

## 論 文 要 旨

**Anandamide Induces Matrix Metalloproteinase-2 Production Through Cannabinoid-1 Receptor and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Human Dental Pulp Cells in Culture**

ヒト歯髄細胞培養系においてアナンダマイドは Cannabinoid-1 Receptor、Transient Receptor Potential Vanilloid-1 を介して MMP-2 を産生する

宮下 桂子

**【序論および目的】**

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は細胞外マトリックスを分解する酵素で、様々な炎症性の疾患において重要な役割を果たすと考えられている。歯髄炎においては、MMP-2、-8、-9 の発現が上昇することが、また根尖病変においては MMP-1、-2、-8 および -9 のポジティブ細胞の割合の増加が報告されている。これらのことより MMP-2 を含む MMPs が、歯髄炎や根尖病変の発症に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。

アナンダマイド (AEA) は生体内脂質メディエーターである内因性カンナビノイドのひとつであり、鎮痛作用のみならず、免疫調節、炎症、細胞浸潤など様々な作用を持つことが知られている。AEA のレセプターとしては、カンナビノイド (CB) レセプター (CB1、CB2) と TRPV1 が知られており、これまで歯髄組織の神経線維に CB1 と TRPV1 の発現が、さらにヒト培養歯髄細胞では TRPV1 の発現が報告されている。

種々の細胞において AEA やそのアナログが MMP-2 の産生を誘導すること、もしくは抑制することが知られているが、歯髄細胞における AEA と MMP-2 の関連についての報告はこれまでない。そこで本研究では、ヒト培養歯髄細胞における AEA の MMP-2 産生における作用とそのシグナル経路について研究した。

**【材料および方法】**

1. ヒト歯髄細胞を、D-MEM (10% ウシ胎児血清含有) でコンフルエントになるまで培養後、1% ウシ胎児血清含有 D-MEM で 24 時間前培養したものを以下の実験に使用した。
2. AEA 刺激による上清中の MMP-2 発現をウェスタンブロット、ELISA 法にて確認した。
3. ヒト培養歯髄細胞における CB1、CB2、TRPV1 の発現をウェスタンブロット法にて検討した。
4. ヒト培養歯髄細胞を CB1、CB2、TRPV1 のアンタゴニストを用いて前処理した後 AEA で刺激し、MMP-2 産生の阻害の有無をウェスタンブロット法にて検討した。さらに AEA 刺激時の MMP-2 産生への関与が示唆された CB1、TRPV1 については siRNA にて knockdown し、その影響を確認した。
5. ヒト培養歯髄細胞を AEA で刺激した時の MAPK (ERK1/2、JNK、p38MAPK) の活性化をウェス

タンブロット法にて確認した。さらに AEA 刺激による MMP-2 発現に対する MAPK 阻害剤 (U0126、SB203580、SP600125) の影響をウェスタンブロット法にて確認した。

### 【結果】

1. ヒト培養歯髄細胞において AEA は時間、濃度依存的に MMP-2 産生を誘導した。
2. ヒト培養歯髄細胞における CB1、CB2、TRPV1 の発現をウェスタンブロット法にて確認した。
3. ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は CB1 および TRPV1 のアンタゴニストにより抑制された。また、siRNA による knockdown 実験でも同様の結果が得られた。
4. ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は主として JNK の阻害剤で抑制された。

### 【結論及び考察】

これまで CB1 は中枢および末梢神経系に、CB2 は末梢の免疫系の細胞に発現していることが報告されている。神経終末において CB1 は神経伝達物質の放出を抑制し、CB2 は免疫系の細胞においてサイトカインの放出を調節している。一方、イオンチャネル型受容体である TRPV1 は主に中枢神経系に認められ、機械、温熱、化学などの侵害刺激を感知する。本研究において、ヒト培養歯髄細胞において 3 種の AEA レセプターの発現を確認したが、ヒト培養歯髄細胞における CB2 発現の報告は今回が初めてである。本研究により、ヒト培養歯髄細胞における AEA の MMP-2 産生の誘導は CB1、TRPV1 を介したものであることが示された。

これまで AEA と MMP-2 産生に関連した報告はいくつかあるが、胃ガンでは CB1/CB2 アゴニストにより MMP-2 産生は抑制され、一方、肝臓では CB2 アゴニストにより MMP-2 産生が著しく増加するとされており、このような AEA による MMP-2 産生の誘導に関する相違は AEA の標的細胞やレセプターの違いに依るものであると考えられる。

さらに本研究により、ヒト培養歯髄細胞において AEA 刺激による MMP-2 の誘導には主として JNK が関与することが示唆されたが、これは、ヒト内皮細胞において angiotensin II が誘導する MMP-2 産生に JNK が不可欠であるというこれまでの報告と一致する。

