

ヒト歯髄における Macrophage migration inhibitory factor  
および C-X-C chemokine receptor-4 の発現と  
Prostaglandin E<sub>2</sub> 産生による炎症促進作用の検討

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

渡邊 昂洋

(指導：松島 潔 教授)

## <要旨>

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) はリンパ球により産生され、好中球や好酸球の浸潤を促す遊走能やマクロファージの機能を制御する働きを有するケモカインとして同定された。現在では様々な組織の細胞において発現が確認されており、ケモカインとしての作用に加え、炎症局所でサイトカインやケミカルメディエーター産生をも担う因子である可能性があり、注目されている。

歯髄は象牙質に囲まれ、周囲組織との交通は根尖孔のみという閉鎖的な空間にあり、ひとたび歯髄炎が惹起されると治癒機転が働きにくく、不可逆性の経過をたどることが多い。歯髄の防御反応として修復象牙質の形成が挙げられるが、ある程度の炎症状態は修復象牙質の形成に有利に働くという報告もある。そこで、炎症における破壊と修復という一連のプロセスに関与する因子として Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) に着目し、MIF が炎症状態にある歯髄組織に発現し、cyclooxygenase (COX) -2 を介した PGE<sub>2</sub> 産生に関与しているのではないかと仮定した。

本研究では、齶蝕を有した抜去歯を用いた歯髄組織の免疫組織化学染色および蛍光免疫組織染色において、炎症性細胞の浸潤を認め、炎症が惹起されている部位に局限して抗 MIF 抗体陽性の歯髄線維芽細胞を認めた。さらに、抗 MIF 抗体陽性の歯髄線維芽細胞では MIF のレセプターの一つである C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4) の局在が認められた。また、ヒト歯髄培養細胞において、MIF の添加により COX-2 遺伝子発現量が用量・時間依存的に増加し、その効果は CXCR4 阻害剤である WZ811 で抑制された。同様に MIF は COX-2 タンパク質量も増加させたが、その効果は WZ811 によって抑制された。さらに、MIF の添加により培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は増加し、その効果は WZ811 によって抑制された。

以上の結果から、炎症性の侵害刺激によりヒト歯髄組織において MIF と CXCR4 の発現が認められた。さらに MIF がパラクリン様効果により歯髄線維芽細胞に作用し、CXCR4 の受容体を介して COX-2 発現を促進し、PGE<sub>2</sub> の産生を引き起こすことで歯髄炎の進展に関与す

る可能性が示唆された.

#### <諸言>

歯髄は象牙質に囲まれ、周囲組織との交通は根尖孔からのみという閉鎖的な空間にあり、ひとたび歯髄炎が惹起されると治癒機転が働きにくく、不可逆性の経過を辿ることが多い。一般的に不可逆性の歯髄炎には歯髄除去療法が適応されるが、失活歯の予後は生活歯に比べて不良であり、また機能歯数の減少が認知症の発症さらには寿命にまで影響を与える<sup>1)</sup>ことが明らかになっており、歯髄保存のニーズは高まるばかりである。近年、多分化能を有する幹細胞や、成長因子を用いた組織再生療法の研究・臨床応用が急速に進む一方で、炎症を起こしている歯髄における細胞機能の特性はまだ不明な点が多いのが現状である。

生体は自己の恒常性を保つため、内外から作用した障害因子に対する防御・修復機能を有し、その一つに炎症がある。炎症の成立には、好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞が組織障害の起きている局所に遊走することが必須であり、炎症の進展は接着分子、細胞外マトリックスや matrix metalloproteinase (MMP) に代表される分解酵素のほかに、走化因子であるケモカインなど種々の分子の相互作用によって制御されている<sup>2)</sup>。齶蝕などによって生じた歯髄炎では、他の組織と同様に好中球やマクロファージの組織浸潤が認められ<sup>3)</sup>、齶蝕深部に生存する細菌刺激によってインターロイキン-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ; IL-1 $\beta$ )、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor; TNF) といった炎症性サイトカインの産生を引き起こし<sup>4,5)</sup>、それらの炎症性サイトカインは、ヒト歯髄細胞において Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生に重要な酵素である cyclooxygenase (COX) -2 mRNA およびタンパク質発現を刺激する<sup>6)</sup>。PGE<sub>2</sub> に代表されるプロスタノイドは歯髄の炎症、修復過程を調節する最も重要な因子の一つであり<sup>7)</sup>、炎症歯髄では正常歯髄に比べ PGE<sub>2</sub> 量が有意に増加すること<sup>8)</sup>も示されている。さらに、炎症歯髄組織もしくは炎症性サイトカインや細菌由来ペプチドグリカンを作用させた歯髄線維芽細胞では IL-8 や C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) -10, cysteine motif chemokine

ligand (CCL) -20 などのケモカインの発現が促進され、免疫応答に寄与している<sup>9,10)</sup> という報告からも炎症性メディエーターやケモカインは歯髄における炎症機転で重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、歯髄における炎症反応をより深く解明することは、予防的または修復的処置の開発を加速させる可能性がある。

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) はリンパ球によって産生され、好中球や好酸球の浸潤を促す遊走能やマクロファージの機能を制御する働きを有するケモカインとして同定された。しかしながら、現在では線維芽細胞や上皮細胞など全身の様々な細胞においても発現が確認され<sup>11)</sup>、関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞における MMP-1, -3 発現の促進<sup>12)</sup>、interleukin (IL) -8 の分泌促進による炎症性サイトカイン様の作用<sup>13)</sup>、グルココルチコイドによる抗炎症作用の減弱作用<sup>14)</sup>等を有することが明らかとなっている。さらに、MIF が phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の活性化によるアラキドン酸の遊離促進や、COX-2 の発現を促進させることがマウス線維芽細胞を用いた研究において報告<sup>15,16)</sup>されており、MIF は免疫担当細胞のコントロールだけでなく、炎症局所でサイトカインやケミカルメディエーター産生を促進する可能性が示唆されている。また、慢性歯周炎患者の唾液および歯肉溝滲出液では健常者に比べ MIF 量が増加していること<sup>17)</sup>や、LPS を作用させた歯髄培養細胞では MIF の発現が増強し、さらに MIF が歯髄培養細胞の増殖に関与することが報告<sup>18)</sup>され、MIF の口腔領域における炎症への関与を示唆する報告が散見されるが、詳細な生理学的意義は不明である。

そこで本研究は、歯髄炎の進展に関わるであろう MIF とその受容体の一つとして報告されている C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4) の局在と、MIF の PGE<sub>2</sub> 産生機構についての検討を行った。

## <材料と方法>

### 1. 組織切片の作製

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認 (承認番号 : EC19-19-003-1 号) に基づき, 日本大学松戸歯学部附属病院に治療のために来院し, 10-20 歳代の男女 4 名の患者の臨床的に急性全部性歯髄炎と診断され, 抜歯となった第三大臼歯を試料とした. 抜歯後, 試料を直ちに 4% パラホルムアルデヒド固定液で 3 日間固定し, その後 0.5 M EDTA で 4 週間脱灰を行った. 脱灰組織を一連の段階的エタノールおよびキシレンを通して処理し, パラフィン中に包埋した. ミクロトームにて厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作製し, スライドガラスにマウントした.

### 2. 免疫組織化学染色

パラフィン切片を脱パラフィン化し再水和した後, 抗原賦活化のために 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 10 分間煮沸した. 酵素抗体法では, メタノール中の 3% $\text{H}_2\text{O}_2$  と共に 30 分間インキュベートして内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した. 0.1% PBST (PBS + Tween 20) で洗浄した後, 切片を一次抗体として rabbit anti-MIF antibody (1:200, ab7207, abcam, Cambridge, UK) を含む湿潤チャンバー内で室温にて 30 分間反応させた. 次いで二次抗体 Dako REAL<sup>TM</sup> EnVision<sup>TM</sup>/HRP, Rabbit/Mouse (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) で 30 分間処理し, 最後に切片を Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) を用いて可視化した後, マイヤーのヘマトキシリンで対比染色した. 陰性対照は一次抗体なしで処理した.

