

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659889

研究課題名(和文)マクロファージと共存する歯髄細胞で発現変動する分子群の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the molecules up- or down- regulated in dental pulp cells co-cultured with macrophages

研究代表者

西村 英紀(NISHIMURA, Fusanori)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80208222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：不可逆性歯髄炎は時として耐えがたい痛みを伴う。しかしながら歯髄の保存は後の破折などの合併を鑑みた場合、極めて重要である。歯髄の保存には漏えいのないシーリング剤の開発と炎症の制御が重要である。本研究はこのうち後者に関して、歯髄炎症モデルの開発、炎症制御分子、およびその担体の探索、炎症惹起状況で発現変動する分子の解析、を通して有効な歯髄保存療法確立の一助とすることを目的とした。結果、歯髄の炎症反応がなぜ短期間に急速に進行し、組織の融解壊死をもたらすのかについて、その病態生理を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Irreversible pulpitis often accompanies intolerable pain. However, pulp preservation is an ideal goal of dental treatment to avoid unwanted side effects such as tooth fracture. To save dental pulp, development of adhesive materials achieving no microleakage and controlling dental pulp tissue inflammation are two essential factors. This study dealt with latter issue. The purpose of this study was 1) to establish in vitro pulpitis model, 2) to explore the reagent controlling pulp inflammation and the compound carrying such reagent, and 3) to analyze molecules up- or down- regulated under inflammatory conditions in pulp cells. All these approaches contribute to develop new strategy aiming the preservation of pulp tissues. We found the reason why pulpal inflammation expands in a short period and leads to tissue necrosis. These findings are important in our understanding the patho-physiology of dental pulp inflammation.

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：歯髄炎 炎症反応 サイトカイン 炎症制御 遺伝子発現 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

急性歯髄炎は時として耐えがたい痛みを惹き起す。また、炎症歯髄では生体の他の臓器に類を見ないほど、重篤な炎症反応が惹起され、ほとんどの場合歯髄組織は数日内に融解壊死する。

しかしながら、歯髄の保存は歯科保存領域における究極のゴールであり、一旦歯髄が除去された場合、歯の破折や根尖性歯周炎の合併等、多くのリスクを抱えた治療を余儀なくされるため、保存を目的とした治療法の開発が望まれる。一般に、歯髄の保存のためには、

カリエス除去後の修復物辺縁と残存歯質の強固なシーリングによる micro-leakage の阻止、歯髄炎症の鎮静化による歯髄炎の不可逆化の阻止、の2点が重要とされる。このうち、に該当する課題についてはこの数十年間で、接着システムの開発・改善により多くの成果を上げてきた。一方で、歯髄炎症の制御機構について、取り上げた研究はあまり多くない。一般に歯髄組織は、間葉系の歯髄細胞、毛細血管内皮細胞、神経細胞や少数の樹状細胞などから構成されており、炎症が惹起された場合、そこに好中球、マクロファージ、リンパ球の浸潤が起こることが確認されている。このうち、マクロファージは単に細菌抗原や異物を非特異的に貪食するのみでなく、炎症反応初期の自然免疫機構と中～後期の獲得免疫の発動を仲介する上で重要な役割を果たす。また、炎症反応初期において後の炎症応答の発動に重要な役割を果たす前炎症性サイトカインとして知られる腫瘍壊死因子 (TNF- α) の主な産生源でもある。実際問題、歯髄炎においても TNF- α の組織内での増加が、痛みに対する閾値を低下させ、炎症の不可逆化に関与することが報告されている。

以上から、申請者らは歯髄細胞とマクロファージの相互作用によって、強力な歯髄炎症が惹起され、歯髄炎の不可逆化がもたらされるとの仮説を設けた。そこで、最終的に歯髄炎症の不可逆化を防止する治療法の開発を目指し、まず歯髄細胞とマクロファージを用いた *in vitro* における歯髄炎症モデルを構築すること、そこで強力な炎症反応が惹起されることが確認された場合、その炎症反応を制御することが可能な分子を見出し、さらにその分子を徐放するような compound と組み合わせることで臨床応用可能なものとなるかどうかを で確立したモデルを用いて検証すること、 で強力な炎症反応が惹起された場合、そこで発現変動する分子群を網羅的に解析することで、非可逆性歯髄炎の病態生理解明の一助とすることを企画し、本研究を行った。

