

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592755

研究課題名(和文)象牙質・歯髄複合体由来MMPによるう蝕進展機構の解明 新規病態モデルへの展開

研究課題名(英文)How dentin pulp complex derived MMPs contribute to dental caries? a novel model for caries progression.

研究代表者

池尾 隆 (IKEO, Takashi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40159603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroでの歯髄炎モデルとして歯髄由来線維芽細胞を炎症サイトカインであるTNF α 存在下で培養を行いMMPの産生を検討した結果、MMP-1、MMP-3の産生が亢進した。MMP-1の生物活性はコラーゲンを基質とした酵素活性測定により確認した。TNF α 刺激による細胞内シグナル伝達分子の各種阻害剤を検討した結果、SP601245がMMP-3の産生を抑制することを確認した。同様にJNK1とJNK2のRNAiはTNF α によるMMP-3の産生を抑制した。さらにTNF α 刺激により転写因子であるCREBの活性化が生じること、JNK1/2のRNAiによりこれが抑制されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we examined the molecular mechanism of caries progression caused by dentin pulp complex derived MMPs. First, we examined the secretion of MMP-1 and MMP-3 from cultured dental pulp fibroblast. Pro-inflammatory cytokine TNF α increased secretion of the MMPs. We found JNK inhibitor or SP601245 suppressed TNF α induced MMP-3 secretion. Next, to know the key transcription factor for the MMP-3 production in response to TNF α , we had screened possible transcription factors and found CREB as a candidate. To elucidate whether the activity of CREB is controlled by JNK1/2, we conducted pharmacological and genetic suppression of JNK1/2 and found that suppression of JNK 1/2 resulted in deactivation of CREB.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：う蝕 象牙質 MMP

1. 研究開始当初の背景

象牙質は、リモデリングがなく、抜髄後もある程度機能することから、生物活性の低い組織であると考えられてきた。現在、外部刺激を受容し、二次象牙質を形成することなどから「象牙質・歯髄複合体」としてとらえることが、臨床的にも発生学的にも妥当であると考えられている。さらに最近では、象牙質にはBMPやTGF- β などのサイトカインが含まれており、脱灰(う蝕、酸処理など)により溶出し、象牙芽細胞の活性に影響を与えるとの報告がある。また、象牙質にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が存在するとの報告やう蝕展開時にこのMMPが有機マトリクス成分を分解するとの報告もある。よって、主に血中や軟組織での働きが注目されてきたMMPやサイトカインが、石灰化した象牙質にも存在し、脱灰によりさまざまな生物活性を示す可能性が示唆されはじめている。

う蝕の病態については、好発部位、進行様式、病原菌とホストと食事との相互関係、さらに再石灰化反応などが明らかになり、う蝕治療の基盤となっている。しかし、プラーク付着量や若年者の急性う蝕など説明が困難な例もあり、生活習慣、う蝕病原菌、歯の石灰化度、唾液の作用など多くの因子で説明されているが、病態理解がまだまだ不十分である。

現代の歯科治療において欠かせない接着修復手技の際、エッチング後に適用される疎水性のボンディングレジンと象牙質の相性が悪く、コラーゲン繊維層へのレジンモノマーの浸透を助けるプライマー処理が必要となる。これにより強固な接着が可能になる反面、辺縁漏洩の開始点ともなる。最近、セルフエッチングプライマーが象牙質に存在するMMPを活性化する報告があり、MMPにおける樹脂含浸層の破壊を検討する必要がある。

我々は、ヒト歯髄由来細胞を用いてTNF- α 刺激がERK1/2経路を介してMMP-3の発現を促進することを確認した。これは、象牙質歯髄複合体への外部刺激が、象牙質細胞あるいは歯髄繊維芽細胞にMMPの産生シグナルとなる可能性を示唆するものである。脱灰象牙質・歯髄由来のMMPがう蝕の進行および接着修復に及ぼす影響を明らかにし、その病態の詳細を生物学的に理解し直すことが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

う蝕進展の新規病態モデル(機能的モデル)の確立である。本研究により、MMP阻害剤による象牙質破壊の制御、接着修復の改良という臨床的アプローチを可能にし、近年注目されている抗菌性モノマーの様な機能性レジンとしての「MMP阻害モノマー」の開発に展開することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)象牙質から溶出するサイトカイン・MMPの解析:Western blotting、ゼラチンゼイモグラフィ、ELISA、免疫染色により、サイトカイン、MMPを測定する。う蝕やエッチングで象牙質を溶解する主要な酸である乳酸やリン酸に加えて、その他の無機・有機酸、キレート剤などを用いたタンパク質の溶出を行う。

