

平成21年 3月 31日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791400

研究課題名 (和文) 歯髄組織のロバストネス強化による歯髄炎予防に関する研究

研究課題名 (英文) A research regarding the preventing pulpitis by biological robustness intensification of pulpal tissue.

研究代表者 浅野 将宏 (ASANO MASAHIRO)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30335822

## 研究成果の概要：

徳島大学医学部・歯学部附属病院を受診し、説明の上、同意の得られた患者から、健康抜去歯（う蝕や歯周病に罹患していない小白歯、智歯）の提供を受けた。

それらの抜去歯から歯髄組織を摘出後、無菌的に培養し、歯髄細胞を得た。

得られた歯髄細胞から、total RNA を抽出し、RT-PCR 法により複数の抗菌ペプチド遺伝子の発現を確認した。

さらに、ある種の抗菌ペプチド遺伝子の発現は、細菌の菌体成分の一つである LPS で誘導されることを確認した。

なお、この研究計画は、ヒトの歯髄組織の提供を受けることから、事前に徳島大学医学部・歯学部附属病院倫理委員会に申請の上、認証を得たものである。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0       | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

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：歯内療法学、歯髄炎、抗菌ペプチド



## 1. 研究開始当初の背景

歯髓組織はその周囲を象牙質の硬組織で囲まれた特異な環境にあり、傍側循環路に乏しいため、歯髓炎の起炎細菌による感染と炎症に対して抵抗力が低い。

現在、う蝕が進行した後の歯髓炎の予防に関しては、歯髓への外界からの刺激に対して、人工的な医療用製剤による物理的な防御を施す治療が中心であり、感染により臨床的な発症に至った歯髓炎は、不可逆的な経過をたどることが多い。

最近、北野らによって提唱された、生体が様々な外的・内的刺激からそれぞれの器官や組織の機能を維持し続けようとする能力（＝生物学的頑強性、バイオロジカルロバストネス）を、歯髓組織に対して応用できれば、医療用製剤に頼らない、生体により安全な、新たな治療法の開発につながるのではと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

う蝕に罹患し、歯髓炎起炎細菌による感染を受けた後の、歯髓組織におけるロバストネスの主体は、抗菌ペプチドであると考えられる。

抗菌ペプチドは元来生体内に存在するタンパク質であるため、生体に対して比較的安全と考えられ、歯髓炎の発症時のみに効果的にその発現をコントロールすることができれば、感染により壊疽を起こした歯髓組織の摘出という不可逆的経過を回避することが可能と考えられる。

そのため、以下のような段階的研究目的を考えた。

- 1) 歯髓組織において、通常発現している抗菌ペプチドを確認する
- 2) それらの抗菌ペプチドが、各種起炎因子 (LPS, TNF $\alpha$  等) の刺激により、どのような発現変化をするか確認する。
- 3) 発現変化の見られた抗菌ペプチドの遺伝子発現を調節する因子について、その機序を調べる。

最終的には、歯髓炎の発症抑制のため、歯髓組織の抗菌ペプチドレベルを上昇させるための調節機序を調べ、実験動物において検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯髓組織において通常発現する抗菌ペプチドを調べるために、ヒト歯髓組織から通法により total RNA を分離し、ヒトにおいてその発現が報告されている、カルプロテクチン、ディフェンシン、カテリシジン、分泌性ロイコサイトプロテアーゼインヒビター、シスタチン、ムチン、ヘプシジン、リゾチームなどの抗菌ペプチドの遺伝子発現を、経時的に RT-PCR 法を用いて調べる。

(2) 歯髓細胞における抗菌ペプチド発現の調節因子を検索するために、ヒト歯髓組織より歯髓細胞を分離・培養し、その培養系に、他の細胞を用いた研究において、いくつかの抗菌ペプチドの発現増加が報告されている細胞分化調節因子、成長因子やサイトカインなどを作用させ、各種抗菌ペプチド遺伝子の発現に及ぼす影響を RT-PCR 法で調べる。また、カルプロテクチンの発現については、カルプロテクチン (S100A8/S100A9) のルシフェラーゼアッセイ用 Deletion constructs を用いてルシフェラーゼをレポーター遺伝子としたレポーターアッセイにより転写活性を測定する。それにより、シス作用性転写因子の部位を明らかにすると共に、カルプロテクチン発現に関与するトランス作用性因子を明らかにする。これらにより、抗菌ペプチド発現を上昇させる因子および、それらの作用機序のさらなる解明を目指す。

(3) 上記に調べた因子により、その遺伝子の発現変化があった抗菌ペプチドのタンパク質発現の変化を、各タンパク質の特異抗体を用いた免疫ブロット法にて調べる。これは、レポーターアッセイにより得られた結果のタンパク質レベルにおける裏付けとなる。