今回の研究結果は、ヒト培養歯髄細胞において AEA が CB1、TRPV1、さらには主として JNK を介して MMP-2 産生を誘導することを初めて明らかにしたものである。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 183 号	学位申請者	宮下 桂子
審査委員	主査	野口 和行	学位
	副査	中村 典史	副査
	副査	橋口 照人	副査

**Anandamide Induces Matrix Metalloproteinase-2 Production Through  
Cannabinoid-1 Receptor and Transient Receptor Potential Vanilloid-1 in Human  
Dental Pulp Cells in Culture**

(ヒト歯髄細胞培養系においてアナンダマイドは Cannabinoid-1 Receptor,  
Transient Receptor Potential Vanilloid-1 を介して MMP-2 を産生する)

アナンダマイド (AEA) は、内因性カンナビノイドの一種であり、生体内脂質メディエーター、神経伝達物質の一種として作用する。AEA は CB1、CB2 受容体と、カプサイシン受容体である Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (TRPV1) を介して、生体内において多彩な作用を発揮する。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は細胞外基質タンパクを分解する酵素で、種々の細胞において AEA が MMP-2 の産生に関与することが知られているが、歯髄細胞における AEA と MMP-2 の関連についての報告はこれまでない。学位申請者は、ヒト培養歯髄細胞における AEA による MMP-2 の産生誘導について検討した。便宜抜去した歯の歯髄から歯髄細胞を培養し、AEA 刺激後の培養上清中の MMP-2 量を Western blot 法および ELISA 法を用いて調べた。また、ヒト培養歯髄細胞における AEA の受容体の発現を調べ、それらのアンタゴニストおよび siRNA を用いて MMP-2 産生における各種受容体の役割を解析した。さらに AEA 刺激による MAPKs の活性化を調べ、種々の MAPKs 阻害剤を用いて AEA 刺激による MMP-2 産生におけるシグナル経路について検討した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) ヒト培養歯髄細胞において AEA は 濃度依存性に、また時間依存性に MMP-2 の産生を誘導した。
- 2) ヒト培養歯髄細胞において AEA の受容体 CB1、CB2、TRPV1 の発現が認められた。
- 3) ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は、CB1 および TRPV1 アンタゴニストにより抑制された。さらに CB1 および TRPV1 に対する siRNA による実験でも同様の結果が得られた。
- 4) ヒト培養歯髄細胞において AEA が誘導する MMP-2 産生は、ERK1/2 阻害剤 (U0126)、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580)、JNK 阻害剤 (SP600125) で抑制が認められたが、JNK 阻害剤 (SP600125) で著しく抑制された。

本研究は、歯髄炎において MMP-2 産生が有意に増加するというこれまでの報告、さらに気道の炎症の程度と肺胞液中の AEA の濃度が相関するという近年の報告より、AEA により誘導された MMP-2 が歯髄炎時の組織破壊に関連するというメカニズムを想定しているが、AEA と歯髄炎の直接的な関連を示すには、今後さらなる研究が必要である。しかしながら、本研究では、ヒト培養歯髄細胞において AEA 受容体 (CB1、CB2、TRPV1) の発現を明らかにし、AEA が CB1 および TRPV1 を介して 主に JNK 依存性に MMP-2 産生を誘導することを初めて明らかにしたものであり、歯髄炎の発症メカニズム解明の端緒となり得るという点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 183 号	学位申請者	宮下 桂子
審査委員	主査	野口 和行	学位 博士 (歯学)
	副査	中村 典史	副査 田松 裕一
	副査	橋口 照人	副査 山口 泰平
<p>主査および副査の 5 名は、平成 24 年 3 月 9 日、学位申請者 宮下 桂子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行なった。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 歯髓細胞とはどのような種類の細胞になるのか？  (回答) 今回用いた細胞は、矯正学的理由で便宜抜歯した歯から採取したのになります。形態的には線維芽細胞様のもので、しかしながら、細胞に特異的なマーカーを用いた characterization は行なっておりません。</p> <p>質問 2) 炎症を伴う歯由来の歯髓から採取したものではないということか。  (回答) そうです。</p> <p>質問 3) 炎症が起こった時、AEA は歯髓のどこから出てくるのか？  (回答) 歯髓は血管が豊富な組織であり、血小板やマクロファージなどから産生されると考えられます。</p> <p>質問 4) MMP-2 の作用は細胞外基質の分解だが、歯髓細胞が産生する MMP-2 の意義はどのようなものであると考えるか？  (回答) 今回、AEA が誘導する MMP-2 が歯髓組織中でどのような役割を持っているかについての明らかな知見は得られておりません。AEA が誘導する MMP-2 は組織破壊のみならずモデリングにも働いている可能性も考えられます。</p> <p>質問 5) 採取した歯髓には様々な細胞が混在していると考えられるが、CB1, CB2 と TRPV1 の発現は homogeneous な同一の細胞が発現しているのか？用いた歯髓細胞の免疫染色による確認が必要ではなかったか。  (回答) 今回、歯髓細胞の characterization を行なったデータを示すことはできませんでした。歯髓組織切片に対して免疫組織染色を行なったのですが、確証できるデータを得ることができませんでした。今回の研究に使用した培養歯髓細胞については行っていないので、今後、検討していきたいと考えております。</p> <p>質問 6) MMP-2 に着目したのはなぜか？  (回答) 歯髓炎や根尖性歯周炎で MMP-1, -2, -3 と -9 が上昇していることが報告されていますが、MMP-1 と -9 は AEA にて誘導されませんでした。MMP-3 は AEA により誘導されますが、MMP-2 ほどには誘導はかかりませんでした。</p> <p>質問 7) CB1 と TRPV1 に対する siRNA を用いているが、レセプターの発現が siRNA により阻害されていることを確認しているか？  (回答) 今回の実験ではレセプターの発現が抑制されることを確認しておりません。ご指摘のとおり確認するべきでした。</p> <p>質問 8) 今回の結果は <i>in vivo</i> においてどの程度反映できるか？  (回答) 現在報告されている生体内における AEA の濃度の多くは nM オーダーです。今回の実験で用いた AEA の濃度は <math>\mu\text{M}</math> オーダーではありますが、歯周病患者において歯肉溝浸出液では <math>\mu\text{M}</math> オーダーで検出されていると報告されています。今後、歯髓組織(炎症歯髓と健康歯髓)中の AEA の濃度について検討していきたいと考えます。</p> <p>質問 9) 今回、6-10 代の歯髓細胞を用いているが、継代によって細胞が形質転換した可能性はないのか？  (回答) 形態的観察のうえでは、変化はありませんでした。</p> <p>質問 10) AEA の濃度を 10 <math>\mu\text{M}</math> の高濃度にて刺激しているが、歯髓細胞は AEA に耐性を持っているとは考えられないか？</p>			

