

ヒト歯髄培養細胞における fractalkine/C-X3-C motif chemokine ligand-1 および
CX3CR1 の発現と炎症, 硬組織形成に対する影響

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

古谷 夏子

(指導: 福本 雅彦 教授)

【要旨】

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、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。失活歯の予後は生活歯に比べて統計的に短いことも明らかになっており、歯髄保存療法の研究が進められている。現在では水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate といったカルシウムを主体とした直接覆髄剤が臨床で用いられている。これらは被蓋硬組織の形成を促進して露髄部における治癒に働く一方で、露髄面直下に壊死層を形成し、歯髄の活性を低下させることや、炎症の起きた歯髄に対する成功率は低いという問題点がある。

fractalkine/ C-X3-C motif chemokine (CX3C) ligand 1 は主に血管内皮細胞上に発現するケモカインであり、そのレセプターである CX3CR1 と結合することで炎症性細胞を動員することが知られている。近年では炎症だけでなく、皮膚創傷治癒や硬組織形成マーカーを発現することが報告されている。これらの報告から歯髄組織においても fractalkine-CX3CR1 は炎症時だけでなく、炎症後の治癒にも関与している可能性がある。

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において炎症細胞の浸潤を認め、炎症が惹起されている部分に局限して抗 fractalkine 抗体、抗 CX3CR1 抗体陽性の歯髄線維芽細胞を認めた。また、歯髄培養細胞において IL-1 β , LPS の添加により fractalkine mRNA, タンパク質発現が認められ、さらに fractalkine の添加により COX-2, PGE₂ タンパク質発現量は増加した。また fractalkine の添加により石灰化結節の形成, BMP-2, Osterix mRNA 発現の上昇, dentin sialo phospho protein (DSPP) タンパク質発現量の上昇を認め、DSPP タンパク質への効果は CX3CR1 の阻害薬である AZD8797 により抑制された。ヒト歯髄組織の炎症部位に fractalkine/CX3CR1 が発現しており、炎症性サイトカインや

LPS の刺激により fractalkine mRNA の発現量は促進されること、COX-2, PGE₂ タンパク質を産生することから歯髄炎の進行に関与している可能性が示唆された。また、ヒト歯髄培養細胞で BMP-2, Osterix mRNA の発現, DSPP タンパク質発現量を促進し、さらに石灰化結節の形成を促進させたことから、歯髄の硬組織形成にも関与している可能性が示唆された。

【緒言】

臨床において齶蝕除去中に露髄した場合、歯髄に炎症や細菌感染が生じている可能性がある為、歯髄除去療法である抜髄が適応になる。しかし抜髄は、破折リスクの上昇や歯髄の防御反応、感染抵抗力が喪失することで齶蝕が知らぬ間に進行する危険性があり、歯の喪失を助長させる原因になると考えられている。そのため、できるだけ直接覆髄を施し、積極的に歯髄を保存するのが望ましいと考えられている。現在では露髄面に水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate といったカルシウムを主体とした直接覆髄剤が臨床で用いられている^{1,2)}。これらは被蓋硬組織の形成を促進して露髄部における治癒に働く一方で、露髄面を強アルカリ環境下に曝すため、露髄面直下に壊死層を形成し歯髄の活性を低下させることや、炎症の起きた歯髄組織に対する成功率は低い³⁾という問題点がある。近年、歯髄保存療法の開発が進む一方で、炎症歯髄に対する歯髄保存療法は未だ確立していないのが現状であり、炎症時の歯髄における細胞特性も不明な点が多く残されている。これらの問題点を解決するには、炎症時の細胞特性を検索するとともに、生体親和性が高く、硬組織形成を促すだけでなく歯髄の炎症に対してもアプローチすることのできる歯髄保存療法剤の開発が望まれると考える。

一方、従来の覆髄法とは異なるサイトカイン療法ともいえるべき覆髄法が近年

注目されている⁴⁾。サイトカインを直接投与することによって細胞増殖，硬組織形成細胞を活性化し，組織再生を積極的に促進していく方法である。現在，歯周組織再生療法においては歯周組織の血管新生，細胞増殖を期待する目的で遺伝子組み換え塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) が医薬品として承認され，臨床の場で利用されている⁵⁾。マウスの歯髓組織においては MTA に bone morphogenetic protein (BMP) を含有させると，被蓋硬組織の形成を含めた露髓部の創傷治癒が促進されることが報告されており⁶⁾，成長因子を応用して自己修復能の活性化を促すサイトカインは新規覆髓剤に有用である可能性を示している。

