

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592125  
 研究課題名（和文） 軸索反射によって産生される過剰神経ペプチドの特発性歯髄炎への関与  
 研究課題名（英文） Involvement of excess neuropeptide by axon reflex in idiopathic pulpitis  
 研究代表者  
 小山 徹(OYAMA TOHRU)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：60233623

### 研究成果の概要（和文）：

本研究において、ヒト培養歯髄細胞において AEA（アナンダマイド）、CGRP、VIP、SubstanceP は、MMP-2 産生を誘導した。また、ヒト培養歯髄細胞における 3 種の AEA レセプターの発現を確認し、AEA の MMP-2 産生の誘導は CB1、TRPV1 を介したものであることが示された。さらに、ヒト培養歯髄細胞において AEA 刺激による MMP-2 の誘導には主として JNK が関与することが示唆された。

今回の研究結果は、ヒト培養歯髄細胞において AEA が CB1、TRPV1、さらには主として JNK を介して MMP-2 産生を誘導することを初めて明らかにしたものである。

### 研究成果の概要（英文）：

In this study, AEA (Anandamide), CGRP (Calcitonin gene-related peptide), VIP (Vasoactive intestinal peptide) and SubstanceP induced MMP-2 production in HPC (human cells dental pulp cells) in culture. HPC expressed all 3 types of AEA receptor (CB1, CB2, and TRPV-1). AEA-induced MMP-2 production was blocked by CB1 or TRPV-1 antagonists and by small interfering RNA for CB1 or TRPV-1. Furthermore, c-jun N-terminal kinase inhibitor also reduced MMP-2 production. We demonstrated for the first time that AEA induced MMP-2 production via CB1 and TRPV-1 in HPC.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：1) 特発性歯髄炎 2) 軸索反射 3) 神経ペプチド 4) 神経原生炎症  
5) アナンダマイド 6) マトリックスメタロプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は、一般的には細菌感染を引き金として起こる歯髄組織の炎症反応である。歯髄が感染し、細菌および産生物により炎症性サイトカインの過剰産生が起こりサイトカインネットワークのバランスが崩れ炎症は進行し、単純性歯髄炎から化膿性歯髄炎さらには歯髄壊死へと進行していく。一方、カリエスが存在せず歯周ポケットも浅く一見健全そうな歯に歯髄炎が発症することがある。さらに、患歯周辺部に慢性炎症、矯正力、咬合性外傷、習癖等、持続性の反復刺激があると発症頻度は高くなる傾向がある。これらはすべて、他に明確な原因がないかぎり特発性歯髄炎、つまりカリエスや深い歯周ポケットがないのに発症する原因不明の歯髄炎としてとらえられておりこの領域の研究はほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本来はシグナル伝達物質である神経ペプチドの過剰産生による神経原性炎症が報告されている (J Endod 2008;34:773-788)。さらに、この神経原性炎症は軸索反射によっても起きるといわれている (Neuroanatomy 2008;7:17-19) が、神経支配領域すべての末梢でこの炎症が起こる可能性が示唆されている。つまり、歯の周辺の組織に侵害刺激が加わると、侵害受容器から感覚線維、脊髄後角さらには大脳皮質へと求心性にシグナルが伝達される。その際、脊髄後角で逆行性のシグナル伝達 (軸索反射) が起き、末梢のC線維末端からCGRPやSPなどの神経ペプチドが過剰に遊離され神経原性炎症を引き起こす。そして、その範囲は神経支配領域に及ぶため元々の炎症部からはなれた健全歯の歯髄でも起こる可能性がある。

今回の研究は、この軸索反射による神経原性炎症をもとに、臨床的には特発性歯髄炎と

言われている原因不明の歯髄炎の発症メカニズムを解明するものである。

## 3. 研究の方法

1) ヒト歯髄細胞を、D-MEM (10% ウシ胎児血清含有) でコンフルエントになるまで培養後、1% ウシ胎児血清含有 D-MEM で24時間前培養したものを以下の実験に使用した。なお、ヒト歯髄細胞は継代数5~10代を使用した。

2) AEA (Anandamide), CGRP (Calcitonin gene-related peptide), substanceP, VIP (Vasoactive intestinal peptide) 刺激による上清中のMMP-2発現をウェスタンブロット法、ELISA法にて確認した。

