

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861596

研究課題名(和文) 歯髄細胞が産生する TNF- 誘導因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of a TNF-alpha-inducing factor produced by pulp cells

研究代表者

永安 慎太郎 (Nagayasu, Shintaro)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：60635192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに歯髄線維芽細胞が分泌するタンパク質に絞りマクロファージのTNF- 誘導因子の同定を行ってきた。今回は蛋白以外の候補分子、特に細胞外分泌核酸に焦点を絞り、その同定を進めてきた。大量の培養上清からDNA、mRNAを濃縮・回収しTHP-1に作用させた結果、TNF- 産生誘導能は僅かに存在する程度であった。回収したDNA、mRNA単独では僅かなTNF- 産生誘導能しか存在しなかったが、歯髄細胞から産生されるタンパク質との相互作用によってTHP-1からのTNF- 産生誘導能を増加させる可能性は考えられるため現在検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：We focused on the protein which dental pulp fibroblasts secreted, and we identified TNF- inducing factor of the macrophage so far. This time, the candidate molecules except the protein, in particular, focus on extracellular secretion nucleic acid, it has been promoting its identification. A large amount on the culture supernatant DNA and mRNA was concentrated and recovered a result of the action in THP-1, TNF- production-inducing ability was the degree to which the presence slightly. The recovered nucleic acids, there is a possibility of increasing the TNF- production inducing ability by interaction with the proteins produced from pulp cells, it is currently considering.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯髄細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

抜髄後は歯根破折や二次カリエスなどのリスクが高まることから、無髄歯が有髄歯より長期予後が悪いのはよく知られている事実である。強い疼痛を伴う不可逆的歯髄炎に抜髄処置を選択することは当然であるが、一方で歯髄充血や、歯髄充血から単純性歯髄炎への移行期などの可逆的・軽微な炎症時には可及的に歯髄保存的処置を選択することは歯の寿命を延長するうえで重要な要素である。歯髄炎に限らず炎症の初期反応では、患部に樹状細胞やマクロファージなどの炎症性細胞浸潤が認められ、炎症の成立に重要な役割を果たしていると考えられている。特にマクロファージが産生する炎症性サイトカインは炎症反応カスケードの最上流に位置すると考えられており、他の免疫細胞の活性化や分化などの機能調節を担っている。また、肥満者の脂肪組織における脂肪細胞や糖尿病性腎症患者の糸球体メサンギウム細胞などでは、組織に浸潤してきたマクロファージとこれら細胞とが液性因子を介して相互作用し、炎症の慢性化と増悪に寄与していることが近年の *in vivo* を想定した共培養システムで明らかとなってきている (Yamashita A, et al., obesity, 2007.)。一方、歯髄組織は一旦炎症が起こると不可逆的变化に陥りやすく、閉鎖空間であるという解剖学的形態を考慮しても、歯髄組織中の主たる細胞である歯髄線維芽細胞がマクロファージと相互作用し歯髄組織特有の炎症の成立に寄与している可能性が考えられる。そこで申請者が所属する研究室では、これまでに歯髄炎を想定した「歯髄細胞とマクロファージの共培養系」を確立し単培養と比較して共培養系では、炎症性サイトカイン産生性が相乗的に亢進することを明らかにしてきた (Yonehiro J, et al., *Int Endod J*, 2012.)。

2. 研究の目的

マクロファージが産生する炎症性サイトカインの中でも、TNF- α は非常に強力な前炎症性サイトカインとして知られ、一連のサイトカインネットワークの最上流に位置するとも言われている。そこで申請者はこれまでの当研究室の研究を発展させ、TNF- α 産生誘導分子を歯髄細胞が特異的に産生し、その液性因子が炎症早期に歯髄患部への走化性を誘導し、更には浸潤してきたマクロファージでの TNF- α などの炎症性サイトカイン産生・分泌を亢進させることで、歯髄組織では炎症が短期間に急性化するのではと仮説を立てた。そこで不死化ヒト歯髄細胞、ヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯根膜線維芽細胞の培養上清をマクロファージに添加し、歯髄細胞の上清を添加したときのみマクロファージから TNF- α の産生誘導が生じることを先行研究にて確認した (第 137 回日本歯科保存学会, 2012.)。さらに歯髄細胞と歯肉線維芽細胞間でのマイクロアレイを用いた遺伝子発