fractalkine/ C-X3-C motif chemokine (CX3C) ligand 1 は主に活性化血管内皮細胞上に発現するケモカインである。fractalkine は唯一の膜結合型ケモカインであり，接着分子として機能することが知られている⁷⁾。免疫細胞が組織に浸潤するためにはセクレチンやインテグリンといった接着分子によって細胞移動を停止させる必要があるが，膜結合型 fractalkine はその受容体である C-X3-C motif chemokine receptor-1 (CX3CR1) との結合力のみで細胞接着を引き起こすことが明らかとなっており，迅速な細胞応答が可能であるとされている^{8,9)}。この迅速な反応は歯髓炎の急性的な臨床症状と不可逆的な病態の解明に結び付く可能性がある。現在では歯周病患者の歯肉組織でも発現が確認され¹⁰⁾，マウスのサテライトグリア細胞で炎症性サイトカイン刺激と PGE₂産生を通じて炎症性疼痛を媒介することが明らかになっている¹¹⁾。

近年 fractalkine-CX3CR1 は炎症への関与だけでなく，治癒にも働く可能性が報告されている。CX3CR1 は肉芽組織の形成やコラーゲン沈着，線維芽細胞の蓄積，血管新生を促進し，fractalkine-CX3CR1 システムが皮膚創傷治癒における血管新生メディエーターとして機能する可能性があることが報告されている¹²⁾。歯髓

組織での治癒とは歯髄が健康な状態に戻るだけでなく、修復象牙質形成反応が生じ、外界からの刺激を遮断することをいうが、修復象牙質形成反応には様々な原因がある。歯髄組織に対する重度の炎症は過剰なサイトカインやメディエーターの働きにより組織修復を妨げる可能性がある一方で、軽度の炎症では硬組織形成が起こるとの報告がある¹³⁾ことから、炎症と硬組織形成には密接な関係があるといえる。これらの報告から歯髄組織においても fractalkine-CX3CR1 は炎症時だけでなく、炎症後の治癒にも関与している可能性が考えられる。

本研究では、歯髄組織における fractalkine の炎症と治癒への関与について解明する目的でヒト歯髄組織における fractalkine/CX3CR1 の局在、ヒト歯髄培養細胞における fractalkine の COX-2 発現、PGE₂産生と硬組織形成能の関連について注目し、検討を行った。

【材料と方法】

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認（承認番号: EC22-21-20-19-19-003-4）に基づき行った。

1. 培養細胞

日本大学松戸歯学部附属病院に治療のために来院し、矯正学的理由で抜去された 20 歳の患者の第一小臼歯から無菌的に抽出した歯髄を PBS で十分に洗浄した後、約 2 mm 角に細切りし、組織片を 35 mm culture dish に静置後、10%牛胎児血清 (foetal bovine serum; FBS, Sigma-Aldrich, MO, USA) , 10000 units/ml penicillin, 10000 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml Fungizone (Antibiotic-Antimycotic, Gibco BRL life Technologies, Tokyo, Japan) を添加した α -minimum essential medium (α -MEM, GIBCO BRL Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて 37°C, 5%CO₂, 95%

気相下にて out growth し, 5~9 代継代したものをヒト歯髄培養細胞として用いた.

2. total RNA の抽出

上記の培養条件にてヒト歯髄培養細胞を 10 cm culture dish で 1×10^6 個/dish で播種し, 刺激 24 時間前に 1%FBS 含有 α -MEM に交換した. 無刺激もしくは IL-1 β , LPS, fractalkine (富士フイルム和光純薬, Osaka, Japan) 刺激後のヒト歯髄培養細胞の total RNA を RNeasy®Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出した. 得られた全 RNA の純度は, 260 nm と 280 nm の比で測定した.

3. Real-time PCR 法

Total RNA, DNA primer, One step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR KIT II Perfect Real Time (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い, 全 RNA および DNA プライマー (fractalkine, BMP-2, Osterix, GAPDH) を添加し, Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa) にて行った. 実験に使用したプライマーを Table 1 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, アニールおよび伸長反応を 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.

