

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463208

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来細胞における抗炎症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of anti-inflammatory mechanisms in deciduous dental pulp cells

研究代表者

原田 京子 (HARADA, Kyoko)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：80434794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：結合組織の修復や再生に深く関与している乳歯歯髄細胞において、炎症反応の抑制機序解明および適切な培養条件の検討を目的として研究を行った。

LPSおよび熱刺激(41 15分)を乳歯歯髄由来細胞に処置後、増殖能および遺伝子発現変動について検討を行った。また無血清培地で培養した細胞について、細胞形態変化および遺伝子発現変動を検討した。LPSおよび熱刺激により細胞増殖能は一時的に低下するものの、72時間後には回復がみられた。PT-PCRではIL-6およびIL-12の増加が認められ、HSP70の発現増加も認められた。また、無血清培地で培養した細胞は、細胞形態および遺伝子発現に変動が認められた。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of inhibition of inflammatory response and examination of appropriate culture conditions in dental pulp cells that are deeply involved in repair and regeneration of connective tissue.

After treatment of LPS and heat stress (41 15 min) to deciduous dental pulp cells, cell proliferations and gene expressions were investigated. In addition, cell morphology change and gene expressions were examined in deciduous dental pulp cells cultured with serum-free medium. Cell proliferation temporarily decreased due to LPS and heat stress, but recovery was observed after 72 hours. Increased IL-6 and IL-12 was observed in PT-PCR, and increased expression of HSP70 was also observed. Cells cultured with serum-free medium showed variation in cell morphology and gene expression.

研究分野：小児歯科学

キーワード：乳歯歯髄

## 1. 研究開始当初の背景

齲蝕及び歯周病に代表される歯科疾患は、その発病や進行により歯の喪失へと繋がるため、食生活や社会生活等に支障をきたし、ひいては、全身の健康に影響を与えるものとされている。現在、歯の喪失が10歯以下であれば食生活に大きな支障を生じないとの研究に基づき、生涯にわたり自分の歯を20歯以上保とうという8020運動が提唱・推進されている。歯の喪失原因の約9割が齲蝕と歯周病で占められていることから、各ライフステージに応じた適切な齲蝕・歯周病予防を推進することが重要である。特に乳歯の齲蝕と永久歯の齲蝕には強い関連が認められ、乳幼児期は基本的歯科保健習慣を身につける時期として非常に重要であり、生涯を通じた歯の健康づくりに対する波及効果も高いと言える。近年、乳歯齲蝕は減少傾向にあると報告されているが、この減少傾向は乳前歯部の齲蝕罹患率が著しく低下したことに起因し、乳臼歯の齲蝕罹患状態は必ずしも楽観を許す状態ではないとの報告もある。乳歯が齲蝕や歯髄炎に罹患した場合には、出来る限り早期に発見し修復、保存していくことで良好な乳歯列咬合状態を確保することができ、その結果、健全な後続永久歯の萌出が誘導される。乳歯齲蝕はミュータンス連鎖球菌により齲窩が形成され、また齲窩にグラム陰性菌が増殖することによって、歯髄炎、歯髄壊死などの症状へと進展する。これらは、プラーク細菌由来リポポリサッカライド(LPS)、マトリックスプロテアーゼ(MMP)などが原因であり、このような炎症時には歯髄において好中球などの免疫担当細胞の浸潤、炎症性サイトカインの産生がみられることが知られている。近年口腔内領域において、歯髄細胞より産生され抗炎症作用を持つ、ATP由来のエネルギー代謝産物アデノシンが注目されている。またアデノシン受容体にはA1、A2a、A2b、A3の4つのサブタイプの存在が報告されているが、その中でもA2a受容体は炎症性サイトカイン刺激により、その発現が上昇すること、また炎症反応や創傷治癒過程に積極的に関与していることが報告されている。また、細菌のみならず熱刺激も歯髄に炎症を惹起する主要因であり、熱刺激から歯髄を保護し、歯髄創傷治癒時に重要なタンパクとなるheat shock protein(HSP)は、そのコントロールについて解明することが歯髄保存に有効であると考えられている。我々は自然免疫系において重要な役割を担うマクロファージの各種機能に関する研究に従事し、マウスマクロファージ様細胞において、LPS刺激によりA2a受容体発現が上昇することを明らかにしてきた。口腔内の炎症疾患について、炎症を惹起する因子と炎症を抑制する因子のバランス解明に興味を持ち、マクロファージに加えて、好中球、樹状細胞、線維芽細胞の炎症応答についても研究対象を拡げ、口腔