蛍光抗体法では, 0.1% PBST で洗浄した後, 切片を一次抗体として rabbit anti-MIF antibody (1/200), Goat anti-CXCR4 antibody (1:200, ab1670, abcam, Cambridge, UK) を含む湿潤チャンバー中で室温にて 30 分間反応させた. 次いで二次抗体 F (ab')<sub>2</sub>-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546<sup>®</sup> (1/1500, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), Donkey Anti-Goat IgG H & L Alexa Fluor 488<sup>®</sup> (1/1500, abcam, Cambridge, UK) で切片を

30 分間処理した。自家蛍光抑制のため Vector True VIEW Autofluorescence Quenching Kit (Vector, CA, USA) で 5 分間処理後、封入し、生物蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX51; Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

### 3. 歯髄細胞の培養

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認 (承認番号 : EC19-19-003-1 号) に基づき、日本大学松戸歯学部付属病院に治療のために来院し、矯正治療の目的で抜去された 10-20 歳代の男女 4 名の患者の健康な第三大臼歯から歯髄を無菌的に取り出した。取り出した歯髄は神尾らの方法<sup>19)</sup> に基づき、PBS で十分に洗浄した後、約 2 mm 角に細切し、組織片を 35 mm culture dish に静置後、10% 牛胎児血清 (foetal bovine serum; FBS, GIBCO BRL Life Technologies, Tokyo, Japan), 100 µg/ml penicillin G (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) を添加した  $\alpha$ -essential medium ( $\alpha$ -MEM, GIBCO BRL Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 気相下にて out growth させた。細胞がコンフルエントに達した時点で 0.05% trypsin (GIBCO BRL Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて回収し、5 から 9 代継代培養したものをヒト歯髄培養細胞とした。

### 4. 全 RNA の抽出

ヒト歯髄培養細胞を 10 cm culture dish で  $1 \times 10^6$  個/dish で播種し、添加 24 時間前に 1% FBS 含有  $\alpha$ -MEM に交換した。MIF (GF180, Merck Millipore, DE, USA) 添加後、細胞より全 RNA を RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した。MIF を添加しない歯髄細胞の RNA をコントロールとした。得られた全 RNA の純度は 260 nm と 280 nm の比で測定した。CXCR4 への阻害実験は MIF 添加 60 分前に CXCR4 阻害剤である WZ811<sup>20)</sup> (1,4-Benzenedimethanamine, N1, N4-di-2-pyridinyl-, Selleck Chemicals, TX, USA) で処理した後、MIF を作用させた。

## 5. 遺伝子発現解析

reverse transcription PCR (RT-PCR) 法は One step RT-PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して全 RNA および DNA プライマー (COX-2 および glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) を添加し, 逆転写反応および RT-PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて行った. 用いた DNA プライマーの塩基配列は以下の Table 1 に示した. RT-PCR の反応条件は, 50°C 30 分にて逆転写反応を行い, cDNA を合成し, 95°C 15 分にて HotStar Taq DNA polymerase の活性化を行った. 次いで DNA 変性を 94°C 30 秒, アニーリングを 55°C 30 秒, 伸長反応を 72°C 30 秒行い, これを 1 cycle として 28 cycle 行った後, 最終伸長反応を 72°C 10 分間行った. PCR 合成産物は 2% アガロースゲルで電気泳動を行った後, エチジウムブロマイド染色を行い, 紫外線照射下にて確認した.

Real-time PCR 法は One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR KIT II Perfect Real Time (TaKaRa, Shiga, Japan) に全 RNA および DNA プライマー (COX-2 および GAPDH) を添加し, Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa, Shiga, Japan) にて行った. 実験に使用したプライマーを Table 2 に示した. 42°C で 5 分, 95°C で 10 秒逆転写反応を行ったのち, 熱変性を 95°C で 10 秒, アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 30 秒の 2 ステップ法で 50 cycle 行った. 定量は  $\Delta\Delta C_t$  法にて行った.

## 6. Western Blot 法

MIF 作用後のヒト歯髄培養細胞を 100  $\mu$ M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) , 0.2 mM EGTA, 2 mM EDTA を含有する Cellytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA) にて溶解し, Bradford 法にてタンパク質量を定量した. 15,000 rpm で 1 分間遠心分離した後の上清と SDS sample buffer (New England Biolabs Japan, Tokyo, Japan) を加え 5 分間煮沸した. タンパク質量が 40  $\mu$ g となるよう 7.5% SDS polyacrylamide Mini-PROTEAN TGX gel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) にて電気泳動後, 転写装置 (NIHON EIDO, Tokyo, Japan) を使用して

ニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) へ転写した. その後, skim milk (Becton Dickinson, NJ, USA) にて室温で 30 分ブロッキングを行い, 一次抗体を室温で 2 時間振盪反応させ, 二次抗体を室温で 90 分間同様に反応させた. 一次抗体として mouse anti-COX-2 antibody (1/2,000, sc-19999, Santa Cruz Biotechnology CA, USA) または rabbit anti- $\beta$ -actin antibody (1/2,000, 4970S, Cell Signaling Technology, MA, USA) を供した. 二次抗体として HRP-conjugated anti-mouse IgG (1/3,000, 170-6516, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) または HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/3,000, 7074S, Cell Signaling Technology, MA, USA) を供した. ECL prime Western Blotting detection system (GE Healthcare, NJ, USA) を用いて化学発光を行い, X 線フィルム (GE Healthcare, NJ, USA) 上に感光させて発現量を確認した.

## 7. PGE<sub>2</sub> 量の定量

前述の培養条件にてヒト歯髄培養細胞を 24 穴 cell culture dish に  $5 \times 10^4$  個/well で播種し, 作用 24 時間前に 1% FBS 含有  $\alpha$ -MEM に交換した. サンプルは MIF 作用後の培養上清とし, PGE<sub>2</sub> の分泌量を Prostaglandin E<sub>2</sub> enzyme immunoassay kit (Oxford Biomedical Research, MI, USA) を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した.

## 8. 統計処理

得られた測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した. 有意差の検定には Tukey test を用い, 有意水準 1%および 5%で検定した.



## <結果>

### 1. ELISA 法を用いた MIF の PGE<sub>2</sub> 産生の検討

ヒト歯髄培養細胞に MIF (10, 50, 100, 200 ng/ml) を 180 分間作用させると、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は用量依存的に増加し、100 ng/ml でほぼ最大値に達し、以後減少傾向を示した (Fig. 1A). また、100 ng/ml MIF を作用させると、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は時間依存的に増加し、作用後 60 分でほぼ最大値に達し、360 分では減少傾向を示した (Fig. 1B).

### 2. MIF による COX-2 遺伝子発現量の変化の検討

RT-PCR 法 (28 cycle) において、ヒト歯髄培養細胞に MIF (10, 50, 100, 200 ng/ml) を 60 分間作用させると、50 ng/ml で明らかな COX-2 遺伝子発現が確認され、100 および 200 ng/ml ではさらに発現量が増加した (Fig. 2A). また、100 ng/ml MIF 添加後 15 分で明らかな COX-2 遺伝子発現が確認され、30 および 60 分ではさらに増加し、180 分後には明らかな減少が認められた (Fig. 2B).

Real-time PCR 法において、ヒト歯髄培養細胞に MIF (10, 50, 100, 200 ng/ml) を 60 分間作用させると、50 ng/ml で COX-2 遺伝子発現量がコントロールと比較して有意に増加を認め、その後用量依存的に増加し、100 ng/ml でほぼ最大値に達した. 200 ng/ml との間には統計学的な有意差を認めなかった (Fig. 2C). また、100 ng/ml MIF を作用させると、作用後 30 分で COX-2 遺伝子発現量がコントロールと比較して有意に増加を認め、その後 60 分でほぼ最大値に達し、以後減少した (Fig. 2D).

### 3. Western Blot 法を用いた COX-2 タンパク質発現量に及ぼす MIF の検討

ヒト歯髄培養細胞に MIF (10, 50, 100, 200 ng/ml) を 180 分間作用させると、COX-2 タンパク質発現量は用量依存的に増加し、100 ng/ml でほぼ横ばいとなった (Fig. 3A). また、100 ng/ml MIF を作用させると、COX-2 タンパク質発現量は時間依存的に増加し、作用 180 分で

ほぼ最大に達し, 360 分では減少傾向にあった (Fig. 3B).