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 他の歯髄細胞を同じ AEA 濃度で刺激した場合でも、MMP-2 の産生誘導を認めました。また MTT アッセイにより生存能にも影響は認められませんでした。

質問 11) TRPV1 は温熱受容体でもあるが、この細胞を TRPV1 にシグナルが入る 43 度で刺激して MMP-2 の産生が増強するという実験を行なっているか？

(回答) 今後検討したいと考えます。

質問 12) 歯髄組織中における MMP-2 の発現誘導経路は AEA-CB1/TRPV1-MAPK の他に何が考えられるか？

(回答) MMP-2 の発現については、炎症性サイトカインである IL-1、-6 や TNF- $\alpha$  などにより誘導され、AEA よりも強い誘導がかかるものと考えられます。

質問 13) ウェスタンブロットで観察される 72 kDa のバンドは不活性型 MMP-2 であるが、62 kDa の活性型のバンドは検出したか？活性型を検出する抗体を用いたり、Zymography で MMP-2 の活性を調べた方がよかったですのではないか？

(回答) 今回使用した抗体では、72 kDa のバンドのみが検出されました。MMP-2 の活性を検討するべきであるというご指摘については今後、検討していきたいと思えます。

質問 14) AEA が誘導する MMP-2 産生の誘導というのは歯髄に特異的な現象なのか？

(回答) 他の組織でも起こるものと考えられます。

質問 15) 論文中 Fig. 1C の AEA が経時的に MMP-2 産生を誘導することを示すデータでは刺激時間 0 ではなく、無刺激で同じ時間培養した上清をコントロールとすべきだったのではないか。また、siRNA を用いた実験では scramble siRNA を単独ではなく、AEA 刺激と共存させるべきだったのではないか。

(回答) ご指摘のとおりです。

質問 16) 今回のウェスタンブロットの結果はバンドの写真のみだが、定量化は行なわなかったのか？

(回答) 論文では示していませんが、バンドの定量化を行ない、MMP-2 の産生量の変化を確認しました。

質問 17) 今回の統計処理は student's *t*-test によるものであるが、ANOVA を行なった後で post-hoc test をするべきではないのか？

(回答) ご指摘のとおりです。多重比較検定を行なったところ有意差があることは確認しました。

質問 18) まずは炎症歯髄における AEA の量を最初に測定するべきだったのではないか。また転写レベルでの現象も検討しておくべきだったのではないか。さらに TIMP の産生も調べるべきだったのではないのか。

(回答) ご指摘のとおりです。炎症歯髄における AEA の量については我々の研究室で以前測定を行い、健康歯髄と比較して増加するという傾向は確認しました。今後さらにサンプル数を増やし、データの精度を上げたいと考えております。

質問 19) レセプターの関与を確認するためにレセプターアンタゴニストと siRNA の両方の実験を行なっているが、その理由は何か？

(回答) 今回、異なった方法によってレセプターを阻害し、同じ結果を得ることによって実験自体の質を上げようと思図しました。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。