内における炎症応答の総合的解明を志向している。また、線維芽細胞様の細胞であるヒト歯髄細胞は様々な細胞への分化能を有することで注目されている。なかでも乳歯歯髄細胞は永久歯歯髄細胞よりも高い増殖能を有することから、組織修復・再生に有用であると考えられている。乳歯歯髄由来細胞は骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞に勝る増殖能、分化能を有していると報告され、同種移植への可能性が示唆されており、世代を超えた移植の可能性についても研究が進められている。さらに採取方法に関しても、歯髄は比較的容易に採取することが可能であるため、今後の臨床応用が期待される細胞である。実際の臨床応用に向けては、細胞を生体内から取り出して*in vitro*で培養、増殖させる必要があるため、*in vitro*での培養条件を整えることは非常に重要であると考えられる。細胞培養の際には、細胞の維持増殖のためにウシ血清(FBS)等の使用が一般的であるが、これらの使用については病原性ウイルスの感染、ロット間での性質の違い、免疫反応など解決すべき問題点が残されている。現在までのところ、国内外の関連研究の中ではアデノシン、HSPの口腔内組織における炎症、特に乳歯歯髄炎への関与に関する研究報告はあまり見られない。このような背景に基づき、本研究では、結合組織の修復、再生、リモデリングに深く関与している乳歯歯髄細胞において、炎症反応の抑制機序を解明および適切な培養条件について検討したい。

## 2. 研究の目的

本研究では、様々な細胞への分化能を有することで注目されているヒト乳歯歯髄細胞において、炎症部位の組織破壊をもたらす種々のサイトカインやMMP、そして抗炎症作用を持つHSPが、どのように関連しているかについて解明し、歯髄炎に対する治療指針の可能性の範囲を拡大させるとともに、幹細胞として有用である歯髄細胞の保存に向けて再生医療への路を拓くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

LPSおよびheat shockを乳歯歯髄由来線維芽細胞に処置した後、細胞形態変化、増殖率および生存率に対する影響について検討を行った。次にLPSおよびheat shockによって特異的に産生量が変動するサイトカインおよびマトリックスプロテアーゼを探索した。サイトカインとしては、炎症性サイトカインである、Interleukin(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、およびIL-12の検討を行い、その他、MMP3、各種HSPの検討を行った。また、乳歯歯髄細胞の培養条件を検討するために無血清培地を用いて培養した際の細胞への影響について検討を行った。そのために以下の実験方法を採用した。

【乳歯歯髄細胞】歯根が2/3以上残存する健全乳歯で、矯正治療のため抜去したものを分

割し、歯髄組織を剥離し、約 2×2 mm の組織片に切り出し、一定時間初期付着を行ったのち増殖してくる細胞を初代培養乳歯歯髄細胞として継代を行った。本研究には 2~8 継代した細胞を用いた。

【MTS assay】LPS および heat shock 処置 (41 15 分) を行い、その後 37 で 1, 3, 24, 72 時間培養した乳歯歯髄細胞の増殖率を MTS assay により吸光度を測定し評価した。

【RT-PCR】LPS および heat shock 処置 (41 15 分) を行い、その後 37 で 1, 3, 24, 72 時間培養した乳歯歯髄細胞の IL-1β、IL-8、IL-6、および IL-12 などの遺伝子変化を RT-PCR により測定した。

#### 【細胞形態の観察】

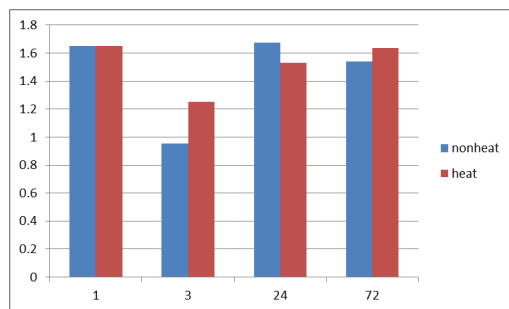
乳歯歯髄由来細胞を無血清培地で 37 3 日間培養を行った後、位相差顕微鏡を用いて観察を行った。

#### 【DNA マイクロアレイ解析】

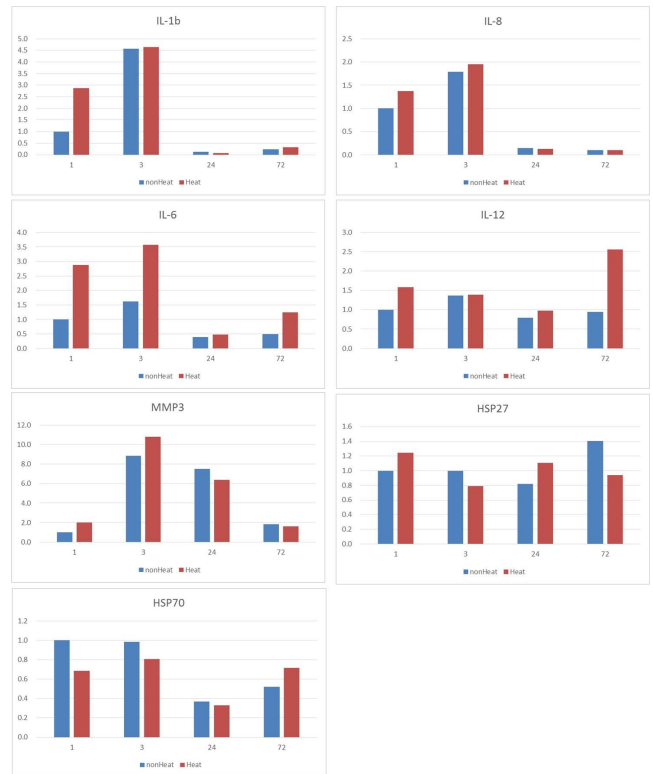
無血清培地を用いて培養した乳歯歯髄細胞の遺伝子発現変化を検討するために、Isogen 試薬を用いて各培養細胞から total RNA を抽出、蛍光色素 Cy3 標識した cRNA を合成し、65 17 時間、マイクロアレイ (Agilent Whole human genome 4×44K) にハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後にマイクロアレイを洗浄し、DNA マイクロアレイスキャナー (Agilent Technologies) により画像を得た。得た画像は GeneSpringGX (Agilent Technologies) を用いてデータの解析を行った。