#### 4. ヒト炎症歯髄組織における免疫組織化学染色による MIF の局在

急性歯髄炎様の症状を呈する歯の組織切片に対し, 抗 MIF 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った. HE 染色において歯髄組織内に炎症性細胞の浸潤を認め, 化膿性歯髄炎の病態を呈していた (Fig. 4A). 本切片内で炎症性細胞の浸潤を認め, 炎症が惹起されている可能性が考えられる領域 C と, 炎症性細胞の浸潤を認めず, 正常歯髄を呈する領域 D を選択した (Fig. 4B). 抗 MIF 抗体で染色した結果, 領域 C では陽性細胞が複数検出されたが (Fig. 4C-1), 領域 D ではそれらは検出されなかった (Fig. 4D-1). また, 陰性対照の切片はいかなる特異的反応も示さなかった (Fig. 4C-2, 4D-2).

#### 5. ヒト炎症歯髄組織における蛍光免疫組織多重染色による MIF と CXCR4 の局在

急性歯髄炎様の症状を呈する歯の切片に対し, 抗 MIF 抗体および抗 CXCR4 抗体を用いて蛍光免疫組織多重染色を行った. HE 染色では炎症性細胞の浸潤が認められ, 化膿性歯髄炎の病態が認められた (Fig. 5A). 歯髄組織内で炎症性細胞の浸潤が認められる領域を観察範囲とした (Fig. 5B). 核染色により細胞の位置を確認した (Fig. 5C). 抗 MIF 抗体による蛍光免疫組織染色の結果, 観察範囲において, 多くの紡錘形を呈する歯髄線維芽細胞が陽性の細胞として認められた (Fig. 5D). また, 抗 MIF 抗体および抗 CXCR4 抗体の二重染色の結果, 抗 MIF 抗体陽性の歯髄線維芽細胞は同時に抗 CXCR4 抗体に対しても陽性反応を呈した (Fig. 5E, F).

#### 6. MIF の COX-2 遺伝子発現と CXCR4 阻害剤の効果の検討

ヒト歯髄培養細胞に 100 ng/ml MIF を 60 分間作用させるとコントロールと比較して有意に COX-2 遺伝子発現量は増加し, また, 1  $\mu$ M または 10  $\mu$ M の CXCR4 阻害剤である WZ811

で 60 分間前処理を行うと, MIF による COX 遺伝子発現量は共に有意に抑制された (Fig. 6A, B).

#### 7. Western Blot 法を用いた MIF の COX-2 タンパク質発現と CXCR4 阻害剤の効果の検討

ヒト歯髄培養細胞に 100 ng/ml MIF を 180 分間作用させると COX-2 タンパク質発現量は増加し, また, CXCR4 阻害剤である WZ811 (1 または 10  $\mu$ M) で 60 分間前処理を行うと, MIF による COX-2 タンパク質発現量は 1  $\mu$ M の CXCR4 阻害剤で明らかに低下し, 10  $\mu$ M ではさらに抑制された (Fig. 7).

#### 8. ELISA 法による MIF の PGE<sub>2</sub> 産生誘導に対する CXCR4 阻害剤の検討

ヒト歯髄培養細胞に 100 ng/ml MIF を 180 分間作用させると培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は増加した. また, CXCR4 阻害剤である WZ811 で 60 分間前処理を行うと, MIF による PGE<sub>2</sub> 産生はコントロールと同程度まで抑制された (Fig. 8).

#### <考察>

炎症反応は組織障害から修復までの生体の一連のカスケード反応であり, その結果, 発赤, 腫脹, 発熱, 疼痛, 機能障害といった炎症の 5 徴候を呈するが, 本質的には組織を修復するための合目的な生体反応といえる. しかしながら, 歯髄は硬組織に囲まれている特殊な環境によって一度炎症を起こすと治癒機転が働きにくく, 臨床的にやむを得ず歯髄を除去しなければならない場合が多い. したがって, いかに歯髄を温存するかが歯内治療の長期にわたる課題である. 近年では感染歯髄に対しての Mineral Trioxide Aggregate セメントを用いた直接覆髄が良好な成績を収め, 臨床的に広く実施されているが, その適応は明確でなく, さらなる基礎的な研究が必要である. 歯髄炎による疼痛は紛れもなく生体の防御反応であり, 様々な因子が関与していることはこれまでの研究で明らかにされてきた. 一般的に歯髄に

おける炎症は、組織を壊死に導くために有害とされる一方、軽度の炎症は硬組織形成に深く関与する点で重要である。このように組織障害と修復の二面性に働く因子のひとつとして PGE<sub>2</sub> に着目した。本研究は、走化因子であるケモカインとしての作用や炎症性サイトカイン様の作用を有する MIF が歯髄炎を惹起した歯髄において発現し、PGE<sub>2</sub> の産生を促進することで、歯髄における炎症の進展と防御反応としての硬組織形成に関与していると仮定し、実験を行った。

PGE<sub>2</sub> は血管透過性の亢進や発痛作用を有し、炎症の促進に極めて重要な因子のひとつである。細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカンや IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  はヒト歯髄培養細胞において用量依存的に PGE<sub>2</sub> 量を増加させ<sup>6, 21)</sup>、また歯髄組織中の PGE<sub>2</sub> 量は歯髄炎の進行に伴い増加する<sup>8)</sup>。ヒト歯髄細胞において高濃度 PGE<sub>2</sub> は硬組織形成を抑制するが、低濃度では逆に促進されること<sup>22)</sup>や、ヒト歯根膜細胞で bone morphogenetic protein-2 による Alkaline Phosphatase 活性の促進作用を PGE<sub>2</sub> が修飾する報告<sup>23)</sup>があり、PGE<sub>2</sub> 産生量の適正なコントロールは歯髄の炎症症状を緩和するだけでなく修復象牙質やデンティンブリッジの形成を促進できる可能性を有しており、それはすなわち歯髄の予後を左右するといえる。PGE<sub>2</sub> はアラキドン酸から COX を介して産生されるケミカルメディエーターである。また、COX-2 はサイトカインや増殖因子によって発現が誘導され、炎症時におけるプロスタノイド合成に強く関与する。実際に、炎症ヒト歯髄組織では IL-1 $\beta$  を含む炎症性サイトカインの刺激によって歯髄線維芽細胞が COX-2 を発現し、プロスタグランジンの産生を調節することで不可逆性歯髄炎の病態に関与するという報告<sup>24)</sup>もあり、歯髄炎における COX-2 の働きは炎症の進展において重要である。

当初、MIF はリンパ球にのみ発現するものとされてきたが、in situ hybridization や免疫組織化学染色の結果から、免疫細胞のみならず、上皮細胞や内皮細胞、線維芽細胞などの非免疫細胞で発現していることが明らかとなった<sup>11)</sup>。さらに、敗血症、心血管疾患、癌や関節リウマチ、喘息などの炎症性疾患との関連も報告されており<sup>12, 25-28)</sup>、MIF の様々な疾患への関与

が示されている。子宮内膜症において高濃度に発現が認められる MIF が異所性子宮内膜細胞に作用し COX-2 の合成を刺激すると、産生された PGE<sub>2</sub> によってエストロゲン合成酵素の異常発現を誘発するという報告<sup>29)</sup> や、脊髄損傷によって誘発された MIF がアストロサイトにおける COX-2/PGE<sub>2</sub> シグナル経路を活性化し、IL-1 $\beta$  の産生を促進するという報告<sup>30)</sup> も、本研究で認められた MIF による PGE<sub>2</sub> の用量・時間依存的な産生がヒト歯髄培養細胞内の COX-2 産生と、それに伴う PGE<sub>2</sub> の合成・分泌であり、MIF が歯髄炎の増悪因子として作用する可能性を示唆している。