現解析及び歯髄細胞培養上清中のタンパク質網羅的解析から、いくつかの TNF- α 産生誘導タンパク質の候補を同定している。また、興味深いことに、歯髄細胞培養上清を非特異的なタンパク質分解酵素である proteinase-K で処理した後にマクロファージ上清に添加すると、その TNF- α 産生性は優位に低下するものの、非処理と比較して 50%程度の低下に留まることが明らかとなった。尚、この proteinase-K 処理で培養上清中のタンパク質が完全に分解されることを銀染色法にて確認している。上記研究結果から、TNF- α 産生誘導分子は一般的に想定されるタンパク質のみではなく、核酸や脂質など、タンパク質やペプチド以外の歯髄細胞からの分泌因子もマクロファージに作用し、TNF- α 産生誘導に寄与している可能性が強く示唆された。そこで歯髄細胞がタンパク質以外の因子、特に核酸を介してマクロファージから TNF- α の産生誘導を起こしているのでは考えるに至った。歯髄線維芽細胞の培養上清中の TNF- α 誘導因子として主にタンパク質に着目して同定を行ってきたが、培養上清中には他に核酸、脂質なども存在しマクロファージの活性に影響を与えていると考えられる。実際に、マクロファージ上に発現する Toll-like receptors はウイルス DNA やウイルス RNA を認識し NF- κ B の活性化を介してマクロファージからのサイトカイン産生を誘導する (Barbara S et al., *J Immunol* 2003.)。つまり、タンパク質のみならず複数の因子が作用することで TNF- α の産生誘導が生じていることが予想できる。そこで、1) 歯髄細胞培養上清中のタンパク質以外特に DNA, RNA に焦点を絞り、マクロファージに対する TNF- α 誘導因子の同定を行い、2) さらにそれぞれの候補因子を組み合わせた場合の相互作用についても検討を行う。候補因子が同定できた段階で 3) その詳細な分子機序を解明することで、歯髄炎症の発症機序を解明し、将来的にはその制御を可能にすることを目標とする。更には、TNF- α が関連するあらゆる疾患の制御を目的とした分子標的療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

【平成 26 年度】

不死化歯髄細胞、歯髄線維芽細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞をコンフルエントまで培養し、その後非血清の調整培地に交換、24 時間後にその上清を回収する。不死化歯髄細胞の性状は (Kamata N et al., *J Oral Pathol Med*, 2004.) に記載

Proteinase-K 同様に、mRNA や DNA に TNF- α 産生能があるか否かを結論付けるのに最も簡便で結論の導きやすい方法は、RNase または DNase を回収した培養上清に直接添加、処理後に活性が維持されるのかを検討する事であるが、Proteinase-K と比較して RNase または DNase は高価でまたその分解活性には高濃度を必要とするため非現実的

である。そこで、培養上清からの mRNA の回収は、Oligo(dT)25 をコートした磁気ビーズ(Dynabeads, Life and Technologies)を回収した培養上清と混合させ、培養上清中に微量に存在する RNA を濃縮・回収する。死細胞から放出された偽分泌 mRNA のコンタミネーションを避けるために、細胞上清の回収は無血清調整培地に交換後 24 時間のみとする。

培養上清からの DNA の回収は、溶液からの DNA 回収用にデザインされた磁気ビーズ(63006 Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal) を回収した培養上清と混合させ、培養上清中に微量に存在する DNA を濃縮・回収する。RNA 同様に、死細胞から放出された偽分泌 DNA のコンタミネーションを避けるために、細胞上清の回収は無血清調整培地に交換後 24 時間のみとする。

回収した mRNA 及び DNA をそれぞれ無血清標準培地に混合し、マクロファージをこの培地で 24 時間培養する。24 時間の形態変化を観察、記録すると共に、24 時間後の上清を回収し、上清内の TNF- α 量を ELISA (Bio-Rad) にて検討し、歯髄線維芽細胞培養上清から得られた mRNA または DNA に TNF- α 産生能があるかを検討する。