## 4. 研究成果

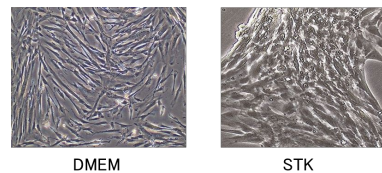
(1) LPS 添加後に Heat shock 処置し、37 で 1, 3, 24, 72 時間培養した結果、細胞増殖能は一時的に低下するものの、72 時間後には回復がみられた。



(2) LPS 添加後に Heat shock 処置し、37 で 1, 3, 24, 72 時間培養した結果、1 時間および 3 時間後で Heat shock を行った細胞の IL-6 発現増加が認められた。また、72 時間後では IL-12 の増加が認められた。HSP70 は 1 時間、3 時間後では熱刺激により発現が減少したが、その後 72 時間後には、熱刺激群で HSP70 の発現増加が認められた。HSP27 については、72 時間後に熱刺激群で発現減少が認められた。



(3) DMEM (10% FBS) にて 3 日間培養を行った細胞は一層で疎らに広がって増殖したのに対し、無血清培地 (STK2) にて培養を行った細胞は、細胞同士が密着し増殖する傾向がみられた。



(4) 遺伝子発現について、gene annotation information、NCBI 等のデータベース、各参考文献を元に、アライアンスバイオシステムの協力を得て「Gene Ontology」により分類を行った。そのなかで、細胞増殖などに関する「cell growth and maintenance」のカテゴリーに着目し、2 倍以上の有意な遺伝子発現増加がみられた上位 30 の遺伝子について示した。

Normalized	Genebank	GeneSymbol	Description
20.1	NM_003881	WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2
17.8	NM_000090	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
15.3	NM_001552	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4
11.8	NM_001007	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked
11.4	NM_000900	MGP	matrix Gla protein
10.9	NM_002009	FGF7	fibroblast growth factor 7
8.1	NM_004598	SPOCK1	sparclocortecoid, cow and kazal-like domains proteoglycan (tescan) 1
7.3	NM_000093	COL5A1	collagen, type V, alpha 1
7.0	NM_003326	TNFSF4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
6.8	NM_000094	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1
6.6	NM_004734	DCLK1	doublecortin-like kinase 1
6.1	NM_024865	NANOG	Nanog homeobox
5.5	NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
5.5	NM_004348	RUNX2	runx-related transcription factor 2
5.5	NM_015719	COL5A3	collagen, type V, alpha 3
4.8	NM_003256	TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
4.8	NM_006208	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
4.7	NM_003713	PPP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B
4.7	NM_005560	LAMA5	laminin, alpha 5
4.3	NM_001012661	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of fibroblast and neutral amino acid transport), member 2
3.9	NM_01083602	PTCH1	patched homolog 1 (Drosophila)
3.9	NM_002615	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1
3.9	NM_004235	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)
3.8	NM_003590	CUL3	cullin 3
3.6	NM_000163	GHR	growth hormone receptor
3.3	NM_01025366	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
3.2	NM_004895	MMP14	matrix metalloproteinase 14
3.0	NM_004122	GHSR	growth hormone secretagogue receptor
3.0	NM_002429	MMP19	matrix metalloproteinase 19
2.9	NM_001204	BMP2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)

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 1 件)

1. Alterations in Deciduous Dental Pulp Cells Cultured with Serum-free Medium  
Kyoko Harada, Saki Kawai, Xu Wen-an, Xu liang, Mie Sonomoto, Yukari Shinonaga, Yoko Abe, Kiyoshi Ohura, Zhao Wanghong and Kenji Arita  
Journal of Hard Tissue Biology 24(1):17-22  
2015 査読有

[学会発表](計 2 件)

1. 乳歯歯髄由来細胞における SSEA-3 発現について  
原田 京子, 河合 咲希, 阿部 洋子, 大東 希好, 有田 憲司  
第 53 回日本小児歯科学会大会  
2015 年 5 月 22 日 広島県広島市(広島国際会議場)

2. Maintenance of undifferentiated state of hDPCs with BIO.  
Harada K, Kawai S, Takeyasu M, Nagata S, Arita K  
46th Meeting of the Continental European Division of the IADR with the Scandinavian Division  
2013 年 9 月 5 日 Florence, Italy (Congress center)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 京子 (HARADA, Kyoko)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 80434794

(2)研究分担者

河合 咲希 (KAWAI, Saki)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 70707067