さらに我々は免疫組織化学染色および蛍光免疫組織染色の結果よりヒト歯髄組織において炎症部位に限局した歯髄線維芽細胞で MIF および MIF 受容体である CXCR4 の発現を確認した。線維芽細胞は結合組織の主要な構成成分であり、ケモカインをはじめとする炎症性メディエーターの実質的な産生者とは考えられていなかった。しかしながら、Lipopolysaccharide や TNF- $\alpha$  などの炎症組織中に放出される物質によってケモカインを産生するという報告<sup>31)</sup> や、ヒト歯髄線維芽細胞において Fibroblast Growth Factor-2 刺激がケモカインである IL-8, IL-6, CCL-20 の mRNA 発現を用量・時間依存的に増加させる報告<sup>32)</sup>, plasmin が IL-8 mRNA および PGE<sub>2</sub> 放出を促すという報告<sup>33)</sup> から歯髄組織において MIF が歯髄線維芽細胞から産生される可能性を示している。本研究において、MIF と CXCR4 の発現が炎症部位で歯髄線維芽細胞に一致して認められたことから、MIF および CXCR4 が歯髄の炎症に関与していることが示唆された。しかしながら、認められた MIF が歯髄線維芽細胞から発現したものなのか、他の細胞から発現した MIF がレセプターに結合したものなのかの判断は困難であり、今後遺伝子レベルでの検証が必要である。

ケモカイン受容体は G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体で、CXCR4 は C-X-C ケモカインファミリーの受容体のひとつである。CXCR4 の代表的なリガンドは CXCL-12 であるが、多くのケモカインはいくつか複数のケモカイン受容体に結合することが知られている<sup>2)</sup>。CXCRs は白血球で発現されるが、内皮細胞および上皮細胞などいくつかの非造血細胞にお

いても発現が確認されている<sup>34)</sup>。CXCRsに関する報告には、CXCL-1がCXCR2の活性化を介して脊髄ニューロンにおける炎症性疼痛およびCOX-2発現を増強するという報告や<sup>35)</sup>、基底細胞癌におけるCXCR4とCOX-2の発現に正の相関関係があるという報告がある<sup>36)</sup>。さらに、CXCL-12/CXCR4シグナル伝達は胎生期における造血幹細胞の骨髄への遊走・定着、血管新生や癌の転移などその細胞内シグナル伝達機構を含め様々な報告<sup>37)</sup>がなされており、歯髄組織では象牙芽細胞への分化の促進<sup>38)</sup>、さらにはCXCR4自体を歯髄幹細胞のマーカーとする報告<sup>39)</sup>もあり注目を集めている。今回、CXCR4は齶蝕による実質欠損直下で炎症性細胞が浸潤している部位の歯髄に局限して発現し、健康歯髄での発現は認められなかった。この結果はCXCR4 mRNAが健康歯髄と比べ炎症歯髄で多く認められたJiangらの報告<sup>40)</sup>と一致するものである。また、100 ng/ml LPSを24時間作用させることで、ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるCXCR4 mRNA発現が促進する報告<sup>41)</sup>もあり、歯髄への炎症性の侵害刺激はCXCR4の発現を促進させることが強く示唆された。MIFはCXCRsのリガンドであり、CXCL-2/MIF-CXCR2シグナル伝達は骨髄由来サプレッサー細胞の動員を促進し、膀胱癌患者の生存率の減少と相関しているという報告<sup>42)</sup>や、MIF-CXCR4がヒト間葉系幹細胞の腫瘍への走化性に関与しているという報告<sup>43)</sup>がある。加えてMIF-CXCR2/4のシグナル伝達は互いに交差活性し、ポジティブフィードバックを介してそれぞれのシグナルを強化することが分かっており<sup>44)</sup>、MIFによる炎症促進作用を強化するものと示唆される。本研究におけるCXCR4阻害剤であるWZ811の前処理によるMIFのPGE<sub>2</sub>産生の抑制も、これらの報告と同様に、ヒト歯髄においてもMIF-CXCR4シグナル伝達が炎症の進展に関与している可能性が示唆された。また同様に、CXCR2阻害剤であるSCH527123による歯髄培養細胞への前処理はMIFのPGE<sub>2</sub>産生を抑制した(データ未掲載)。

さらに、MIFによるシグナル伝達経路の報告にはII型膜貫通糖タンパクであるCD74を介してPGE<sub>2</sub>産生調節に関わる報告<sup>45)</sup>や、単球やT細胞ではCXCR2やCXCR4はCD74と受容体複合体を形成し、MIFがそれぞれのリガンドと競合して作用する<sup>46)</sup>ことが示された。

MIF が複数のケモカインレセプターに結合することは他の CCL, CXCL の性質を考えればむしろ普遍的な所見ともいえるが、明確な結論は出ておらず、また CD74 自体はシグナル伝達を誘導する細胞質ドメインをもたない報告<sup>47)</sup>もある。いずれにしても今回の研究で歯髄において、少なくとも CXCR4 の活性化に MIF が関与することは強く推察された。今後、CXCL-12 との相互関係や拮抗作用およびシグナル伝達系の差異についてさらなる検討を行うことで、複雑な調節機構が明らかになるものと考えられる。

本研究で、炎症性の侵害刺激により歯髄での MIF 産生の促進と、その受容体の一つである CXCR4 の発現が誘導され、その結果 MIF がパラクリン的に細胞に作用し、COX-2 の発現と PGE<sub>2</sub> の産生がなされることを示した。前述のとおり、歯髄炎における PGE<sub>2</sub> 産生量のコントロールは、炎症の進行を抑制するだけでなく修復象牙質の形成量にも関わる点で臨床上きわめて重要であり、さらにその象牙芽細胞分化の過程で CXCR4 による制御が関わる可能性がある。したがって、MIF による CXCR4 を介した PGE<sub>2</sub> 産生機序の解明は歯髄炎の予防・治療・そして再生医療に向けた創薬の糸口となりえると示唆された。

#### <結論>

化膿性歯髄炎を呈するヒト歯髄組織において、炎症部位に限局的して MIF および CXCR4 陽性の歯髄線維芽細胞を確認した。また、ヒト歯髄培養細胞において MIF は CXCR4 の受容体を介して COX-2 発現を促進し、PGE<sub>2</sub> の産生を引き起こすことが示唆された。

本論文は、‘Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammation in Human Dental Pulp’ (Journal of Hard Tissue Biology 掲載予定) および ‘歯髄炎における MIF による CXCR4 を介した PGE<sub>2</sub> 産生調節’ (日本歯内療法学会雑誌 掲載予定) を参考論文とし、まとめ論文としたものである。

< 参考論文 >

- 1) Fukai K, Takiguchi T, Ando Y *et al.* Functional tooth number and 15-year mortality in a cohort of community-residing older people. *Geriatr Gerontol Int* 7: 341-347, 2007.
- 2) Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)* 13: 469-473, 2015.
- 3) 新井秀明. ヒト歯髄炎における神経線維の動態に関する神経組織学的研究. *日歯保存誌* 34: 1631-1645, 1991.
- 4) Zehnder M, Delaleu N, Du Y *et al.* Cytokine gene expression-part of host defense in pulpitis. *Cytokine* 22: 84-88, 2003.
- 5) Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 30: 88-91, 2004.
- 6) Chang MC, Chen YJ, Tai TF *et al.* Cytokine-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production and cyclooxygenase-2 expression in dental pulp cells: Downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor. *Int Endod J* 39: 819-826, 2006.
- 7) Chang MC, Lin SI, Lin LD *et al.* Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates EP2, Adenylate Cyclase, Phospholipase C, and Intercellular Calcium Release to Mediate Cyclic Adenosine Monophosphate Production in Dental Pulp Cells. *J Endod* 42: 584-588, 2016.
- 8) Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S. Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod* 21: 131-136, 1995
- 9) Adachi T, Nakanishi T, Yumoto H *et al.* Caries-related bacteria and cytokines induce CXCL10 in dental pulp. *J Dent Res* 86: 1217-1222, 2007.



- 10) Takahashi K, Nakanishi T, Yumoto H *et al.* CCL20 production is induced in human dental pulp upon stimulation by *Streptococcus mutans* and proinflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 23: 320-327, 2008.
- 11) Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 791-800, 2003.
- 12) Onodera S, Kaneda K, Mizue Y *et al.* Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* 275: 444-450, 2000.
- 13) Onodera S, Nishihira J, Koyama Y *et al.* Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 50: 1437-1447, 2004.
- 14) Calandra T, Bernhagen J, Metz CN *et al.* MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377: 68-71, 1995.
- 15) Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA *et al.* Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 44: 1273-1280, 2001.
- 16) Mitchell RA, Metz CN, Peng T *et al.* Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 274: 18100-18106, 1999.