(4) 上記実験により歯髓細胞において、遺伝子レベルにおいても、タンパク質レベルにおいても発現上昇が認められる抗菌ペプチドによる、う蝕関連細菌および歯髓炎起炎細菌に対する抗菌作用の検討を行う。

## 4. 研究成果

- (1) 歯髓細胞を 6 穴プレートに播種し、サブコンフルエントに達した日を 0day とした。その後、1day, 7days に total RNA を回収し、各種抗菌ペプチド遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べた。



・リポカリン2 (LCN2) 226bp

リポカリン2は、細胞外に分泌されるタンパク質であり、細菌の増殖に必須な鉄を運ぶタンパク質と高い親和性で結合するため、ほ乳類を細菌感染から防御する役割を担っている。

また、ホメオスタシスの調節、免疫調節、アポトーシスの促進、プロスタグランジン産生誘導作用を持つことが知られている。炎症反応時に出されるリポポリサッカライド (LPS) やインターロイキン1 (IL-1) の刺激によって、マクロファージはリポカリン2を大量に産出することが知られている。

(結果)

歯髄細胞において、遺伝子発現は確認できなかった (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・S100A8 232bp

S100A8、S100A9の2つのタンパク質からなるカルプロテクチンは、主に好中球や単核球から分泌されるカルシウム結合性タンパク質である。

好中球に由来するカルプロテクチンは、細菌の栄養となるMnイオンやZnイオンをキレート化することで細菌の増殖を阻害する。このことから、カルプロテクチンは感染に対する自然免疫反応の際に、重要な因子であるとされている。

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できた (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・S100A9 213bp

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できた (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・アドレノメデュリン (ADM) 506bp

アドレノメデュリンは当初、血管拡張作用を有する血管作動性物質として同定されたが、現在は細胞の遊走、分化制御、内皮細胞再生、抗炎症作用、体液量調節作用、強心作用など多彩な生理活性を持つことが明らかにされている。

ラット内皮細胞では、TNF、IL-1、LPSがアドレノメデュリン産生を最も強力に促進することが報告されている。

(結果)

歯髄細胞において、

その遺伝子発現を確認できた (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・シスタチン3 (CST3) 150bp

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できた (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・βディフェンシン (BD2) 255bp

ディフェンシンは、好中球から発見された抗菌性タンパク質(αディフェンシン)と、皮膚の上皮性細胞で発現するβディフェンシンとが報告されている。

ヒトにおいては、ナチュラルキラー細胞、好中球、マクロファージ、T細胞、B細胞などの免疫細胞で強く発現しており、好中球では最も豊富に存在するペプチドの一つとされている。また、口腔粘膜などの粘膜上皮細胞においては、ウイルスの侵入にとって、ディフェンシンの発現が誘導されることが明らかになっている。

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できた (左レーン: 100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・RNase7 199bp

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できなかった (左レーン: 200bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す)。

・ムチン (mucin5) 243bp

ムチンは、分子量100万~1000万の、糖を多量に含む糖タンパク質(粘液糖タンパク質)の混合物であり、細胞の保護や潤滑物質としての役割を担っている。

ムチンには、上皮細胞などが産生する分泌型ムチンと、疎水性の膜貫通部位を持ち細胞膜に結合した状態で存在する膜結合型ムチンがあり、ムチン5は、前者である。

(結果)

歯髄細胞において、その遺伝子発現を確認できなかった (左レーンは、200bp マーカー)。

・GAPDH 451bp





ポジティブコントロールとして、有効であった（左レーン：100bp マーカー、その次のレーンから、0day、1day、7days を示す）。

- (2) 同歯髓細胞培養系に対して、LPS (1  $\mu$ g/ml)、LPS (20  $\mu$ g/ml) を添加して1day、7days にそれぞれ total RNA を回収、RT-PCR を行った。

・リポカリン2 (LCN2) 226bp

( 結果 )

LPS (20  $\mu$ g/ml) 添加群において、0day と比較して、1day、7days では、遺伝子発現が上昇している。なお、対照群では遺伝子発現の上昇を確認できなかった。

以上の結果から、歯髓細胞培養系において、複数の抗菌ペプチド遺伝子の発現を、RT-PCR 法で確認した。

しかしながら、歯髓細胞培養系に添加した IL-1 $\beta$  や FGF-2、TNF $\alpha$ 、LPS のいずれにおいても、それら遺伝子発現の上昇や抑制といった変化を確認することができなかった。

## 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 将宏 (ASANO MASAHIRO)

徳島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30335822