(2)歯髄によるサイトカイン・MMPの産生と、それに対する歯髄の反応の検討:外部刺激、炎症刺激に対する歯髄の反応性を検討する。歯髄によって産生されたMMPが歯髄の破壊および接着修復の破壊に及ぼす影響を検討するための基礎的研究を行う。*in vitro*歯髄細胞培養系にて各種刺激下でのサイトカイン・MMPの産生の変化をウエスタンブロット、ゼイモグラフィで検討する。

(3)MMPが象牙質破壊および接着修復に及ぼす影響を検討:「酸脱灰象牙質とDQコラーゲンをを用いた実験系」:*In vitro*で脱灰象牙質中に含まれるMMPがコラーゲン分解に及ぼす影響を検討するために、本研究に先立って構築した。酵素によって切断が起こると蛍光を発する様に標識された細胞外基質であるDQコラーゲンおよびDQゼラチンを脱灰象牙質MMPによる分解の基質とするもので、脱灰象牙質由来MMPの活性および基質特異性を定量的に測定する。

(4)MMP阻害剤が象牙質破壊および接着修復に及ぼす影響を検討:特異性および作用機序の異なるMMP阻害剤を、上記のDQコラーゲンをを用いた実験系に適用し、MMP阻害剤が象牙質MMPによる基質分解能に及ぼす影響を検討し、MMPによる象牙質の崩壊にどのMMPが、どの程度関与しているのかを解明する。また、MMP阻害剤が接着修復に及ぼす影響を検討するために、MMP阻害剤を適用した象牙質に対し接着修復を行い、その接着強度は、万能試験機を用いた引っ張り試験により評価する。

以上より、脱灰象牙質中のMMPによる象牙質有機成分の分解をDQコラーゲンをを用いた実験系により可視化・数値化し評価を行い、象牙質・歯髄複合体の生物活性がう蝕、接着修復への及ぼす影響の解明につなげる。

4. 研究成果

*In vitro*での歯髄炎モデルとして歯髄由来線維芽細胞を炎症サイトカインであるTNF α 存在下で培養を行いMMPの産生を検討した結果、MMP-1、MMP-3の産生が亢進した。MMP-1の生物活性はコラーゲンを基質とした酵素活性測定により、同様に確認した。MMP-3はMMP-1を活性化することが知られているた

め、その産生の詳細なメカニズムを検討した。TNF α 刺激による細胞内シグナル伝達分子の各種阻害剤を検討した結果、JNK inhibitor である SP601245 が MMP-3 の産生を抑制することを確認した。同様に JNK1 と JNK2 の RNAi は TNF α による MMP-3 の産生を抑制した。さらに TNF α 刺激により転写因子である CREB の活性化が生じること、JNK1/2 の RNAi によりこれが抑制されることを確認した。以上の結果より、TNF α による MMP-3 の産生は JNK-CREB 経路を介することが示唆された。以上の知見より JNK-CREB 経路の制御が、歯髄炎におけるマトリックス分解をコントロールする重要な要素であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

竹内 撰, 合田征司, 吉川一志, 堂前英資, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生の影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 57 巻, 2014, 1-8.

Komasa R, Goda S, Yoshikawa K, Ikeo T, Yamamoto K. Effects of Rac1 on the production of MMP-3 by TNF-. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 56 巻, 2013, 544-550.

Goda S, Inoue H, Domae E, Kagawa M, Hosoyama Y, Matsumoto N, Nishiyama Y, Ikeo T. Matrix metalloproteinase-1 produced by human CXCL8-activated NK cells. J Oral Tissue Engin, 査読有, 11 巻, 2013, 163-171.

Kato Y, Goda S, Ikeo T, Hayashi H. Effects on JNK on the production of MMP-3 by interleukin-1 β -stimulated human dental pulp fibroblast like cells. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 56 巻, 2013, 48-54.

Tamura I, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Ikeo T. Insulin-like growth factor-II promotes proliferation of human periodontal ligament fibroblasts via expression of early growth response transcription factors. J Oral Tissue Engin, 査読有, 10 巻, 2012, 13-20.

Domae E, Ogawa Y, Takeuchi O, Ujii Y, Kato Y, Kawasaki T, Hayashi H, Komasa R, Domae N, Goda S, Ikeo T. The Effect of lysenin on the differentiation into osteoclast cells. J Oral Tissue Engin, 査読有, 9 巻, 2011, 3-9.