- 17) Ortiz-García YM, García-Iglesias T, Morales-Velazquez G *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels in Gingival Crevicular Fluid, Saliva, and Serum of Chronic Periodontitis Patients. *Biomed Res Int*, doi 10.1155/2019/7850392, Epub 2019 Feb5, 2019.
- 18) Zhao DF, Gong QM, Ling JQ *et al.* Macrophage migration-inhibitory factors expression and its effects on proliferation in human dental pulps. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 46: 484-488, 2011.
- 19) Kamio N, Hashizume H, Nakao S *et al.* IL-1 $\beta$  stimulates urokinase-type plasminogen activator expression and secretion in human dental pulp cells. *Biomed Res* 28: 315-322, 2007.
- 20) Zhan W, Liang Z, Zhu A *et al.* Discovery of small molecule CXCR4 antagonists. *J Med Chem* 50: 5655-5664, 2007.
- 21) 松島 潔, 細谷史規, 大林英美ほか. 齶蝕病巣内細菌ペプチドグリカンによる歯髄細胞のプロスタグランジン E2 産生能に及ぼす影響. *日歯保存歯* 38: 1333-1338, 1995.
- 22) 坂本真樹, 塩沢督, 松島潔ほか. ヒト歯髄細胞における Prostaglandin E2 の硬組織形成促進作用. *日歯保存誌* 46: 445-450, 2003.
- 23) Takiguchi T, Kobayashi M, Nagashima C *et al.* Effect of prostaglandin E2 on recombinant human bone morphogenetic protein-2-stimulated osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 34: 431-436, 1999.
- 24) Nakanishi T, Shimizu H, Hosokawa Y *et al.* An Immunohistological Study on Cyclooxygenase-2 in Human Dental Pulp. *J Endod* 27: 385-388, 2001.
- 25) Chuang CC, Wang ST, Chen WC *et al.* Increases in serum macrophage migration inhibitory factor

in patients with severe sepsis predict early mortality. *Shock* 27: 503-506, 2007.

- 26) Morand EF, Leech M, Bernhagen J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 5: 399-410, 2006.
- 27) Schinagl A, Thiele M, Douillard P *et al.* Oxidized macrophage migration inhibitory factor is a potential new tissue marker and drug target in cancer. *Oncotarget* 45: 73486-73496, 2016.
- 28) Mizue Y, Ghani S, Leng L. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 40: 14410-14415, 2005.
- 29) Carli C, Metz CN, Al-Abed Y *et al.* Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E<sub>2</sub> production in Human Endometriotic Cells by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Involvement of Novel Kinase Signaling Pathways. *Endocrinology* 150: 3128-3137, 2009.
- 30) Zhang Y, Zhou Y, Chen S *et al.* Macrophage migration inhibitory factor facilitates prostaglandin E<sub>2</sub> production of astrocytes to tune inflammatory milieu following spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 16: 1468-1466, 2019.
- 31) Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 151: 317-322, 1997.
- 32) Kim YS, Min KS, Jeong DH *et al.* Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the Expression and Regulation of Chemokines in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 36: 1824-1830, 2010.
- 33) Kamio N, Hashizume H, Nakao S *et al.* Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp. *Biochem Pharmacol* 75: 1974-1980, 2008.
- 34) Huber TB, Reinhardt HC, Exner M *et al.* Expression of Functional CCR and CXCR Chemokine

Receptors in Podocytes. *J Immunol* 168: 6244-6252, 2002.

- 35) Cao DL, Zhang ZJ, Xie RG *et al.* Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2. *Exp Neurol* 261: 328-336, 2014.
- 36) Sivrikoz ON, Uyar B, Dağ F *et al.* CXCR-4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin; their relationship with tumor invasiveness and histological subtype. *Turk Patoloji Derg* 31: 30-35, 2015.
- 37) Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16: 2927-2931, 2010.
- 38) Kim DS, Kim YS, Bae WJ *et al.* The role of SDF-1 and CXCR4 on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *Int Endod J* 47: 534-541, 2014.
- 39) Iohara K, Murakami M, Takeuchi N *et al.*: A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2: 521-533, 2013.
- 40) Jiang L, Zhu YQ, Du R *et al.* The expression and role of stromal cell-derived factor-1alpha-CXCR4 axis in human dental pulp. *J Endod* 34: 939-944, 2008.
- 41) Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M *et al.* Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral Oncol* 45: 968-973, 2009.
- 42) Zhang H, Ye YL, Li MX *et al.* CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of

myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. *Oncogene* 36: 2095-2104, 2017.

43) Lourenco S, Teixeira VH, Kalber T *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor - CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors. *J Immunol* 194: 3463-3474, 2015.

44) Xiang Z, Zhou ZJ, Xia GK *et al.* A positive crosstalk between CXCR4 and CXCR2 promotes gastric cancer metastasis. *Oncogene* 36: 5122–5133, 2017.

45) Barbosa BF, Paulesu L, Ietta F *et al.* Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells in dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF) via ERK1/2 phosphorylation and Prostaglandin E2 production. *Placenta* 35: 152-162, 2014.

46) Bernhagen J, Krohn R, Lue H *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13: 587-96, 2007.

47) Shi X, Leng L, Wang T *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25: 595-606, 2006.

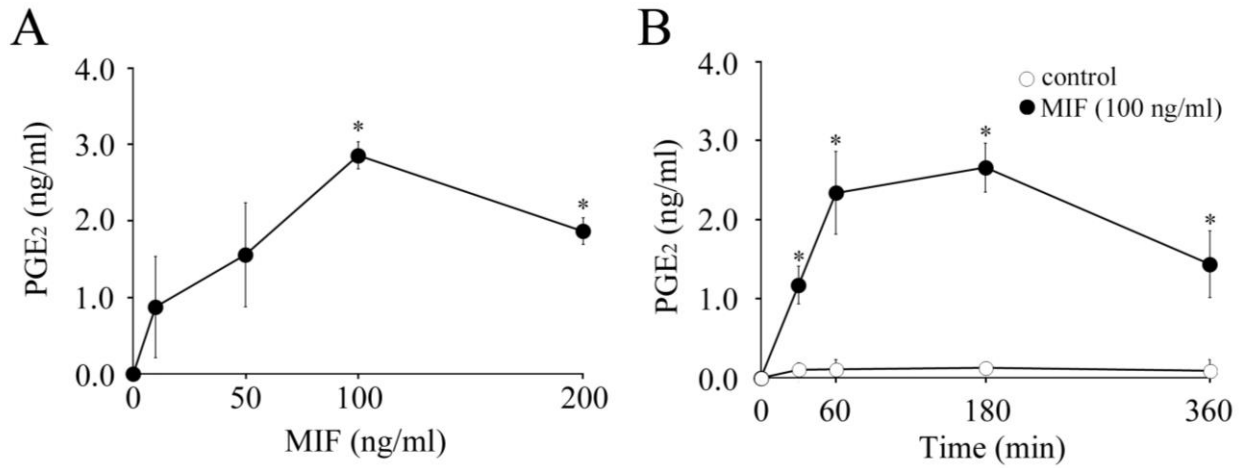


Fig. 1 Effects of MIF on the secretion of PGE<sub>2</sub> in human dental pulp cells. (A) Human dental pulp cells were treated with MIF (0-200 ng/ml) for 180 min. (B) Human dental pulp cells were stimulated with or without 100 ng/ml MIF for the indicated times. At the end of incubation, PGE<sub>2</sub> levels in the media were measured by an enzyme-linked immunoassay. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$  versus control.