4. Western blot 法

IL-1 β , fractalkine 作用後のヒト歯髄培養細胞を 100 μ M PMSF, 0.2 mM EGTA, 2 mM EDTA を含有する Cellytic M Cell lysis reagent (Sigma-Aldrich) にてタンパク質を抽出し, Bradford 法¹⁴⁾ にてタンパク質量の調整を施した後 SDS sample buffer を加え 5 分間煮沸し, 15000 rpm で 1 分間遠心分離した後の上清をサンプルとした. タンパク質量が 40 μ g- 80 μ 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) 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, 一次抗体として rabbit anti-CX3CL1 antibody (1/3,000, 14-7986-81, eBioscience CA, USA), mouse anti-COX-2 antibody (1/2,000, sc-19999, Santa Cruz Biotechnology CA, USA), mouse anti-DSPP (1/5,000, LFMb-21, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti- β -actin antibody (1/2,000, 4970S, Cell Signaling Technology, MA, USA), 二次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/3,000, 7074S, Cell Signaling Technology), HRP-conjugated anti-mouse IgG (1/10,000, 170-6516, Bio-Rad Laboratories) を反応させた. ECL prime Western Blotting detection system (Cytiva, MA, USA)を用いて化学発光を行い, X線フィルム (Cytiva) 上に発光させてタンパク質発現量を確認した. CX3CR1 への阻害実験は fractalkine 作用 60 分前に CX3CR1 阻害剤である AZD8797 (Axon Medchem, Groningen, Germany) で処理した後, fractalkine を作用させた.

5. ELISA

前述の培養条件にてヒト歯髄培養細胞を 24 穴 cell culture dish に 5×10^4 個 well で播種し, 作用 24 時間前に 1%FBS 含有 α -MEM に交換した. 刺激後, PGE₂量を Prostaglandin E₂ Parameter Kit (R&D Systems, MN, USA)を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した.

6. 組織切片の作製

日本大学松戸歯学部付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歯髄炎と判断され, 抜歯となった第三大臼歯を試料とした.

抜去歯を 4%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 μm の切片を作製し、スライドグラスにマウントした。

7. 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 EDTA 緩衝液 (pH 8.0) 中で 10 分間煮沸した。メタノール中の 3% H_2O_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+Tween20) で洗浄した後、切片を一次抗体として rabbit anti-CX3CR1 antibody (1/200, ab8021, abcam, Cambridge, UK) を含む湿潤チャンバー内で常温にて 1 時間反応させた。次いで二次抗体 Dako REALTME_n VisionTM/HRP, Rabbit/Mouse (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) で 30 分処理し、最後に切片を Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Agilent Technologies) 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。

免疫細胞化学染色では、PBS で洗浄した後、一次抗体として goat anti-CX3CL1 antibody (1/500, R&D Systems), rabbit anti-CX3CR1 antibody (1/1,000, ab8021, abcam) を 1 時間反応させた。次いで二次抗体 F (ab') 2-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa FluorTM546 (Thermo Fisher Scientific) で細胞を 30 分間処理し、生物蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX51; Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

8. アリザリンレッド染色

無刺激もしくは fractalkine 刺激後、17 日培養したヒト歯髄培養細胞における石灰化結節の確認をアリザリンレッド染色にて行った。すなわち培養 17 日目のヒ

ト歯髄培養細胞に対して、10%ホルマリン溶液にて 30 分間固定し、固定後蒸留水にて洗浄、アリザリンレッド溶液にて 30 分放置後、蒸留水にて洗浄し石灰化結節の形成を観察した。

9. 石灰化物定量

石灰化評価セット (PG Research) に基づき、アリザリンレッド溶液の除去後、精製水でプレートを洗浄した。5%ギ酸を 1 ml 加え、10 分攪拌して色素を抽出した。溶出液 100 μ l を測定用 96well プレートに移し、波長 415 nm でマイクロプレートリーダーにて測定した。

10. 統計処理

結果は 3 人の異なるドナーの平均値 \pm SE で示した。統計解析は Excel Statistics 2019 (SSRI) を用いて行った。時間経過研究のデータは二元配置分散分析 (ANOVA) により分析し、他の実験のデータは一元配置分散分析により分析した。グループの平均値は Tukey の多重比較検定を用いて比較し、有意水準は 5%とした。

【結果】

1. ヒト炎症歯髄組織における fractalkine および CX3CR1 の発現

急性歯髄炎様の症状を呈する歯の抜去後の歯髄組織に対し、HE 染色および抗 fractalkine 抗体、抗 CX3CR1 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、齶蝕直下の歯髄組織に好中球を主体とした炎症性細胞の浸潤を認め、化膿性歯髄炎の病理像を呈していた (Fig. 1A)。免疫組織化学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 (Fig. 1A 領域 B) では紡錘形の歯髄線維芽細胞の細胞質に fractalkine 陽性反応 (Fig. 1 B-1) と CX3CR1 陽性反

応 (Fig. 1 B-2) を認めた. 対して, 正常組織を呈する部位 (Fig. 1A 領域 C) では fractalkine および CX3CR1 の両抗体を添加しても陽性反応はほとんど確認できなかった (Fig. 1 C-1). また, いずれの抗体も添加していない陰性対象の切片はいかなる特異的反応も示さなかった (Fig. 1 B-3, C-2).