2. 研究の目的

以上の背景から、以下の3点に焦点を絞り、研究を遂行した。

歯髄細胞とマクロファージを用いた *in*

vitro の歯髄炎モデルを確立する。

確立した歯髄炎モデルを用いて、炎症を鎮静化する分子を見出すとともに、本分子を内包し、さらに徐放可能な担体を探索し、その効果を確認する。

確立した *in vitro* 炎症モデルにおいて強力な炎症反応が惹起されることが確認された場合、炎症反応の拡大に介在する分子群をマイクロアレイの手法を用いて網羅的に解析し、その役割を明らかにする。

3. 研究の方法

in vitro 歯髄炎モデルの確立を目指す基礎研究

前述したようにマクロファージの歯髄組織への浸潤は歯髄炎が可逆性から不可逆性へと推移する際の critical なステップの一つである。そこで、この段階で炎症反応がどのように展開するのかについて検討する目的で細胞培養系を用いた歯髄炎モデルの確立を試みた。歯髄細胞には SV40 large T-antigen とヒトテロメラーゼ伸長酵素を移入した不死化歯髄細胞 DP-1 とヒト歯髄組織から分離・培養した primary な歯髄細胞を用いた。マクロファージ細胞としてヒト単球系白血病細胞株である THP-1 細胞をマクロファージに分化させ用いた。両細胞をトランスウェルシステムで培養 (上室に THP-1、下室に歯髄細胞) し、共培養系を LPS 刺激することで感染モデルとした。LPS 刺激後の培養上清中のサイトカイン濃度を測定し、LPS 無刺激、あるいは単独培養の状態とのサイトカイン産生性の変化を比較検討した。

共培養系における歯髄炎症抑制効果分子の探索、ならびに臨床応用を目指した担体の効果検討

炎症抑制効果が報告されているポリフェノールのうち、ルテオリンとケルセチンに着目した。実験 で共培養系において、最もサイトカイン産生が高かったことからルテオリンやケルセチンの共培養系におけるサイトカイン産生抑制効果を検討した。さらに、マクロファージ単独培養系からの TNF- α 産生抑制効果も検討した。ルテオリンに最も強い、産生抑制効果が確認されたため、ルテオリンの担体としてリン酸化プルランに着目した。ルテオリン含有リン酸化プルランのサイトカイン産生抑制効果を同様に確認した。

マクロファージからの TNF- α 産生を促進する歯髄細胞由来因子の探索のための歯髄細胞で発現が亢進している遺伝子群の網羅的解析

実験 の結果から、マクロファージと歯髄細胞を共培養した際にマクロファージからの TNF- α 産生が著しく上昇したことから、血清無添加の培養系で、歯髄細胞において発現上昇している遺伝子群に注目し、同様の方法で培養した歯肉線維芽細胞における遺伝子

発現と比較検討する目的で、マイクロアレイの手法を用いた解析を行った。

4. 研究成果

in vitro 歯髄炎モデルの確立

共培養系を LPS 刺激した場合、無刺激の場合の共培養開始 24 時間後の interleukin-6 (IL-6)、MCP-1、IL-8、RANTES の産生性を単独細胞培養系の産生性と比較した。その結果、IL-6、MCP-1、IL-8 に関しては、LPS 刺激の有無に関わらず、共培養することでその産生性が著しく上昇した。単独培養系において DP-1 からこれらサイトカインの産生が認められたことから主な産生細胞は歯髄細胞と考えられた。一方、RANTES は主な産生細胞は THP-1 であり、共培養系、ならびに LPS 刺激 THP-1 細胞で著明な産生増強効果が確認された当初、LPS はマクロファージからの TNF- α 産生を促進することで LPS との相乗効果によって共培養系からのサイトカイン産生が増強するとの仮説のもと検討を進めてきたが、予想に反し LPS の有無に関わらず共培養することでサイトカイン産生が著明に亢進した。この結果を受け、歯髄細胞にはマクロファージからの TNF- α 産生を促進する因子が存在し、それによって産生された TNF- α の効果により LPS の効果がマスクされたのではないかと考察した。そこでまず、DP-1 単独培養系にリコンビナント TNF- α を作用させることで IL-6、MCP-1、IL-8 産生が上昇するか否かについて検討した。その結果、5ng/ml のリコンビナント TNF- α は共培養にほぼ匹敵するレベルのこれらサイトカインの産生を誘導した。そこで DP-1 の上清にマクロファージからの TNF- α 産生を促進する効果があるかどうかを確認するため、上清をマクロファージに作用させ TNF- α 産生性を確認した。その結果、DP-1 上清にはマクロファージからの TNF- α 産生を誘導する因子が存在することを確認した。さらにこの効果は primary な歯髄細胞においても確認された。