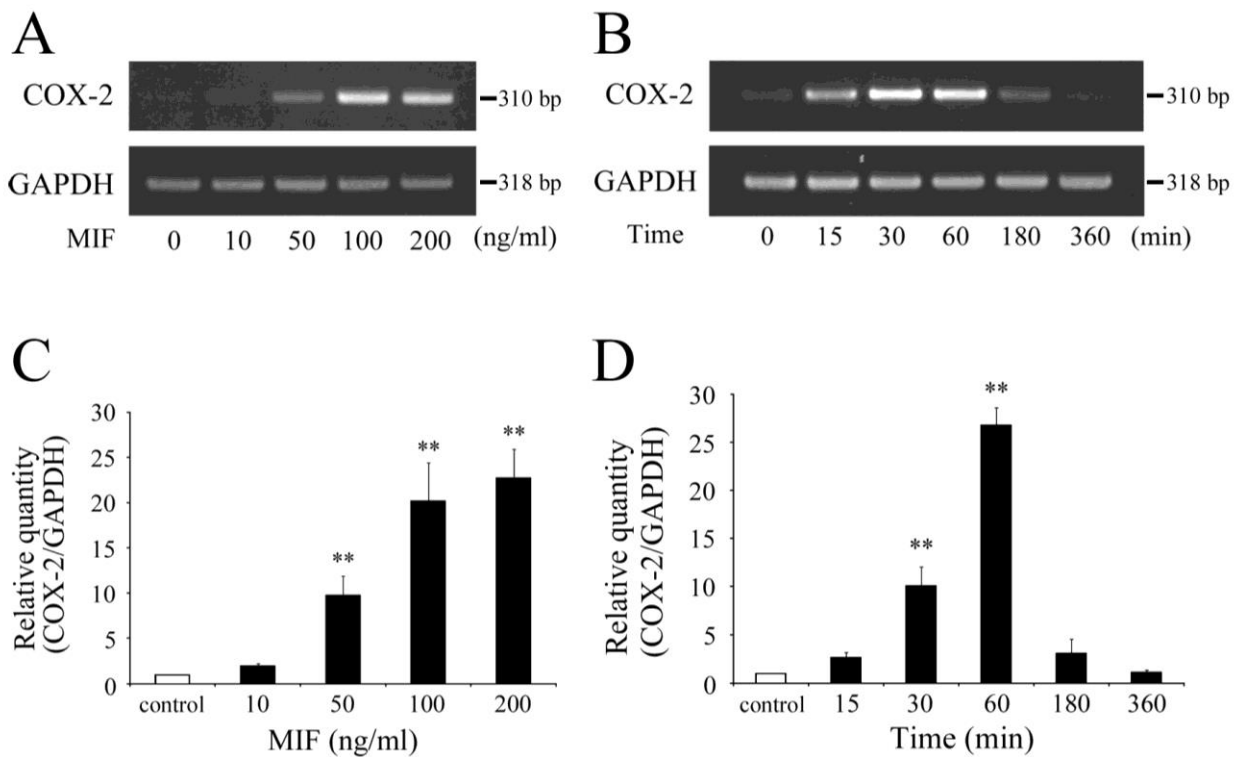


Fig. 2. Effect of MIF on COX-2 mRNA expression. (A) Human dental pulp cells were stimulated with MIF at the indicated concentrations for 60 min, and the expression levels of COX-2 and GAPDH mRNAs were evaluated using RT-PCR. (B) Expression levels of COX-2 and GAPDH were assessed by RT-PCR in dental pulp cells treated for the indicated times in 100 ng/ml MIF. (C) COX-2 expression detected by real-time RT-PCR in human dental pulp cells treated with various concentrations of MIF. COX-2 expression was normalized to the expression of GAPDH and reported relative to the amount expressed in unstimulated cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  versus untreated cells (control). (D) Human dental pulp cells were stimulated with MIF for 100 ng/ml for the indicated time, and COX-2 expression was quantified by real-time RT-PCR, normalized to the expression level of GAPDH and reported to the amount expressed in untreated cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical significance of differences between groups is indicated as follows: \*\* $P < 0.01$  versus the expression in unstimulated cells (control).

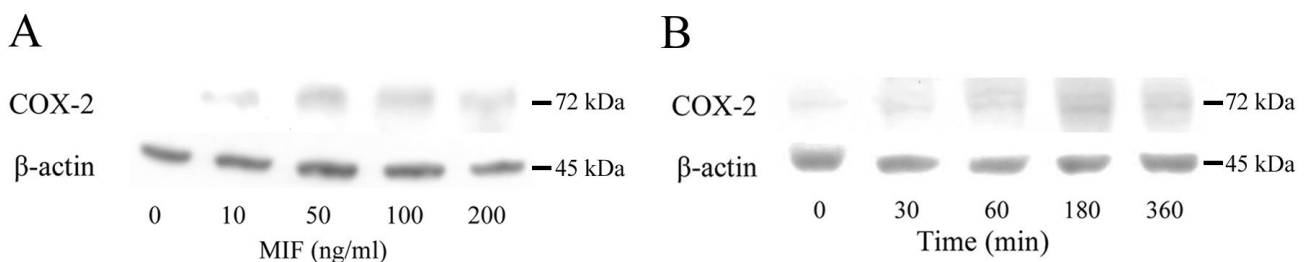


Fig. 3. Induction of COX-2 protein expression by MIF stimulation. (A) Human dental pulp cells were stimulated with MIF at the indicated concentration. One hundred and eighty minutes post stimulation, cytoplasmic extracts were analyzed for COX-2 and  $\beta$ -actin levels by Western blotting. (B) Expression levels of COX-2 and  $\beta$ -actin were evaluated by Western blotting in human dental pulp cells treated for the indicated times with 100 ng/ml MIF.

