

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791605
 研究課題名（和文） 乳歯歯髄由来線維芽細胞の炎症応答におけるアデノシンの機能的役割
 研究課題名（英文） The role of adenosine on dental pulp fibroblasts isolated from deciduous teeth
 研究代表者
 渡邊 京子 (KYOKO WATANABE)
 大阪歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：80434794

研究成果の概要：

齲蝕はミュータンス連鎖球菌により齲窩が形成され、また齲窩にグラム陰性菌が増殖することにより歯髄炎、歯髄壊死などの症状へと進展する。これらはブラク細菌由来リポポリサッカライド (LPS)、マトリックスプロテアーゼ (MMPs) などが原因であり、このような炎症時には歯髄において好中球などの免疫担当細胞の浸潤、炎症性サイトカインの産生がみられることが知られている。そこで本研究では、乳歯歯髄由来線維芽細胞において、LPS および炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) 刺激による、線維芽細胞のアデノシン受容体発現、MMP 産生能について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：小児歯科学

1. 研究開始当初の背景

齲蝕及び歯周病に代表される歯科疾患は、その発病や進行により歯の喪失へと繋がるため、食生活や社会生活等に支障をきたし、ひいては、全身の健康に影響を与えるものとされている。現在、歯の喪失が 10 歯以下であれば食生活に大きな支障を生じないとの研究¹⁾に基づき、生涯にわたり自分の歯を 20

歯以上保とうという 8020 運動が提唱・推進されている。歯の喪失原因の約 9 割が齲蝕と歯周病で占められていることから、各ライフステージに応じた適切な齲蝕・歯周病予防を推進することが重要である。特に乳歯の齲蝕と永久歯の齲蝕には強い関連が認められ、乳幼児期は基本的歯科保健習慣を身につける時期として非常に重要であり、生涯を通じた

歯の健康づくりに対する波及効果も高いと言える。近年、乳歯齲蝕は減少傾向にあると報告されているが、この減少傾向は乳前歯部の齲蝕罹患率が著しく低下したことに起因し、乳臼歯の齲蝕罹患状態は必ずしも楽観を許す状態ではないとの報告もある。乳歯が齲蝕や歯髄炎に罹患した場合には、出来る限り早期に発見し修復、保存していくことで、良好な乳歯列咬合状態を確保することができ、その結果、健全な後続永久歯の萌出が誘導される。齲蝕はミュータンス連鎖球菌により齲窩が形成され、また齲窩にグラム陰性菌が増殖することによって、歯髄炎、歯髄壊死などの症状へと進展する。これらは、ブラク細菌由来リポポリサッカライド (LPS)、マトリックスプロテアーゼなどが原因であり、このような炎症時には歯髄において好中球などの免疫担当細胞の浸潤、炎症性サイトカインの産生がみられることが知られている。近年口腔内領域において、線維芽細胞より産生され抗炎症作用を持つ、ATP由来のエネルギー代謝産物アデノシンが注目されている。またアデノシン受容体にはA1、A2a、A2b、A3の4つのサブタイプの存在が報告されているが、その中でもA2a受容体は炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6 など) 刺激により、その発現が上昇すること、また炎症反応や創傷治癒過程に積極的に関与していることが報告されている。さらにアデノシン受容体は、マクロファージおよび線維芽細胞などに発現していることが明らかにされている。

現在までのところ、国内外の関連研究の中では、アデノシンの口腔内組織における炎症、特に歯髄炎への関与に関する研究報告はほとんどされていない。本研究では、結合組織の修復、再生、リモデリングに深く関与している線維芽細胞、特にその能力の高い乳歯歯髄由来線維芽細胞において、LPS 誘発性炎症反応の抑制機序を解明したい。

2. 研究の目的

線維芽細胞の各種機能に対する LPS あるいはアデノシンの単独の影響を解析することを第一の目的とする。次に、LPS に加えて、アデノシンを併用した場合の線維芽細胞の各種機能に対する影響について検討を進める。さらに、併用させることによって変動した各種機能については、そのメカニズムを解明することも本研究の大きな目的の一つである。

3. 研究の方法

(1) 乳歯歯髄由来線維芽細胞は、歯根が 2/3 以上残存する健全乳歯で、抜去したものを分割し歯髄組織を剥離し、約 2×2 mm の組織片

に切り出し、一定時間初期付着を行ったのち増殖してくる細胞を初代培養乳歯歯髄由来線維芽細胞として継代を行う。本研究には 5～8 継代した細胞を用いる。

(2) LPS およびアデノシン刺激による乳歯歯髄由来線維芽細胞の増殖率を MTT assay により吸光度を測定し評価する。

(3) サイトカイン産生能は、LPS およびアデノシン処置 24 時間後に乳歯歯髄由来線維芽細胞の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-12、および IL-10 などの産生能を ELISA キットにより測定する。

