

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791386

研究課題名 (和文) 歯髄炎の病態形成における自然免疫機構の解明

研究課題名 (英文) The analysis of innate immunity system in the pathogenesis of pulpitis.

研究代表者

高橋 加奈子 ( TAKAHASHI KANAKO )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80403715

研究成果の概要 (和文)：歯髄炎はう蝕に継発する感染症であり、最終的には歯髄壊死に至る疾患である。この原因は細菌であり、本研究ではう蝕関連細菌やその構成成分が歯髄に与える影響を解析した。特に生体内で産生される Alarmin と呼ばれる炎症を惹起する物質に焦点を当て、う蝕細菌が歯髄に作用する際の Alarmin の産生・放出機構について検討した。その結果、歯髄炎における Alarmin の産生・放出が確認され、歯髄炎の病態形成や進行において Alarmin が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Pulpitis is an infectious disease followed dental caries, and it finally leads to dental pulp necrosis. The aim of this study was to analyze the effect of caries-related bacterium or bacterial component on dental pulp. Especially, it was focused on alarmin, molecule led to inflammation, and investigated the production and release of alarmin from dental pulp stimulated with caries-related bacterium. Consequently, the production and release of alarmin were observed in pulpitis, and these results indicated that alarmin may be involved in the progression of pulpitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯髄炎、自然免疫、細菌性因子、抗菌因子

## 1. 研究開始当初の背景

現在の臨床において、歯髄を保存できる可逆性歯髄炎か（覆髄適応）除去せざるをえない不可逆性歯髄炎か（抜髄適応）についての診断基準は確立されておらず、歯髄保存の可否に関して正確な診断を行うことができれば、覆髄処置自体が予知性の高い処置になりうると考えられ従来の覆髄処置の枠を超えた積極的な歯髄保存へと繋がる可能性があ

り、その貢献度は高いと考えられる。これらのためには、歯髄炎におけるう蝕細菌の侵襲に対する歯髄免疫応答のメカニズムを理解することは必要不可欠であり、解明すべき重要課題といえる。

一般に感染に対して、宿主は様々な生態防御反応を起こし、感染防御を行う。我々ヒトを含む哺乳類では、病原因子を特異的に認識し病原体を排除する獲得免疫がよく発達し



ている。しかし、感染初期においては、広範な病原因子を認識する自然免疫が働き、獲得免疫が賦活されるまでの宿主抵抗性に重要な役割を果たしている。このような自然免疫に関与するレセプター（Pattern Recognition Receptor；PRR）としては、Toll like receptor (TLR)-2、TLR-4がTakedaら（Annu Rev Immunol, 2003）により、Nucleotide-binding oligomerization domain protein (NOD)-1、NOD-2などがInoharaら（Nat Rev Immunol, 2003）により報告されている。これらの分子は様々な病原微生物の特有の構造（pathogen associated molecular pattern；PAMP）（ペプチドグリカン、リポタイコ酸、リポ多糖、iE-DAP、MDPなど）を特異的に認識し、自然免疫にかかわる細胞を活性化させることにより病原性細菌に対する抗菌作用を示し、様々な炎症性メディエーター（サイトカインやケモカイン）を産生するようになる。

歯髄炎はう蝕に継発した感染症であり、その発症に自然免疫の関与が示唆される。近年、培養象牙芽細胞においてTLRが発現しておりLTAを認識することによりケモカインの発現が増強されることが報告されている（Durandら, J Immunol 2006）。しかしながら、その他のPAMPsの認識やNODの発現についての報告は皆無であり、いまだ歯髄炎における自然免疫機構の役割は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

自然免疫に関与するレセプターとその特異的なリガンドとの相互作用に焦点をあて、歯髄炎における自然免疫機構の役割を解明すること

## 3. 研究の方法

- 1) 培養歯髄細胞におけるTLR-2, TLR-4, NOD-1, NOD-2の発現を検討する。また、代表的なう蝕細菌である*Streptococcus mutans*の細菌刺激を行い、そのときの各レセプターの発現の変化を検討する。
- 2) 培養歯髄細胞を各PRR特異的リガンド（PAM3CSK4, *E. coli* LPS, MDP）で刺激し、炎症性細胞浸潤の調節に関与する因子（IL-6, IL-8, MCP-1など）の発現に対する影響を検討する。
- 3) 抗菌物質（カテキンなど）の自然免疫機構におよぼす影響についても検討する。