〔学会発表〕(計 32 件)

小正玲子, 合田征司, 吉川一志, 竹内 撰,

堂前英資, 三木秀治, 小正紀子, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における MMP-3 産生に及ぼす small G protein の影響. 第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2013.10.17. 秋田県総合生活文化会館 (アトリオン) (秋田市).

氏井庸介, 合田征司, 堂前英資, 川崎俊也, 林 寛, 香川真貴子, 細山有規子, 池尾 隆, 松本尚之. ヒト歯肉由来線維芽細胞の TIMP-1 産生に及ぼす p38MAP kinase の影響. 第 72 回日本矯正歯科学会大会. 2013.10.8-9. キッセイ文化ホール (松本市).

香川真貴子, 川崎俊也, 氏井庸介, 林 寛, 細山有規子, 合田征司, 池尾 隆, 松本尚之. Protein Kinase B の RANKL 刺激による破骨細胞分化に及ぼす影響. 第 72 回日本矯正歯科学会大会. 2013.10.8-9. キッセイ文化ホール (松本市).

Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I, Kamada A, Ikeo T. Small Interfering RNA Targeting Smad1 suppresses osteoclast differentiation. American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting. 2013.10.6 Baltimore, MD, USA.

小正玲子, 合田征司, 吉川一志, 池尾 隆, 山本一世. Effects of Rac1 on the production of MMP-3 by TNF-. 第 55 回日本歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013.9.22. 岡山コンベンションセンター (岡山市).

林 寛, 氏井庸介, 合田征司, 池尾 隆, 松本尚之. Effect of VCAM-1 on the osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. 第 55 回日本歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013.9.22. 岡山コンベンションセンター (岡山市).

小正玲子, 竹内 撰, 合田征司, 堂前英資, 谷本啓彰, 三木修治, 野村雄司, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髄由来線維芽細胞における MMPs 産生におよぼす small G protein の影響. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 (第 138 回). 2013.6.28. 福岡国際会議場 (福岡市).

合田征司, 池野真紀, 池尾 隆. ヒト歯髄由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生に及ぼす JNK の関与の解明. 第 13 回日本抗加齢医学会総会. 2013.6.28. パシフィコ横浜 (横浜市).

加藤 侑, 合田征司, 池尾 隆, 林 宏行. ヒト歯髄由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生に及ぼす JNK の影響. 第 538 回大阪歯科学会例会. 2013.4.13. 大阪歯科大学 (枚方市).

Kamada A, Ikeo T, Tamura I, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Yoshimoto H, Kakudo K. Statin Regulates Runx2 Expression in Human Dental Pulp Stem Cells. 91st General Session & Exhibition of the IADR. 2013.3.23. Seattle, WA, USA.

田邊順一, 鎌田愛子, 田村 功, 合田征司, 堂前英資, 吉川美弘, 池尾 隆. アデインクチンコラーゲン様ドメインから新規合成したペプチドの骨芽細胞におよぼす影響. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会. 2013. 3. 2. 東京医科歯科大学 (東京都).

吉川美弘, 川本章代, 堂前英資, 合田征司, 田村 功, 鎌田愛子, 小正 裕, 池尾 隆. マウス骨芽細胞における Smad1 を介した VDR の発現. 第 11 回日本歯科骨粗鬆症研究会学術大会・総会. 2013. 3. 2. 東京医科歯科大学 (東京都).

Tamura I, Kamada A, Goda S, Yoshikawa Y, Domae E, Ikeo T. Kinetics of early growth response proteins in human periodontal fibroblast wound healing model. 2012 American Society for Cell Biology Annual Meeting. 2012.12.17. San Francisco, CA, USA.

加藤 侑, 合田征司, 池尾 隆, 林 宏行. Effects of JNK on the production of MMP-3 by interleukin-1 beta-stimulated human dental pulp fibroblast like cells. 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回). 2012.11.22. 広島国際会議場 (広島市).

竹内 摂, 合田征司, 小正玲子, 宮地秀彦, 松田有之, 小松首人, 藤原秀樹, 池尾 隆, 山本一世. ヒト歯髓由来線維芽細胞における IL-1 刺激による MMP-3 産生への影響. 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回). 2012.11.22. 広島国際会議場 (広島市).