本実験結果を解釈すると以下のように要約できる。

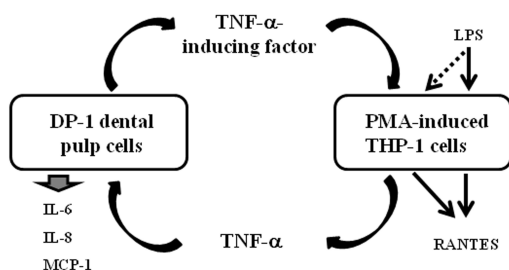


図 歯髄細胞 (DP-1) とマクロファージ (PMA-induced THP-1 cells) の共培養においては DP-1 由来 TNF- α -inducing factor によりマクロファージが活性化され、多量の TNF- α が産生され、それにより DP-1 からの IL-6、

MCP-1、IL-8 産生がもたらされる。一方、RANTES は共培養においては歯髄細胞由来因子により産生された TNF- α によりマクロファージから主に産生されるほか、一部は LPS によって活性化され産生された TNF- α によっても産生される。

歯髄炎症抑制効果分子としてのポリフェノールの応用の可能性、ならびに臨床応用を目指した担体の効果の検討

歯髄炎症抑制効果を有する候補物質としてポリフェノールに着目した。本検討においてはそのうち、ルテオリンとケルセチンに注目し、その抑制効果を検討した。その結果、ルテオリンは検討した IL-6、MCP-1、IL-8、RANTES のいずれにおいてもルテオリンの濃度依存性に共培養系からの産生を抑制する効果が確認された。一方で、ケルセチンについては、MCP-1、RANTES のみ濃度依存性の抑制効果が確認された。の実験にあるように、マクロファージからの TNF- α が下流のサイトカイン産生に大きな影響を及ぼす。そこで今度はルテオリンとケルセチンのマクロファージ、および歯髄細胞 マクロファージ共培養系からの TNF- α 産生抑制効果について検討した。その結果、ルテオリンは LPS 刺激マクロファージ単独培養、ならびに共培養系のいずれにおいても TNF- α 産生を抑制したが、ケルセチンの効果は共培養系からの産生を部分的に抑制するというものであった。以上から、後の実験においては主としてルテオリンを用いた。ルテオリンの徐放性担体としてリン酸化プルランを用いた。プルランは水溶性の多糖であり、でんぷんに比べ 2 倍の接着力があること、徐々に融解することから徐放効果が期待される担体として用いられ始めている。ルテオリン含有リン酸化プルランを培養液に浸漬し、24 時間後遊離したルテオリン含有上清を用い、サイトカイン産生抑制試験を行った。その結果、この上清は LPS 刺激マクロファージからの TNF- α 産生性、LPS 刺激マクロファージ培養上清によって刺激した歯髄細胞からの IL-6、MCP-1 産生、歯髄細胞培養上清によって刺激したマクロファージの培養上清で刺激した歯髄細胞からの IL-6、MCP-1 産生を有意に抑制した。以上から、リン酸化プルランは内包するルテオリンを徐放すること、遊離したルテオリンにはサイトカイン産生抑制効果があることが確認された。リン酸化プルランの崩壊の程度 (徐放性の調節) は添加する塩化カルシウムの量によって調整できることから、実際のチェアサイドにおいても調整可能であり、臨床応用の可能性が強く示唆された。