以下、AEAの作用を調べるため次の実験を行った。

3) AEAのヒト歯髄細胞に対する細胞毒性を、MTT assayで検討した。

4) ヒト培養歯髄細胞をAEA刺激、無刺激において24時間もしくは72時間培養し、CB1、CB2、TRPV1の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

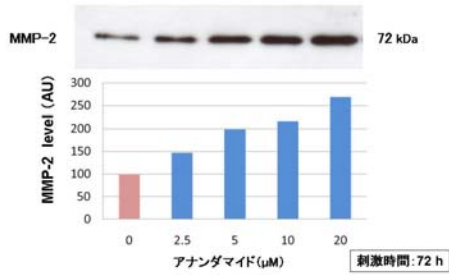
5) ヒト培養歯髄細胞をCB1、CB2、TRPV1のアンタゴニスト(それぞれAM251、SR144528、capsazepine)を用いて前処理した後AEA(10  $\mu$ M)で刺激し、MMP-2産生の阻害の有無をウェスタンブロット法にて検討した。さらにAEA刺激時のMMP-2産生への関与が示唆されたCB1、TRPV1についてはsiRNAにてknockdownし、その影響を確認した。

6) ヒト培養歯髄細胞をAEA(10  $\mu$ M)で刺激した時のMAPK(ERK1/2、JNK、p38MAPK)の活性化をウェスタンブロット法にて確認した。さらにAEA刺激によるMMP-2発現に対するMAPK阻害剤(U0126、SP600125、SB203580:10  $\mu$ M)の影響をウェスタンブロット法にて確認した。

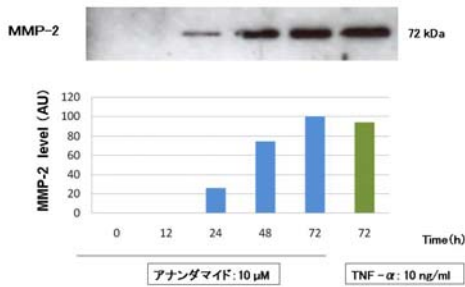
## 4. 研究成果

1) ヒト培養歯髄細胞においてAEA、CGRP、SubstanceP、VIPはMMP-2産生を誘導した。なかでもAEAは時間、濃度依存的に産生した。

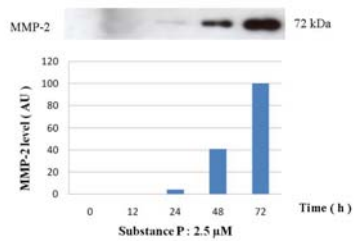
アナンダマイド刺激による MMP-2 産生 ・ Dose response  
(Western blot analysis)



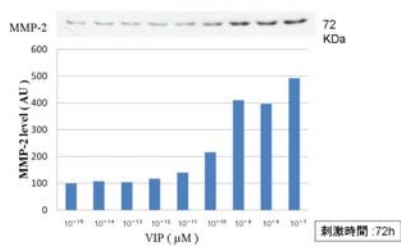
アナンダマイド刺激による MMP-2 産生 ・ Time course  
(Western blot analysis)