## 4. 研究成果

第一段階として培養歯髄細胞における自然免疫に関与するレセプター

（PRR;TLR-2, TLR-4, NOD-1, NOD-2）の発現をRT-PCR法を用いて解析したところ無刺激条件下において、培養歯髄細胞に

全てのPRRのmRNA発現が認められた。またFACSにより各レセプターの蛋白発現を解析したところ、TLR-2, NOD-1, NOD-2の顕著な発現が認められたが、TLR-4の発現レベルは弱かった。また、*Streptococcus mutans*で刺激した場合のPRR発現状態も同様に解析したところ、刺激24時間後において、TLR-2とNOD-2でmRNA発現の増加が確認されたが、TLR-4, NOD-1のmRNA発現には変化は認められなかった。また、FACSにおいてもTLR-2, NOD-2の蛋白発現の増加が認められた。次にPRRを介する歯髄の反応を解析するために、培養歯髄細胞を*S. mutans*ならびに各PRR特異的なligandにて一定時間刺激し、培養上清中のIL-8濃度をELISA法にて測定した。その結果、歯髄細胞培養上清中のIL-8濃度は、*S. mutans*単独刺激においては刺激48時間後からIL-8濃度の上昇が確認され、NOD-2のligandであるMDP、TLR-2のligandであるPam3CSK4、TLR-4のligandであるLPS刺激ではいずれも刺激8時間後からIL-8濃度が上昇した。さらに、MDPとPam3CSK4の共刺激では、培養上清中のIL-8濃度はそれぞれ単独で刺激した場合と比較して相乗的に上昇した。しかし、MDPとLPSにて共刺激した場合は相乗的な効果は認められなかった。

第二段階として、PAMPs刺激を受けた歯髄細胞におけるケモカイン（IL-6, IL-8, MCP-1）の産生をELISA法を用いて定量したところ、各PAMPs（TLR-2; Pam3CSK4, TLR-4; *E. coli* LPS, NOD-1; iE-DAP, NOD-2; MDP）刺激を受けた歯髄細胞から刺激後8時間および24時間でIL-6, IL-8, MCP-1の有意な産生上昇が認められた。また、う蝕細菌である*Streptococcus mutans*にて歯髄細胞を刺激すると刺激後24時間でも同様の結果が得られた。さらに各PAMPs刺激を受けた歯髄細胞におけるカテキンの影響を解析するため、*S. mutans*のほか口腔細菌である*S. sanguinis*や*S. salivarius*にて歯髄細胞を刺激する際にカテキンを同時に添加しIL-8の産生量をELISA法にて定量した。その結果、epicatechin gallate (ECG)あるいはepigallocatechin-3-gallate (EGCG)を添加することによりカテキンの濃度依存的にIL-8産生は抑制された。また、Pam3CSK4やLPSあるいはMDPにて歯髄細胞を刺激する際にECGあるいはEGCGを添加するとIL-8およびPGE2の産生量はカテキンの濃度依存的に抑制された。さらにこの時のIL-8およびCOX-2のmRNA発現をRT-PCRにて解析すると、カテキンによる各遺伝子発現の抑制が認められた。



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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, Mukai K, Nakanashi T, Matsuo T  
Roles of TLR2, TLR4, NOD2 and NOD1 in pulp fibroblasts  
J Dent Res, 2009, 88 (8) , 762-767  
査読あり
- ② Takahashi K, Nakanishi T, Yumoto H, Adachi T, Matsuo T  
CCL20 production is induced in human dental pulp upon stimulation by *Streptococcus mutans* and proinflammatory cytokines  
Oral Microbiol Immunol, 2008, 23(4), 320-32  
査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① 湯本浩通 他  
口腔病原菌に対する高周波・電磁波照射の殺菌効果  
第 83 回日本細菌学会総会  
2010 年 3 月 27 日～29 日  
パシフィコ横浜
- ② 高橋加奈子 他  
培養歯髄細胞における Alarmin の産生・放出機構の解析  
第 83 回日本細菌学会総会  
2010 年 3 月 27 日～29 日  
パシフィコ横浜
- ③ 武川大輔 他  
TLR リガンド刺激したヒト培養歯髄細胞における IL-6, CXCL10 産生をインターフェロン $\gamma$ は増強させる  
第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2009 年 10 月 30 日  
仙台国際センター
- ④ 高橋加奈子 他  
炎症性サイトカインや PAMP 刺激によるヒト培養歯髄細胞における Alarmin の産生・放出  
第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2009 年 10 月 29 日  
仙台国際センター
- ⑤ 中西 正 他  
ヒト歯髄細胞における炎症関連因子発現に対するカテキンの影響  
第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会  
2009 年 6 月 11 日
- ⑥ 湯本浩通 他  
カテキンの培養歯髄細胞における抗炎症効果に関するシグナル伝達機構の解析  
第 7 回日韓合同歯内療法学会  
2009 年 4 月 25 日  
都市センターホテル (東京)
- ⑦ 湯本浩通 他  
カテキンによる TLR や NOD ligands 刺激培養歯髄細胞における炎症性メディエーター産生抑制機構  
第 82 回日本細菌学会総会  
2009 年 3 月 13 日  
名古屋国際会議場
- ⑧ 平尾功治 他  
培養歯髄細胞におけるカテキンの cell signaling に対する影響  
第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2008 年 11 月 6 日  
富山国際会議場
- ⑨ KOJI HIRAO et al  
Functional analysis of pattern recognition receptors expression in pulpal cells  
86<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR  
2008 年 7 月 3 日  
Metro Toronto Convention Centre
- ⑩ KAYO MUKAI et al  
Effect of catechins on cytokine production in human odontoblast-like cells  
86<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR  
2008 年 7 月 3 日  
Metro Toronto Convention Centre

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 加奈子 (TAKAHASHI KANAKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：80403715

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者