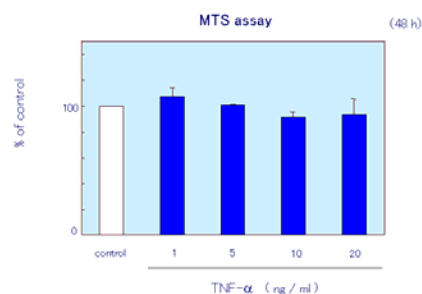
(4) メタルプロテアーゼ産生能は乳歯歯髄由来線維芽細胞を LPS およびアデノシンにて 24 時間処置後、上清中の MMP-2、MMP-9 をザイモグラフにより算出する。上清中の MMP-1、MMP-3、MMP-8、MMP-13 はウエスタンブロッティングにより検討する。

(5) TLR4 受容体変動は、LPS およびアデノシン刺激による乳歯歯髄由来線維芽細胞の TLR4 の発現を FACS caliber およびウエスタンブロッティングにて解析する。

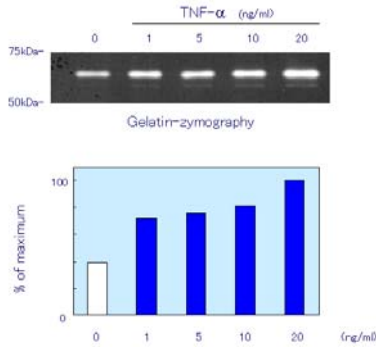
(6) アデノシン受容体変動は LPS およびアデノシン刺激による乳歯歯髄由来線維芽細胞のアデノシン受容体 A1、A2a、A2b、A3 の発現を FACS caliber およびウエスタンブロッティングにて解析する。

4. 研究成果

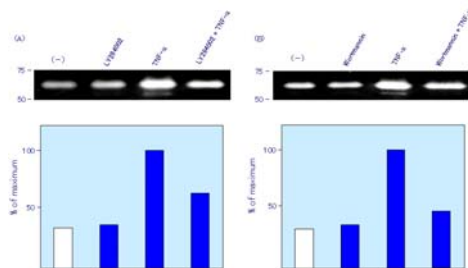
LPS、TNF- α および IL-1 β は、いずれもアデノシン受容体発現に影響を与えなかった。一方、MMP 産生については、LPS、TNF- α および IL-1 β いずれについても、MMP-2 産生を有意に増強した。今回はさらに TNF- α による MMP-2 産生について焦点を絞り、PI3-K 阻害剤を用いてその経路についても検討を行った。その結果 TNF- α による AKT のリン酸化が PI3-K 阻害剤 LY294002 および Wortmannin により抑制された。以上の結果から乳歯歯髄由来線維芽細胞において TNF- α 刺激により PI3-K を介して MMP-2 が産生されることが明らかとなった。



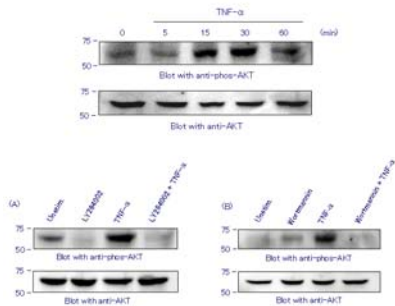
TNF- α 刺激による細胞増殖能への影響



TNF-α刺激によるMMP-2産生の変動



PI3-K阻害剤がTNF-αによるMMP-2産生増強に及ぼす影響



TNF-α刺激によるAKTのリン酸化とPI3-K阻害剤の影響

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2件)

- ① Noriyo Watanabe, Kyoko Watanabe, Shinya Shirasu, Kiyoshi Daito and Michiharu Daito TNF-α enhances MMP-2 production in deciduous dental pulp fibroblasts PEDIATRIC DENTAL JOURNAL Vol. 19 No. 1; , 2009 査読有

- ② Ryu Harada, Kyoko Watanabe, Shinya Shirasu, Mikio Kato and Michiharu Daito DNA microarray analysis of dental pulp fibroblasts exfoliated from deciduous teeth PEDIATRIC DENTAL JOURNAL Vol. 19 No. 1; , 2009 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 渡邊京子、白数慎也、大東希好、嘉藤幹夫、大東道治 TNF-α刺激乳歯歯髓由来線維芽細胞におけるMMP産生について 第46回日本小児歯科学会大会 平成20年6月13日、埼玉県

- ② 渡邊京子、白数慎也、大東希好、大浦清、大東道治 乳歯歯髓由来線維芽細胞のMMP-2産生におけるPI3-Kの関与について 第28回歯科薬物療法学会 平成20年6月28日、東京都

- ③ Kyoko WATANABE, Shinya SHIRASU and Michiharu DAITO TNF-α enhanced MMP-2 expression in dental pulp fibroblast isolated from deciduous tooth FDI Annual World Dental Congress 2008 24-27 September 2008 Stockholm, Sweden

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 京子 (KYOKO WATANABE)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80434794

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