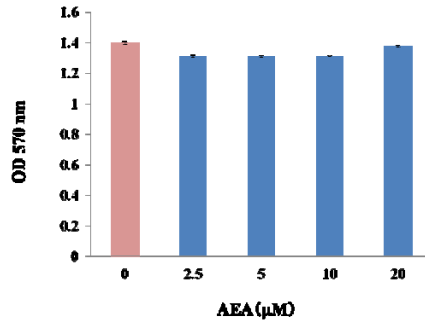
Substance P ・ Time course



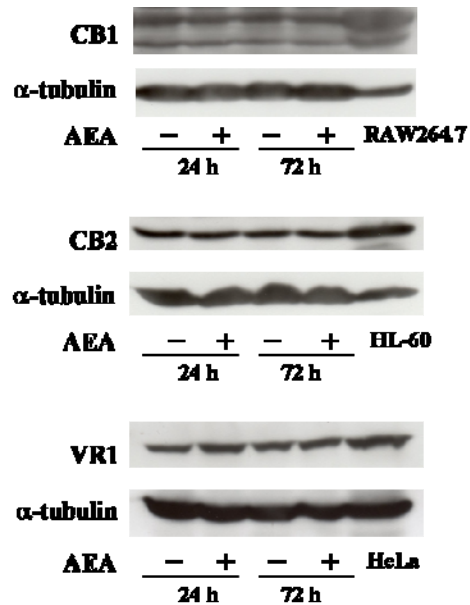
VIP ・ Dose response



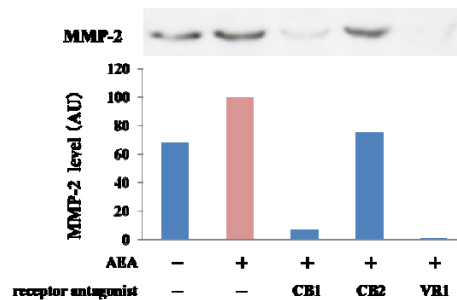
2) 0~20 μM の AEA は、ヒト培養歯髄細胞に  
対し細胞毒性を示さなかった(72 時間刺激)。

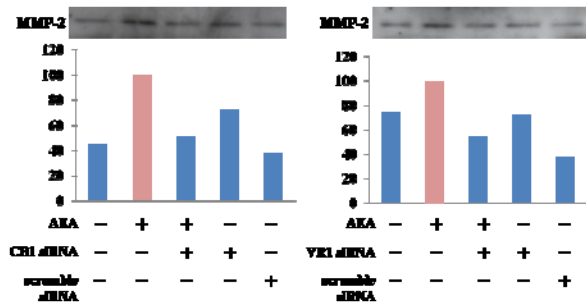


3) ヒト培養歯髄細胞は AEA レセプター CB1、  
CB2、TRPV1 を発現した (ウェスタンブロット  
法)。

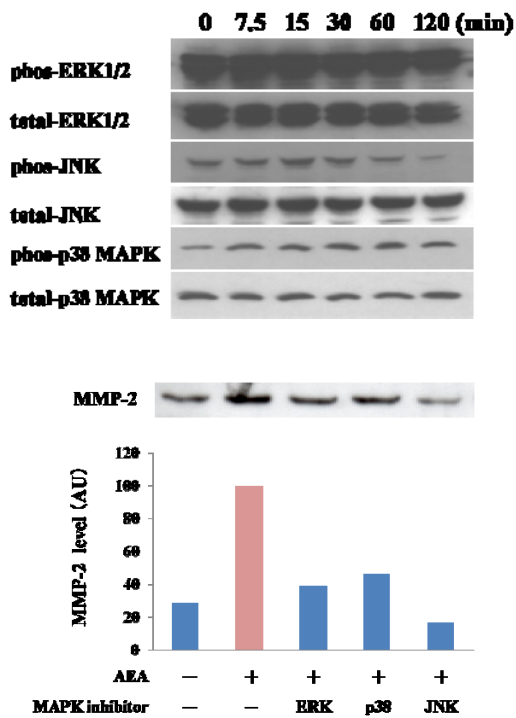


4) ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導  
する MMP-2 産生は、CB1 および TRPV1 のア  
ンタゴニスト SR144528 と capsazepine によ  
り抑制された。また、siRNA による  
knockdown 実験でも同様の結果が得られた。





5) AEA 刺激は、JNK、p38 を活性化した (peak 15 minutes)。一方、ERK1/2 の活性化レベルは変化しなかった。AEA が誘導する MMP-2 産生は主として JNK の阻害剤 (SP600125) で抑制された。



以上の結果から、アナンダマイドが CB1、TRPV1 さらには、主として JNK を介して MMP-2 産生を誘導している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Anandamide Induces Matrix

Metalloproteinase-2 Production through

Cannabinoid-1 Receptor and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Human Dental Pulp Cells in Culture.

J Endod 2012;38:786-790 Keiko Miyashita, Tohru Oyama, Tetsuya Sakuta, Masayuki Tokuda, Mitsuo Torii

〔学会発表〕 (計 1 件)

ヒト歯髄細胞培養系においてアナンダマイドは Cannabinoid-1 Receptor、Transient Receptor Potential Vanilloid-1 を介して MMP-2 産生を誘導する

宮下桂子、小山徹、作田哲也、森元陽子、藤澤真理、徳田雅行、鳥居光男  
 沖縄コンベンションセンター 2012 年 6 月 28 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 徹 (OYAMA TOHRU)

鹿児島大学・歯医学総合研究科・助教

研究者番号：60233623

### (2) 研究協力者

宮下 桂子 (MIYASHITA KEIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号：50636264