-activated receptor in human dental pulp cells
 研究代表者
 橋爪 英城（HASHIZUME HIDEKI）
 日本大学・松戸歯学部・講師
 研究者番号：10256894

研究成果の概要：ヒト歯髄細胞（HDP）におけるプロテアーゼレセプター（PARs）の生理的・病態生理学的役割について研究し、以下の事項を明らかにした。1．HDP における PARs の Characterization 2．HDP における PARs の活性化調節機能 3・4．PARs 活性化ペプチド・アンタゴニストが HDP の Ca²⁺動態に及ぼす影響 5．プラスミンが HDP の Ca²⁺に及ぼす影響 6．PAR-1 活性化と歯髄炎の関係

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：プロテアーゼレセプター、細胞内カルシウム、アンタゴニスト、アゴニスト

1．研究開始当初の背景

申請者はこれまでに歯髄の保存治療のための指標を確立することを目的とし、培養ヒト歯髄細胞（Human Dental Pulp Cells：HDP）を用いて、炎症性サイトカインによるプラスミノゲンアクチベータ（PA）の活性化調節について研究を進めてきた。PAによってプラスミノゲンから産生されるプラスミンは炎症部位における細胞外マトリクスの破壊（タンパク溶解）に重要な役割を果たすセリンプロテアーゼの一種である。この研究はプロテアーゼの合成にかかわる細胞内シグナルを明らかにすることで、炎症性因子選択的な治

療方法の開発を目指したものである。その結果、uPA合成におけるチロシンリン酸化阻害剤は歯髄炎治療における医薬品の開発に発展する可能性が考えられた。

そこでこれまでの研究に続いて、様々なプロテアーゼによって活性化を受ける細胞膜表面に存在するプロテアーゼ受容体の役割について研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究課題において申請者は以下の事項を探究することとした。

(1) PARsのCharacterization.

PARの同定
Western-blotting
RT-PCR

(2) HDPにおけるPARsの活性化調節機能を明らかにする。

細胞内Ca²⁺の動態を指標にしたPARの機能

- PARアゴニストの効果
- PARインヒビターの効果

PARの変動

早い反応性を示す起炎物質と合成を介した遅い反応性を示す炎症性サイトカインの効果

- リアルタイム PCR
- Western-blotting
- Ca²⁺動態で測定する。

PARの効果

- PARによる炎症性サイトカインの合成
- プロスタグランジンの合成

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄線維芽細胞 (HDP) の培養と保存

矯正学的目的(病的原因以外)によって抜去された歯から歯髄を抽出した後、Somermanらの方法によって培養シャーレに静置し、アウトグロースした細胞を歯髄線維芽細胞として実験に用いる。培養は10%ウシ胎児血清を含む MEM 培地を用い、最低でも5代以上継代した細胞を用いる。培養は本学併設の細胞実験専用施設(共同研究室)を利用して行った。

(2) HDPにおけるPARsのCharacterization

RT-PCR

HDP の mRNA は RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した後、One Step RT-PCR kit. (QIAGEN) によって cDNA を調整する。プライマーの設計は Tnaka ら (Life science, 73, 301-310, 2003) が用いたプライマーと同じ設計のものを使用する。増幅のサイクルは以下の通り。Pre-denaturation は 30min 50 と 15min 95、Denature: 94 30 秒、Annealing: 55 30 秒、Extension: 72 30 秒

-----22cycles、Final extension 72 10 分。

Western Blotting 法

申請者は上記の Real time PCR と平行して、Western blotting 法を利用したタンパクの発現解析も行っており、本実験ではその際に用いた Western blotting 法の技術を応用する。プロットングの解析は本学の Fluor Imager595 を使用する。

(3) HDP における PAR の活性化調節について

細胞内カルシウム測定

- コンフルエントになった HDP を Fura-2 にてラベルした後、細胞内の蛍光測定を、日本分光 CAF-110 型スペクトロフルオロメーターにて測定する。細胞内カルシウムの測定 Grynkiewicz らの方法 (J. Biol. Chem, 260, 3440-3450, 1985) により行う。

PAR アゴニストによって誘導される炎症性サイトカインとプロスタグランジンの発現

- 各種アゴニストを HDP に作用させた際に合成される IL-1 と PGE2 の mRNA を RT-PCR 法によって測定した。
- 合成、分泌された IL-1 と PGE2 を、ELISA 法によって測定する。

4. 研究成果

(1) HDP における PARs の Characterization

RT-PCR 法によって HDP における各種 PARs (PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4) の mRNA の発現を確認した。その結果、PAR-1, 2, 4 の発現が認められたが、PAR-3 は発現していなかった。また PAR-1 の発現が最も顕著で、PAR-2, 4 はわずかであった (Fig. 1 A)。

(2) HDP における PARs の活性化調節機能

次に HDP における PARs の活性化調節機能を明らかにするために各種 PARs アゴニストによる Ca²⁺の動態を確認した。その結果 PAR-1 アゴニストの SFLLRN (100・M) 刺激で明らかに細胞内 Ca²⁺が上昇したが、PAR-2, 3, 4 アゴニストの SLIGKV (100・M)、TFRGAP (100・M)、GYPGQV (100・M) は影響を示さなかった (Fig.1 B)。また SFLLRN は濃度依存的に細胞内 Ca²⁺を上昇した (Fig. 1 C)。以上の事から HDP には PAR-1 を介した細胞調節能が存在する事が明らかになった。