吉川美弘, 堂前英資, 合田征司, 田村 功, 鎌田愛子, 池尾 隆. 骨芽細胞による破骨細胞分化には Smad1 が関与する. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012.11.9. 大阪国際会議場. (大阪市)

川崎俊也, 合田征司, 松本尚之, 池尾 隆. RANKL 刺激による破骨細胞分化における Akt の影響. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012.11.9. 大阪国際会議場. (大阪市)

田村 功, 鎌田愛子, 合田征司, 吉川美弘, 堂前英資, 池尾 隆. EGFR 阻害薬を用いた分子標的治療薬効マーカーの検索. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012.11.9. 大阪国際会議場. (大阪市)

鎌田愛子, 池尾 隆, 田村 功, 合田征司, 吉川美弘, 堂前英資. メタボリックシンドロームと硬組織形成. 第 22 回日本歯科医学会総会. 2012.11.9. 大阪国際会議場. (大阪市)

Yoshikawa Y, Kamada A, Tamura I, Goda S, Domae E, Ikeo T. BMP-2 Promotes osteoclast differentiation by enhancing the activity of smad1. American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting. 2012.10.15. Minneapolis, MN, USA.

②林 寛, 川崎俊也, 氏井庸介, 合田征司, 池尾 隆, 松本尚之. ヒト歯肉由来線維芽細胞の MMP-1 に及ぼす p38 kinase の影響. 第 71 回日本矯正歯科学会大会. 2012.9.27-28. 盛岡市民文化ホール (盛岡市).

②合田征司, 池野真紀, 池尾 隆. PDGF-bb が歯肉線維芽細胞に及ぼす影響. 第 12 回日本抗加齢医学会総会. 2012.6.23. パシフィコ横浜 (横浜市).

③加藤 侑, 合田征司, 小正玲子, 竹内 摂, 山本一世, 池尾 隆, 林 宏行. ヒト歯髓由来線維芽細胞の MMP-3 産生に及ぼす MAP kinase の影響. 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回) 2011.10.20-21. 大阪国際交流センター (大阪市).

④林 寛, 氏井庸介, 川崎俊也, 堂前英資, 合田征司, 池尾 隆, 松本尚之. 骨芽細胞遊走に及ぼすエムドゲインの影響. 第 70 回日本矯正歯科学会大会. 2011.10.19. 名古屋国際会議場 (名古屋市).

⑤川崎俊也, 合田征司, 氏井庸介, 林 寛, 堂前英資, 池尾 隆, 松本尚之. 破骨細胞分化に及ぼす Lipid rafts の影響. 第 70 回日本矯正歯科学会大会. 2011.10.19. 名古屋国際会議場 (名古屋市).

⑥鎌田愛子, 田村 功, 合田征司, 吉川美弘, 堂前英資, 池尾 隆. 新規合成 collagen-mimetic peptide の骨芽細胞分化に及ぼす影響. 第 53 回歯科基礎医学会総会・学術大会. 2011.10.11. 長良川国際会議場 (岐阜市).

⑦Ikeo T, Kamada A, Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I, Takaishi Y. Stain suppresses excess Runx2 expression in human osteoblastic osteosarcoma cells. American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting. 2011.9.19. San Diego, CA, USA.

⑧Kamada A, Ikeo T, Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I. Collagen-mimetic peptide of adiponectin accelerates

osteoblastic differentiation.
American Society for Bone and Mineral
Research 2011 Annual Meeting. 2011.9.19.
SanDiego,CA, USA.

②⑨川崎俊也,合田征司,竹内 撰,氏井庸介,
林 寛,小正玲子,加藤 侑,林 宏行,山
本一世,池尾 隆,松本尚之. PDGF-bb はヒ
ト歯肉由来線維芽細胞において MMP-1 産生を
増強する. 第 9 回日本再生歯科医学会学術大
会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪
市).

③⑩吉川美弘,川本章代,新原拓也,竹山 旭,
堂前英資,合田征司,田村 功,鎌田愛子,
森田章介,岡崎定司,小正 裕,池尾 隆.
歯根膜細胞において VDR 発現が破骨細胞分化
因子を調節する. 第 9 回日本再生歯科医学会
学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議場
(大阪市).

③⑪田村 功,鎌田愛子,合田征司,吉川美弘,
堂前英資,池尾 隆. ヒト歯根膜線維芽細胞
の EGR 発現における IGF-II の影響と糖修飾.
第 9 回日本再生歯科医学会学術大会・総
会.2011.9.10.大阪国際会議場(大阪市).

③⑫池尾 隆. The Future WELLNESS 再生歯科
医学・医療の貢献. 第 9 回日本再生歯科医学
会学術大会・総会.2011.9.10.大阪国際会議
場(大阪市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

池尾 隆 (IKEO, Takashi)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 40159603

(2)研究分担者

合田征司 (GODA, Seiji)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 70351476

竹内 撰 (TAKEUCHI, Osamu)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 70548320

鎌田 愛子 (KAMADA, Aiko)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50140215

吉川 美弘 (YOSHIKAWA, Yoshihiro)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 70434793