2. ヒト歯髄培養細胞における IL-1 β および LPS による fractalkine mRNA 発現

ヒト歯髄培養細胞に各種濃度の IL-1 β および LPS を 3 時間作用させると, fractalkine mRNA 発現量は用量依存的に増加し, 0.1 ng/ml の IL-1 β 作用時, 1.0 μ g/ml の LPS 作用時に最大値に達し, その後横ばいであった (Fig. 2A, B). また, 0.1 ng/ml の IL-1 β 作用時, 1.0 μ g/ml の LPS を作用させると, fractalkine mRNA 発現量は時間依存的に増加し, 作用後 3 時間で最大値に達し, 以後減少した (Fig. 2 C, D).

3. ヒト歯髄培養細胞における IL-1 β による fractalkine タンパク質発現量と蛍光免疫細胞染色における fractalkine および CX3CR1 発現

ヒト歯髄培養細胞に 0.1 ng/ml の IL-1 β を作用させると, fractalkine タンパク質発現量は時間依存的に増加し, 作用 6 時間で最大値に達し, 12 時間においてもタンパク質量は維持された (Fig. 3A). また, ヒト歯髄培養細胞に IL-1 β (0.1 ng/ml) を 24 時間作用させ, 抗 fractalkine 抗体および抗 CX3CR1 抗体を用いて蛍光免疫細胞染色を行った. コントロールでは fractalkine シグナルは全く認めず, CX3CR1 シグナルは弱く認められた. IL-1 β で刺激したヒト歯髄培養細胞では fractalkine および CX3CR1 シグナルを強く認めた (Fig. 3B).

4. ヒト歯髄培養細胞における fractalkine による COX-2 タンパク質発現

ヒト歯髄培養細胞に fractalkine (0.1, 1.0, 5.0, 10.0 nM) を 24 時間作用させると, 0.1 nM で COX-2 タンパク質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, 5.0 nM で最大となった (Fig. 4A). さらに, ヒト歯髄細胞を 5.0 nM の fractalkine で 0, 6, 12, 24 時間処理した結果, COX-2 タンパク質の発現はコントロールに比べて有意に増加し, 12 時間で顕著になり, 24 時間まで維持された (Fig. 4B).

5. ヒト歯髄培養細胞における fractalkine による PGE₂ 産生

ヒト歯髄培養細胞に 1.0 nM fractalkine を作用させると, 培養上清中 PGE₂ は時間依存的に増加し, 作用 24 時間で最大に達し, その後 48 時間まで維持された (Fig.5).

6. ヒト歯髄培養細胞における fractalkine による石灰化結節の形成

fractalkine 添加から 17 日で 1.0 nM は染色性の増大が認められ, 5.0 nM は 1.0 nM と比較して染色性の増大は認められなかった (Fig. 6A). また石灰化物定量においてコントロール群と比較し 1.0 nM に有意差を認めた (Fig. 6B).

7. ヒト歯髄培養細胞における fractalkine による BMP-2, Osterix 遺伝子発現量の変化

アリザリンレッド染色の結果より fractalkine が硬組織形成に寄与する濃度は 1.0 nM である可能性があると考えられた. そこで硬組織形成マーカーである BMP-2, Osterix 遺伝子発現量の変化を Real-time PCR 法にて検討した. ヒト歯髄培養細胞に 1.0 nM fractalkine を 1, 3, 6, 12 時間作用させると, BMP-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, 作用後 3 時間で最大となり以後減少した (Fig. 7A). 1.0 nM fractalkine を 24, 48, 72 時間作用させると, Osterix 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, 作用後 48 時間で最大となり以後減少した (Fig. 7B).