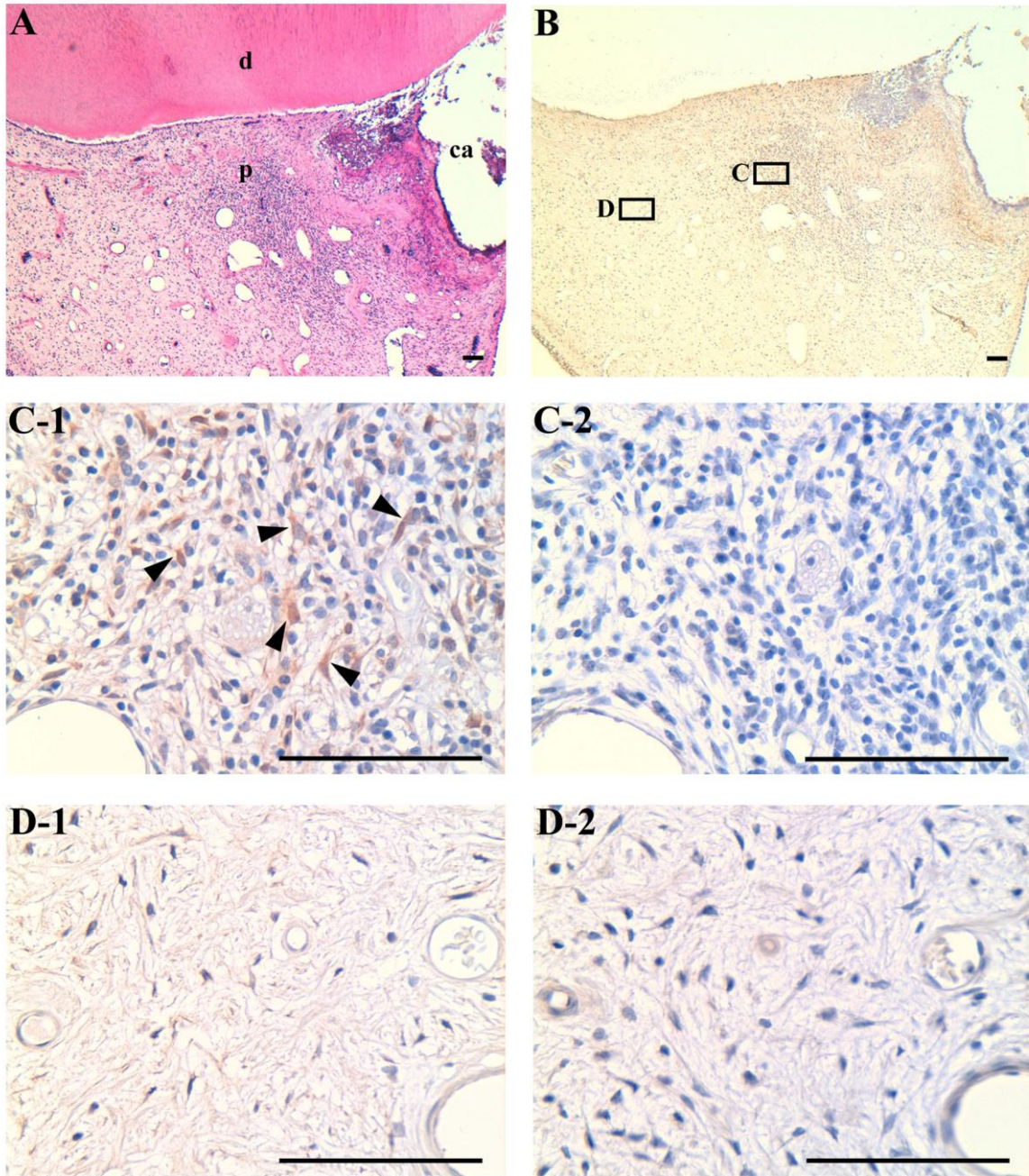


Fig. 4. Immunohistochemical localization of MIF in human teeth affected by pulpitis. (A) HE staining of human teeth affected by pulpitis. Caries progressed, pulp showed the signs of purulent inflammation. (B) Immunohistochemical staining of human teeth affected by pulpitis revealed infiltration of neutrophils. (C) Selected area from B with intense inflammation. (C-1) A strong MIF signal was observed at the site of intense inflammation, which was consistent with pulpal fibroblasts. (C-2) Section from negative control showing no specific immunoreactivity. (d) Selected area from B with weak inflammation. (D-1) Lack of strong MIF signal in dental pulp located in the weakly inflamed part. (D-2) Section from negative control showing no specific immunoreactivity. d: dentin, p: pulp, ca: caries. Scale bar = 100  $\mu$ m.



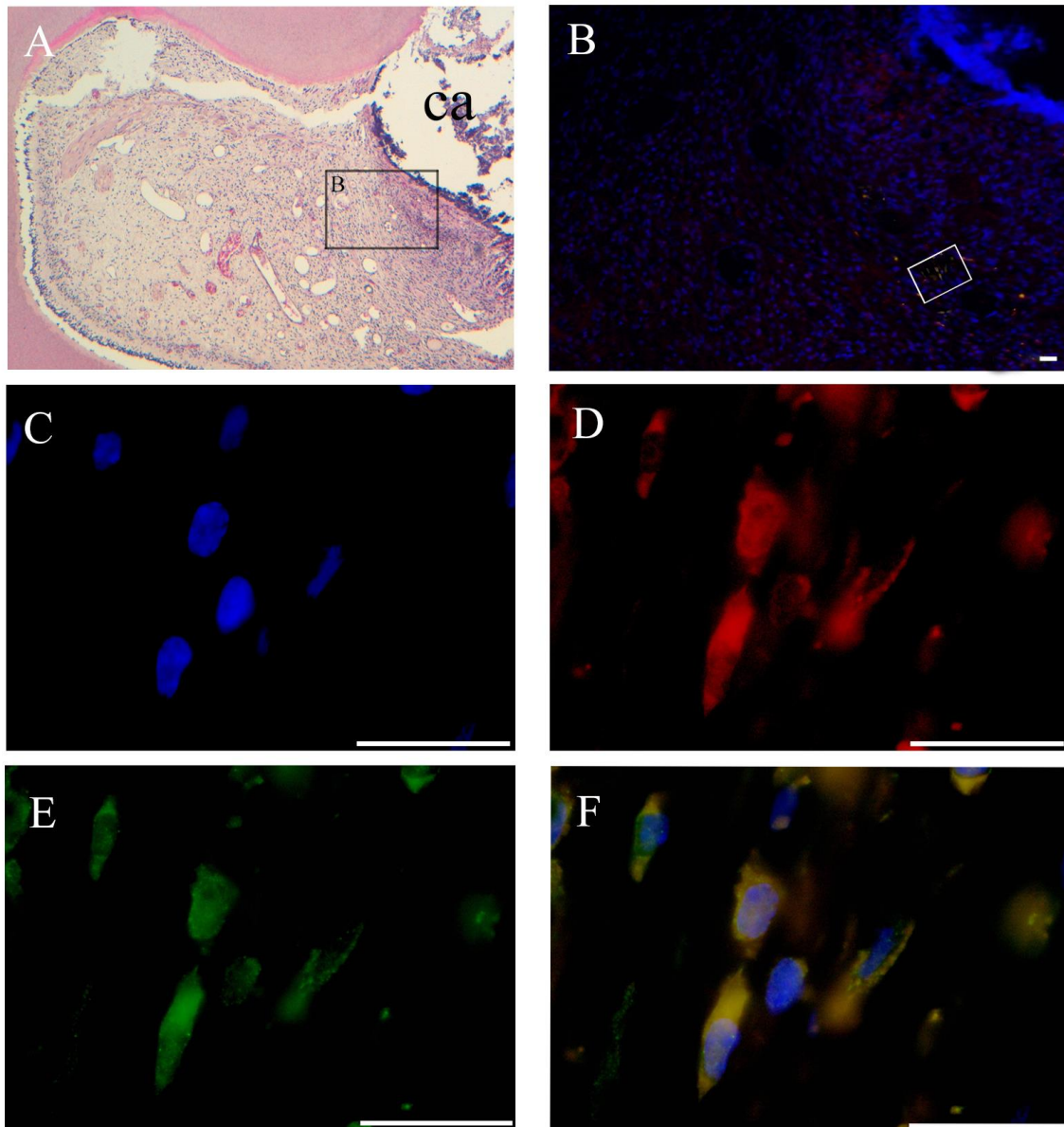
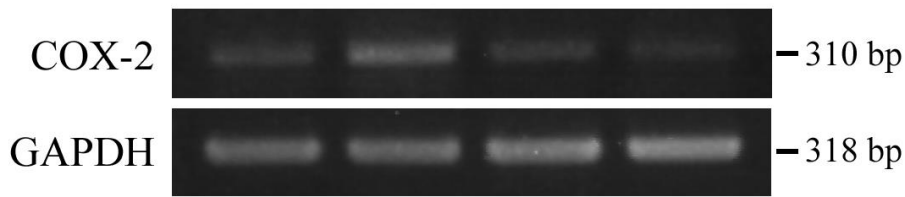


Fig. 5 HE staining and immunohistofluorescence staining for MIF, CXCR4 and merged images in acute pulpitis human teeth. (A) Hematoxylin/eosin staining of human teeth affected by pulpitis. Caries progressed, pulp showed the signs of purulent inflammation. (B) Merger of the MIF signal with the CXCR4 signal (medium magnification). (C-F) Selected area from B with intense inflammation. (C) Nuclear staining (DAPI, blue) (D) Expression of the MIF (red) (E) Expression of the CXCR4 (green). Strong MIF and CXCR4 signals were observed at sites of intense inflammation, consistent with the cytoplasm of dental pulp fibroblasts. (F) Merger of the MIF signal with the CXCR4 signal (high magnification). ca: caries. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**A**



**B**

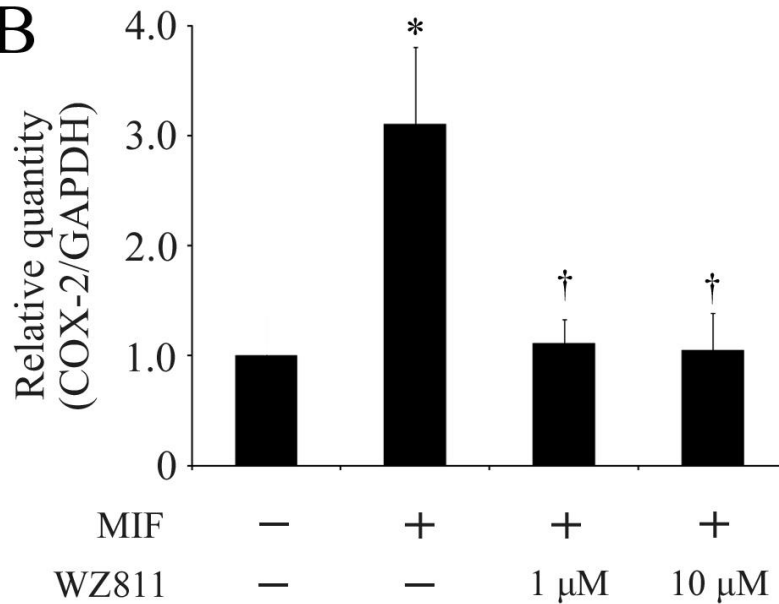


Fig. 6. Inhibition of MIF-induced COX-2 mRNA expression by the CXCR4 inhibitor WZ811 (A) RT-PCR, (B) real-time RT-PCR. \* $P < 0.05$  versus unstimulated cells; † $P < 0.05$  versus cells stimulated with MIF in the absence of WZ811.

