

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 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791838

研究課題名（和文） 歯髄炎の病態形成における Alarmin 放出・産生機構の解明

研究課題名（英文） The analyses of release and production of Alarmin 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
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、免疫応答、感染症、自然免疫、Alarmin

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。

近年、感染や細胞障害により細胞にダメージが蓄積して細胞死が生じると、Alarmin と

呼ばれるカテゴリーの細胞内蛋白質 (endogeneous molecules)が放出され、周囲の組織や細胞へ危険信号を伝達する事が明らかとなった。このような danger signal として、high-mobility-group Box

(HMGB) proteins, heat-shock proteins (HSPs), S100 family, IL-1 α , Hepatoma-derived growth factor (HDGF), 尿酸などが Bianchi (J Leukoc Biol, 2007) により報告されている。また同時に Bianchi は、Alarmin の有する特徴として (1) アポトーシスではない細胞死 (nonprogrammed cell death) において放出されること、(2) 細胞死以外の場面で産生および放出されることにより免疫担当細胞が誘導されること、(3) 樹状細胞を含む自然免疫に関与するレセプターを発現している細胞を活性化し、その結果獲得免疫を賦活化させること、(5) 最終的に炎症により破壊された組織を修復することを挙げている。

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が、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) により報告されており、これらのレセプター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。

Park らは Alarmin の一つである HMGB1 が外因性の PAMP と同様に TLR を介して炎症性反応を惹起する事を報告している (J Biol Chem, 2003)。したがって Alarmin は感染時における宿主の生体防御反応において重要な役割を担っていることが推測される。

歯髄における Alarmin については、Sugars ら (Cell Tissue Res, 2007) が歯髄の発生過程において HMGB1 が発現していることを報告しているのみであり、歯髄炎の病態形成における Alarmin の産生・放出についての報告は皆無である。

2. 研究の目的

歯髄炎の病態成立における生体防御機構において、Alarmin の役割をう蝕細菌や細菌性因子と宿主側 (歯髄細胞) との相互作用の見地より解析し、歯髄炎の病態形成における Alarmin の産生・放出機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 炎症歯髄組織において、各 Alarmin の発現を検索する。
- 2) 培養歯髄細胞を各 PRR 特異的リガンド (PAM3CSK4; TLR2 リガンド, *E. coli* LPS; TLR4 リガンド) あるいは炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) で刺激し、各 Alarmin (特に HMGB1 および HSP) の放出・産生について検討する。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 Alarmin の発現についても検討する。
- 3) 上記 2) の条件にて刺激を行う際に抗菌物質 (カテキンなど) を添加し、その影響を検討する。
- 4) 歯髄炎における Alarmin 産生・放出機構に関与するシグナル伝達経路を各阻害剤を用いて解析する。

4. 研究成果

第一段階として、各 PRR 特異的リガンド (TLR-2; Pam3CSK4, TLR-4; *E. coli* LPS) あるいは炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) または *Streptococcus mutans* による刺激を受けた歯髄細胞における Alarmins (HMGB1, HSP60, HSP70) の産生・放出を Western blot 法にて解析した。その結果、各 PRR 特異的リガンドや炎症性サイトカイン単独刺激により培養上清中に HMGB1 の放出が認められ、その放出量は濃度依存的であった。*S. mutans* 刺激により、培養上清中への HMGB1 の放出量は、菌量依存的に増加したが熱処理した *S. mutans* では、その効果は顕著に減弱していた。また、これらの HMGB1 の放出はカテキンの一種である epigallocatechin-3-gallate (EGCG; 50 μ g/ml) の添加により顕著に抑制された。

上記刺激後 24 時間で細胞内タンパクレベルにおいて HSP60 および HSP70 の産生上昇が認められたが、HMGB1 と同様にカテキンの添加によりそれらの産生は抑制された。また、各 PRR 特異的リガンドあるいは IL-1 β 単独刺

激により、培養上清中への HSP70 の顕著な放出は認められなかった。

さらに HMGB1 の遺伝子レベルでの発現を RT-PCR にて解析したところ、各刺激物質による HMGB1 mRNA の発現は無刺激の状態と変わらず、恒常的であった。

第二段階として *Streptococcus intermedius* 由来タンパクである Histone-like protein (HLP)、*E. coli* および *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS を用いてヒト単芽球細胞株である THP-1 細胞を刺激したところ、*S. intermedius* HLP 刺激により HMGB1 が培養上清中に放出される傾向が認められたが *E. coli* および *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による影響は認められなかった。またこれらの HLP あるいは LPS 刺激による培養上清中への HSP60 および HSP70 の放出は認められなかった。

本研究により歯髄細胞から細胞の危険信号を伝達する物質である Alarmin の産生・放出が、歯髄炎の病態形成に関与していることが示唆された。

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, Nakanishi T, Mukai K, Takahashi K, Takegawa D, Matsuo T
Tea catechins reduce inflammatory reaction via mitogen-activated protein kinase pathways in toll-like receptor 2 ligand-stimulated dental pulp cells
Life Sciences, 査読有, 86, 2010, 654-660
10.1016/j.lfs.2010.02.017,
- ② 高橋加奈子
培養歯髄細胞における *Streptococcus mutans* および炎症性サイトカインによる CCL20 の発現
四国歯学会雑誌, 査読無, 22 (2), 2010, 157-165

[学会発表] (計 10 件)

- ① Nur Asikin
The effect of extracellular DNA on the development of *Streptococcus intermedius* biofilm
第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会
2011/10/22-23
岡山大学 (岡山市)

- ② 湯本浩通
高周波・電磁波照射による骨芽細胞の Growth factor の発現・産生誘導
第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会
2011/10/20
大阪国際交流センター (大阪市)
- ③ Hirota Katsuhiko
Genes expression profiling of human monocytic THP-1 cells stimulated with extracellular *Streptococcus intermedius* histone-like DNA binding protein
International Union of Microbiological Societies 2011 Congress
札幌コンペティションセンター (札幌市)
2011/9/7
- ④ 武川大輔
ヒト培養歯髄細胞の自然免疫応答に対するインターフェロン γ の影響
第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会
2011/6/9-10
東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (浦安市)
- ⑤ 湯本浩通
高周波・電磁波照射を歯内療法に応用した症例
第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会
2011/6/9-10
東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (浦安市)
- ⑥ 近藤洋史
THP-1 細胞のケモカイン産生に及ぼす口腔レンサ球菌ヒストン様 DNA 結合タンパク質の影響
第 34 回徳島県医学検査学会
2010/12/12
徳島大学医学部保健学科 (徳島市)
- ⑦ 中西正
ヒト歯髄細胞におけるサイトカイン発現に対する Prostaglandin F 2α の影響
第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会
長良川国際会議場 (岐阜市)
2010/10/28-29
- ⑧ 湯本浩通
Streptococci 由来 histone 様 DNA 結合タンパク質が THP-1 細胞のサイトカインバランスに及ぼす影響
第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会
長良川国際会議場 (岐阜市)

2010/10/28-29

⑨ Nakanishi Tadashi
Catechins suppress cyclooxygenase-2
expression in human dental pulp cells
International Association for Dental
Research
Centre Convencions Internacional
Barcelona (Barcelona, Spain)
2010/7/17

⑩ Takegawa Daisuke
Interferon- γ enhances toll-like
receptor ligand-induced cytokine
production in pulpal cells
International Association for Dental
Research
Centre Convencions Internacional
Barcelona (Barcelona, Spain)
2010/7/17

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：