8. ヒト歯髄培養細胞における fractalkine による DSPP タンパク質発現量の変化

次に、1.0 nM fractalkine による DSPP タンパク質発現量の変化について検討した。ヒト歯髄培養細胞に 1.0nM fractalkine を 1, 3, 7, 10, 14 日作用させると DSPP タンパク質発現量はコントロールと比較して有意に増加を認め、その後時間依存的に増加し作用 10 日ではほぼ最大に達し、14 日ではほぼ横ばいとなった (Fig. 8A)。また、CX3CR1 阻害剤である AZD8797 を 2 μ M で 60 分前処理を行うと、fractalkine による DSPP タンパク質発現量は抑制された (Fig. 8B)。

【考察】

歯髄において炎症と再生には密接な関係があり、前述のとおり重度の炎症はサイトカインやメディエーターの働きによって組織破壊が進行する。なかでも炎症性細胞の走化性に関与し、炎症の起点となるケモカインの働きは、強烈で急速な臨床症状を呈する歯髄炎において重要であり、歯髄組織の中での動態解明は歯髄保存療法の適応範囲をさらに拡大するものと思われる。膜結合型 fractalkine は CX3CR1 との結合によってのみインテグリン依存的に白血球の接着を誘導するため、歯髄組織中に最も多く存在する歯髄線維芽細胞上への受容体発現が歯髄の急速な炎症拡大に寄与している可能性が考えられる。また、歯髄線維芽細胞に炎症刺激として IL-1 β および LPS を作用させると、fractalkine の mRNA およびタンパク質発現が時間、濃度依存的に増加し、蛍光免疫細胞染色では、IL-1 β 刺激により fractalkine および CX3CR1 シグナルが増加したことから、齧蝕病原細菌の LPS や誘導された炎症性サイトカインによって歯髄線維芽細胞から発現した fractalkine がオートクリンおよびパラクリンの作用し、リンパ球を誘導することで、更なる炎症反応の促進に関与している可能性が示唆された。一方で軽度の炎症は組織修復に寄与し硬組織形成に深く関与する。歯髄線維芽細胞においても高濃度の PGE₂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¹⁵⁾、ヒト歯根膜細胞において BMP-2 による Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の促進作用を PGE₂ が修飾するという報告がある¹⁶⁾ことから、炎症による破壊と再生という一見相反する場面を種々のサイトカインの局在や産生量によって往来していると推察される。近年の報告では、fractalkine は炎症への関与だけでなく、硬組織形成マーカーを発現させることが報告されている。マウスの骨芽細胞で CX3CL1 刺激によって Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix 発現量の増加を認め、CX3CR1 欠損マウスの骨芽細胞でカルシウム沈着の減少、骨芽細胞マーカーの発現パターンの変化を認めたことから、CX3CL1/CX3CR1 が骨芽細胞分化の初期段階に有利に働くことを報告している¹⁷⁾。また、血管平滑筋細胞では Jak2/stat3 シグナル伝達を活性化させ osteopontin, BMP-2, ALP を発現させるとともに、osteoprotegerin 発現を阻害することで硬組織形成を促進する可能性が報告されている¹⁸⁾。本研究はそのなかで歯髄の炎症時に産生が認められ、炎症促進と硬組織形成能を併せ持つケモカインについて検討を行い、その一端を解明することで歯髄炎の進行抑制、象牙質の再石灰化に応用できるのではないかと仮定した。結果として、炎症歯髄組織において fractalkine, CX3CR1 の発現と、細菌の LPS や炎症性サイトカインの刺激によって歯髄線維芽細胞からの fractalkine 発現の促進、その受容体である CX3CR1 の発現が認められた。また、COX-2 タンパク質発現, PGE₂ 産生を促進することで歯髄の炎症促進に関与している可能性があること、fractalkine を 1.0 nM で作用させたアリザリンレッド染色で染色性が増大し、5.0 nM では減少したことから、fractalkine 1.0 nM が歯髄培養細胞における硬組織形成に媒介している可能性が高いことを示した。象牙質形成は複数のシグナル伝達によって誘導され、多くの成長因子および転写因子により制御される¹⁹⁾。BMP, Osterix, DSPP は象牙芽細胞分化を促進させることが報告されている^{20, 21)}。DSPP は象牙質に特異的に存在し、象牙質形成において重要