mRNA または DNA にマクロファージにおける TNF- α 産生能が認められた場合には、その責任配列を同定する。mRNA の場合には、コントロールとして用いる歯肉線維芽細胞培養上清から同様の方法で単離した mRNA との発現比較をマイクロアレイ (Genechip, affymetrix) にて解析する。そして、歯髄線維芽細胞培養上清に高分泌される mRNA について、通常に従い cDNA に逆転写した後に、制限酵素サイトのついた PCR プライマーで目的配列を増幅し pBluescript-SK(+) vector にライゲーションする。その後、このベクターの T3 または T7 RNA プロモーターを利用し、目的 RNA を大量に精製する。その後、得られた RNA を無血清標準培地に加えマクロファージを刺激し、その目的配列が TNF- α 産生能を誘導する責任配列であるかを検討する。一方、DNA にマクロファージにおける TNF- α 産生能が認められた場合には、mRNA のように既知配列をターゲットとしたマイクロアレイ解析方が確立されていないため、サブトラクション法 (PCR-select Bacterial Genome Subtraction Kit, Clontech Laboratories, Inc.) を用いる。コントロールとして用いる歯肉線維芽細胞培養上清から同様の方法で単離した DNA を基準に差し引きし、歯髄線維芽細胞培養上に特異的に存在する genomic DNA を抽出、増幅する。配列をシークエンスにて同定後、増幅した目的配列にて mRNA 同様にマクロファージを刺激し、責任配列であるかを検討する。

【平成 27 年度】

候補となった核酸と先行研究で同定したタンパク質をそれぞれマクロファージの培養上清に添加し、マクロファージからの

TNF- α 産生の違いを比較検討する。(相互作用の確認)

同定核酸のマクロファージにおけるパスウェイ解析

一般的にマクロファージにおいて細胞膜上の受容体 Toll-like receptor (TLR) 2 や TLR 4 に Lipopolysaccharide (LPS) 等のリガンドが結合し、細胞内伝達シグナルが活性化され NF κ -B を介して、TNF- α の転写・翻訳・産生が誘導される。同定した核酸による TNF- α 誘導がどのようなシグナルパスウェイを介するのかを NF κ -B 特異的阻害剤及び TLR-2、4 の中和抗体を用いて検討する。また、特に同定核酸が mRNA であった場合、一般的に全長は数千 bp であるので、細胞膜や細胞質に受容体は存在せず、直接マクロファージの核内に取り込まれて転写されている可能性を考えている。そこで、同定した mRNA または DNA を cy3 または cy5 で標識し、マクロファージ上清中に添加し、経時的にその細胞内への取り込みを解析することで、その受容体が細胞膜上、細胞質内、核内かを併せて検討する。

4. 研究成果

申請者のグループは、これまでに歯髄線維芽細胞が分泌するタンパク質に絞りマクロファージの TNF- α 誘導因子の同定を行ってきたが、今回は蛋白以外の候補分子、特に細胞外分泌核酸に焦点を絞り、その同定を進めてきた。具体的には歯髄線維芽細胞の培養上清中に存在する分泌核酸を、磁気ビーズを用いて回収しマクロファージ培養上清に添加しマクロファージによる TNF- α 産生が誘導されるかを検討した。回収した DNA、mRNA を THP-1 に作用させた結果 TNF- α 産生誘導能は僅かに存在する程度であったため、さらに大量の培養上清から DNA、mRNA を濃縮・回収を行って同様の実験を行ったが結果に大きな差はなかった。回収した DNA、mRNA 単独では僅かな TNF- α 産生誘導能しか存在しなかったが、歯髄細胞から産生されるタンパク質との相互作用によって THP-1 からの TNF- α 産生誘導能を増加させる可能性は考えられる。我々の研究室では歯髄細胞系の細胞に共通して高発現していた一連の分子群の中からいくつかの候補タンパク質の同定に成功しているため、それらのタンパク質と今回の実験で回収した細胞外分泌核酸との相互作用について現在検討を行っている。更に、歯髄細胞から分泌されるエキソソーム内に目的 mRNA や DNA を含む核酸物質が内包されてマクロファージへと受け渡されている可能性も考えられる。この可能性を考え、超遠心分離法にシヨ糖クッション溶液を組み合わせ培養上清中からエキソソームを他の小胞体や粒子から分離・回収し THP-1 に作用させることで、THP-1 からの TNF- α 産生に影響を与えるかどうかを現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

The Inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiyama A, Nagasaka S, Nishimura F. Nephrol Dial Transplant. 2014.Mar;29(3):611-8 .(査読有り).

〔学会発表〕(計2件)

永安慎太郎、鈴木茂樹、小武家誠司、柴秀樹 歯髄細胞が産生する TNF- α 誘導因子の探索 第143回日本歯科保存学会学術大会 東京 12,13 Nov 2015.

永安慎太郎、鈴木茂樹、星野博昭、小武家誠司、本山智得、西村英紀 Matrix trioxide aggregate (MTA) の歯髄細胞接着・増殖・アポトーシスに及ぼす効果の検討 第141回日本歯科保存学会学術大会 山形 30,31 Oct 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

永安 慎太郎(NAGAYASU SHINTARO)
広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教
研究者番号：60635192