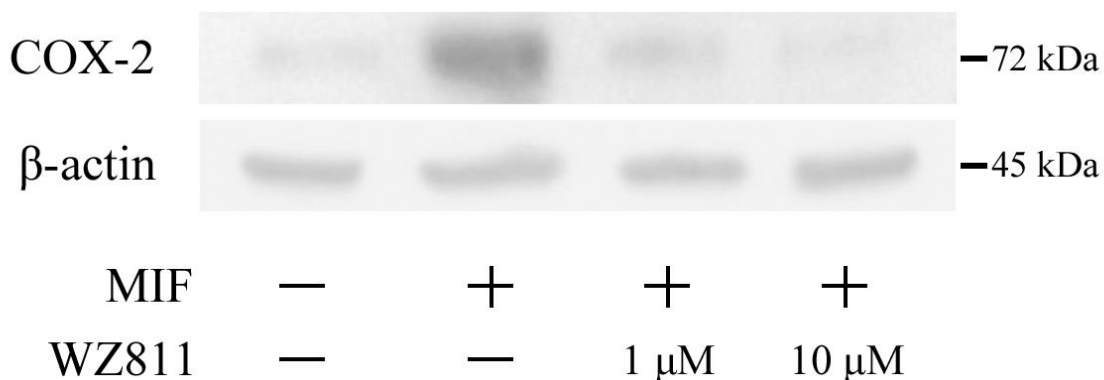


Fig. 7. Inhibition of MIF-induced COX-2 protein expression by the CXCR4 inhibitor WZ811 Human dental pulp cells were pretreated with CXCR4 inhibitor WZ811 (1, 10 μM) for 1 hour. The expression of COX-2 mRNA by MIF was suppressed by 1 μM of CXCR4 inhibitor and more suppressed by 10 μM.

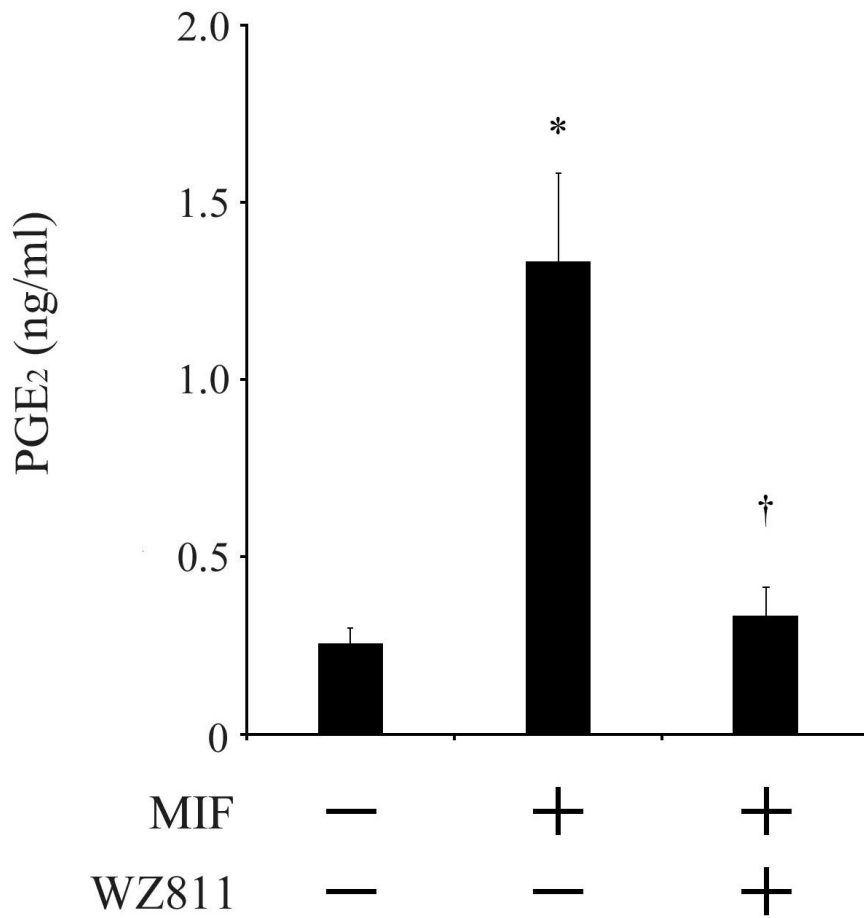


Fig. 8. Sensitivity of MIF-induced PGE<sub>2</sub> secretion to CXCR4 inhibitors. Human dental pulp cells were treated for 60 min in the presence or absence of 1  $\mu$ M WZ811 and stimulated with 100 ng/mL MIF for 180 minutes. Secretion of PGE<sub>2</sub> into the culture medium was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical significance of differences between groups is indicated as follows: \* $P$  < 0.05 versus unstimulated cells; † $P$  < 0.05 versus cells stimulated with MIF in the absence of WZ811.

Table 1 RT-PCR primers

Gene		Primer Sequence	Product size (bp)
COX-2	Forward	5'-ATGAGATTGTGGAAAAATTGCT-3'	310
	Reverse	5'-GATCATCTCTGCCTGAGTATC-3'	
GAPDH	Forward	5'-ATCACCATCTTCCAGGAG-3'	318
	Reverse	5'-ATGGA CTGTGGTCATGAG-3'	

Table 2 Real-time PCR primers

Gene		Primer Sequence	Product size (bp)
COX-2	Forward	5'-CTGTAACCAAGATGGATGCAAAGA-3'	195
	Reverse	5'-GTCAGTGACAATGAGATGTGGAA-3'	
GAPDH	Forward	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	138
	Reverse	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

## **Macrophage migration inhibitory factor promotes inflammation by Prostaglandin E<sub>2</sub> production via C-X-C chemokine receptor-4 in human dental pulp**

Takahiro Watanabe

Department of Endodontics

Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key words: Macrophage migration inhibitory factor, C-X-C chemokine receptor-4, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Dental pulp

### **ABSTRACT**

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is produced by lymphocytes and has been identified as a chemokine that has the ability to control the function of macrophages and the ability to promote infiltration of neutrophils and eosinophils. At present, expression has been confirmed in cells of various tissues, and in addition to its action as a chemokine, it may be a factor that also plays a role in producing cytokines and chemical mediators at local sites of inflammation.

The pulp is surrounded by dentin, and communication with surrounding tissues is in a closed space with only the apical foramen. Once pulpitis is induced, the healing mechanism is difficult to work and often follows an irreversible course. The protective response of the pulp is the formation of reparative dentin, but some reports indicate that moderate inflammatory conditions favor the formation of reparative dentin. Therefore, we focused on Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) as a factor involved in a series of processes of destruction and repair in inflammation and we hypothesized that MIF was expressed in inflammatory pulp tissue and might be involved in up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and PGE<sub>2</sub> production.

In this study, immunohistochemical staining and fluorescent immunohistochemical staining of dental pulp tissue using extracted tooth with caries showed infiltration of inflammatory cells, and anti-MIF antibody positive only in the area where inflammation was induced. In addition, anti-MIF antibody-positive dental pulp fibroblasts showed localization of C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4), one of MIF receptors. In human dental pulp cells, the expression of COX-2 gene was observed in a dose- and time-dependent manner by the addition of MIF, and the effect was suppressed by the CXCR4 inhibitor WZ811. Furthermore, the addition of MIF increased the amount of PGE<sub>2</sub> in the culture supernatant in a dose- and time-dependent manner, and the effect was suppressed by WZ811.

From the above results, expression of MIF and CXCR4 was observed in human pulp tissues that received inflammatory noxious stimuli. MIF acted on dental pulp fibroblasts with a paracrine-like effect, and caused COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production via CXCR4 receptor. Thereby suggested that pulpitis might progress.