(3) プラスミンがHDPの細胞内Ca²⁺に及ぼす影響

プラスミンによる刺激時間と刺激濃度に依存して細胞内Ca²⁺は上昇した (Fig. 2 A, B)。

(4) 細胞外Ca²⁺がプラスミンとPAR-1アゴニストによる細胞内Ca²⁺上昇に及ぼす影響

細胞内Ca²⁺測定に使用する Krebs-Ringer-Hepes溶液中からCaCl₂を取り除くと各種刺激による細胞内Ca²⁺の上昇は抑制された (Fig. 3 A B)。以上の事からHDPにおけるCa²⁺調節は細胞外のCa²⁺に依存していることが明らかになった。

(5) PAR-1 アントゴニストがCa²⁺の動態に及ぼす影響

PAR-1 アントゴニストである SCH79797 (2, 20 · M)をあらかじめHDPに作用させたところ、SFLLRNと · -Thrombin による細胞内Ca²⁺の上昇は抑制された (Fig. 4)。

(6) プラスミン、PAR-1アゴニストによる IL-8 mRNAの発現誘導とPGE2リリース

次にプラスミンと歯髄炎の関連を検討した。その結果プラスミン、PAR-1アゴニスト SFLLRN、Thrombin刺激によって炎症性サイトカインであるIL-8 mRNAの発現がRT-PCRによって認められた。また、炎症性プロスタノイドであるPGE2のリリースもELISA法によって確認された (Fig. 5 A B C)。

以上の結果からヒト歯髄線維芽細胞においてプラスミンは PAR-1 を活性化し炎症を引き起こすことが示唆された (Fig. 6)。

Fig. 1 Presence of PARs in Human Dental Pulp Cells

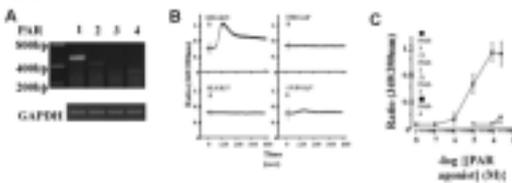


Fig. 2 Plasmin-induced Ca²⁺ mobilization in Human Dental Pulp Cells

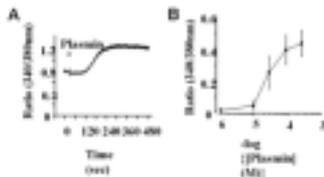


Fig. 3 [Ca²⁺] mobilization in the presence and absence of external Ca²⁺

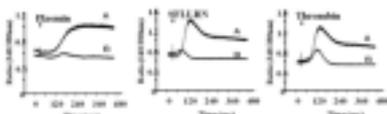


Fig. 4 Effect of PAR-1 antagonist on [Ca²⁺] mobilization

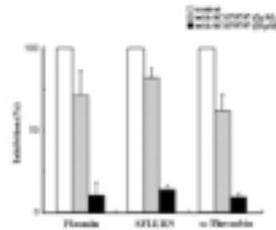
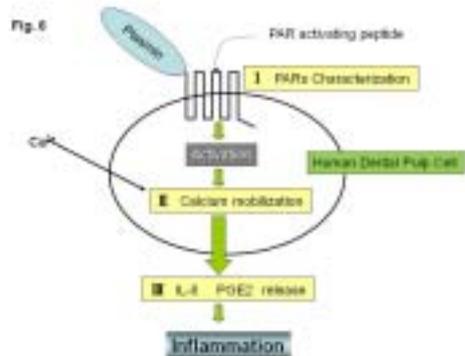
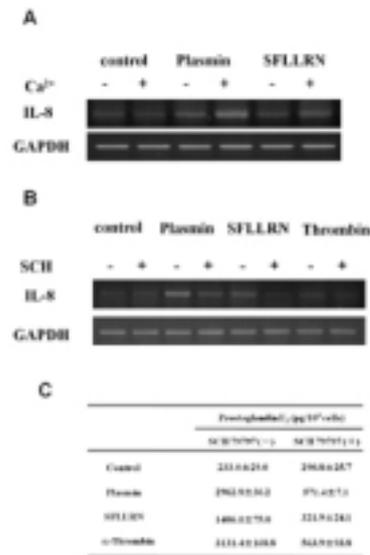


Fig. 5 Plasmin induced IL-8 mRNA expression and PGE2 release: coupled to PAR-1 activation



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)

N.Kamio, H.Hashizume, S.Nakao, K.Matsushima, H.Sugiya, Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp. *Biochem. Pharmacol*, 15;75(10), 1974-1980, 2008 査読あり

Hideki Hahsizume, Naoto Kamio, Sumi Nakao, Kiyoshi Matsushima and Hiroshi Sugiya, Protein kinase C synergistically stimulates tumor necrosis factor- α -induced secretion of urokinase-type plasminogen activator in human dental pulp cells. *Journal of Physiological science*, 58(1), 83-86, 2008 査読あり

Naoto Kamio, Hideki Hahsizume, Sumi Nakao, Kiyoshi Matsushima and Hiroshi Sugiya, IL-1b stimulates urokinase-type plasminogen activator expression and secretion in human dental pulp cells. *Journal of Physiological science*, 28(6), 315-322, 2007 査読あり

[学会発表](計 2 件)

室町幸一郎、神尾直人、橋爪英城、山浦賀弘、中尾寿美、松島潔、培養ヒト歯根膜細胞におけるプロテアーゼ受容体 PARs (protease-activated receptors) の発現について 2008 年 秋季 歯科保存学会 (第 129 回富山) 2008 年 11 月 6 日

神尾直人、橋爪英城、武内ひとみ、三浦孝司、村上芳弘、松島潔 ヒト歯髓培養細胞における Protease Activity Reseptor-1 を介した細胞内カルシウム動態と PGE2 産生 春季 日本歯科保存学会(第 126 回 埼玉) 2007 年 6 月 8 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋爪 英城 (HASIZUME HIDEKI)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号：1025689