マクロファージからの TNF- α 産生を促進する歯髄細胞由来因子の探索のための歯髄細胞で発現が亢進している遺伝子群の網羅的解析

実験 の結果から、歯髄細胞 (不死化歯髄

細胞 DP-1 および primary 歯髓細胞) はマクロファージからの TNF- α 産生を誘導する因子を培養上清中に産生していることを見出したことから、この因子を歯髓細胞由来腫瘍壊死因子誘導因子 (Dental pulp cell-derived TNF-inducing factor: DPTIF) と名付けた。DPTIF 活性は血清非存在下で培養した歯髓細胞においても観察されたことから、血清非存在下で歯髓細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析する目的で、マイクロアレイの手法を用い、同様の方法で培養した歯肉線維芽細胞における遺伝子発現様式と比較した。DP-1 においてはコントロールである歯肉線維芽細胞と比較して、CXCL1、CSF2、CXCL2、IL-8、CXCL6、CCL5、IL-1b、IL-6 等の遺伝子発現が上昇していた。一方、primary 歯髓細胞では歯肉線維芽細胞と比較して MX1、CXCL1、MX2、CTGF、CCL2、等の遺伝子発現が上昇していた。これらの遺伝子産物について、リコンビナント蛋白を入手し、マクロファージからの TNF 産生性を検討したが、調べたすべての分子群において DPTIF 活性は確認されなかった。そこで両者に共通して高発現している遺伝子を上位の分子から順に整理した。MX1 や CXCL1 には上述したように DPTIF 活性は見いだせなかったものの、上位から 14 番目の分子において弱いながら DPTIF 活性を確認した。現在、その抗体による中和試験、ならびにノックダウンによる阻害試験を継続しており、活性および阻害が確認され次第、産業財産として出願する予定にしている。

以上から、本研究の重要な成果として、**歯髓細胞はマクロファージからの TNF- α 産生を誘導する因子を産生しており、この因子により一端歯髓組織へマクロファージが浸潤した場合、強力な炎症反応が惹起され、不可逆性の歯髓炎への進行が加速されるとともに、数日以内に組織が融解壊死するものと考えられた。歯髓炎の病態生理の一端を解明できた**と結論できる。

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 件)

Yonehiro J, Yoshida Y, Yamashita A, Yoshizawa S, Ohta K, Kamata N, Okihara T, Nishimura F. Flavonol-containing phosphorylated pullulan may attenuate pulp inflammation. *Int Endod J*, 46:119-127, 2013. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02095.x.

Yonehiro J, Yamashita A, Yoshida Y, Yoshizawa S, Ohta K, Kamata N, Okihara T, Nishimura F. Establishment of ex vivo pulpitis model by co-culturing immortalized dental pulp cells and macrophages. *Int Endod J*, 45:1103-1108, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02074.x.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin Sialophosphoprotein and Dentin Matrix Protein-1: Two Highly Phosphorylated Proteins in Mineralized Tissues. *Archive Oral Biol*, 57:1165-1175, 2012. 査読有 doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005.

〔学会発表〕(計 件)

永安慎太郎、鈴木茂樹、小武家誠司、山下明子、安孫子宜光、西村英紀: 歯髓細胞が産生する TNF 誘導因子の探索. 第137回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2012年11月, 広島

米廣 純子, 山下 明子, 永安慎太郎, 西村英紀, 他: フラボノイドによる歯髓炎症制御の応用 ~ リン酸化プルランセメントを用いての検討. 第132回日本歯科保存学会春季学術大会. 2011年5月, 熊本

〔図書〕(計 件)

山下明子、西村英紀. 4. 高齢者・有病者の歯内治療 糖尿病とエンドペリオ. p. 142-147, 興地隆史、井澤常泰、石井信之、木ノ本喜史 編集「DENTAL DIAMOND 増刊号 ライフステージと歯内療法 歯の長期保存のために」デンタルダイヤモンド社, 2013(共同執筆)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 英紀 (NISHIMURA, Fusanori)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 80208222

(2) 研究分担者

鈴木 茂樹 (SUZUKI, Shigeki)
広島大学・医歯薬保健学研究所・助教
研究者番号: 30549762

山下 明子 (YAMASHITA, AKIKO)

広島大学・医歯薬保健学研究所・助教
研究者番号: 70511319

(3) 連携研究者

安孫子 宜光 (ABIKO, Yoshimitsu)
日本大学松戸歯学部
研究者番号: 70050086