なタンパク質である。DSPP と他の象牙芽細胞分化促進因子との関係は不明な点が多いが、DSPP の発現は Osterix が高度に発現している象牙芽細胞で増強される²²⁾ことから、DSPP の発現は Osterix に影響を受けている可能性が考えられる。Osterix はジンクフィンガー型転写因子であり、骨形成および骨芽細胞分化に必須であると考えられている²³⁾。歯においても象牙芽細胞分化に Osterix が関与し、さらにその発現は BMP-2 などにより調整されていることが報告されている。石河らはマウスの歯胚で Osterix は最終分化期の象牙芽細胞に発現が認められ、BMP-2 遺伝子導入による培養 24 時間後に Osterix の発現の上昇が認められることを報告した²⁰⁾。これは象牙芽細胞分化に Osterix が関与し、その発現は BMP-2 により調節されていることを示唆している。BMP は TGF- β スーパーファミリーに属し、強力な骨形成促進作用をもつ²⁴⁾。ヒト歯髄培養細胞において BMP-2 を添加させることにより ALP 活性を亢進させ、象牙芽細胞への分化を促進させることが報告されており²⁵⁾、これらのことから BMP, Osterix, DSPP が硬組織形成に重要な役割を担っていると考えられる。

本研究で fractalkine 1.0 nM による BMP-2 mRNA 発現は作用後 3 時間でピークに達し、Osterix mRNA は 48 時間でピークとなった。DSPP は時間依存的に増加し、10 日でほぼ最大となった。BMP-2 mRNA の発現後に Osterix mRNA が発現しており、その後 DSPP が発現していることから、Osterix の発現に BMP-2 が関わっており、さらに Osterix の発現が DSPP の発現に影響を与えるとの報告に矛盾しない。

fractalkine が 5.0 nM, 10.0 nM の場合 COX-2 タンパク質発現, PGE₂ 産生量は増大し、アリザリンレッド染色で 1.0 nM で硬組織形成量の増大, BMP-2, Osterix mRNA, DSPP タンパク質発現の増加を認めたことから fractalkine は高濃度の場合炎症が促進し、低濃度の場合は硬組織形成が促進する可能性を明らかにした。

また、CX3CR1 阻害剤である AZD8797 が DSPP タンパク質発現を抑制したことから、CX3CL1/CX3CR1 経路が硬組織形成を制御している可能性が示唆された。fractalkine が COX-2 発現、PGE₂ 産生をすることによって硬組織形成が促進するの
か、fractalkine が硬組織形成マーカーを発現することで直接硬組織形成を促進しているかはまだわかっていない。しかし、fractalkine の COX-2 タンパク質発現、PGE₂ 産生より BMP-2 mRNA、Osterix mRNA の発現が早いことから fractalkine が直接硬組織形成に作用している可能性がある。

本研究により、ヒト歯髄培養細胞において細菌の LPS や炎症性サイトカインの刺激によって歯髄線維芽細胞からの fractalkine 産生の促進と、そのレセプターである CX3CR1 の発現が促進され、fractalkine 刺激によって COX-2 発現、PGE₂ 産生が促進された。また、炎症歯髄組織においても fractalkine と CX3CR1 の発現をみとめたことから、fractalkine がオートクリン及びパラクリンの作用し、COX-2、PGE₂ を産生することを示した。また、BMP-2、Osterix mRNA、DSPP タンパク質発現の増加、アリザリンレッド染色から硬組織形成に関与している可能性があることまで明らかにした。fractalkine の働きを解明することで歯髄の炎症のコントロールが可能になり、保存可能な歯髄組織が増加すると同時に硬組織形成能の促進を期待できることから、fractalkine による PGE₂ 産生と硬組織形成マーカーの発現の解明は歯髄の炎症制御と硬組織形成の両特性を備えた新規覆髄剤の糸口となりえると示唆された。

【結論】

ヒト歯髄組織において歯髄線維芽細胞に fractalkine/CX3CR1 の発現を認め、ヒト歯髄培養細胞において fractalkine が COX-2 発現、PGE₂ 産生を促進することから、fractalkine が炎症の進展に関与する可能性が示唆された。さらに BMP-2、Osterix、DSPP を発現することで、歯髄の硬組織形成能を促進する可能性が示唆

された。PGE₂の産生を介した硬組織形成への関与も考えられるが、更なる研究が必要である。

【参考文献】

1. Fitzgerald M, Heys RJ (1991) A clinical and histological evaluation of conservative pulpal therapy in human teeth. *Oper Dent* 16, 101-112.
2. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS (2003) Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 36, 225-231.
3. Morigami M (1994) Study on an Experimental Tetracalcium Phosphate Cement as a Direct Pulp Capping Agent. *Jpn J Conserv Dent* 37, 467-497.
4. Yoshiyama M, Nishitani Y, Shimizu H, Doi J, Yamada T, Tsutsumi S, Gen S, Maeda N, Momoi Y, Akimoto N, Imazato S, Ebisu S, Saito T, Matsuda K (2002) Seeking a New Caries Treatment: New Conversion from Restoration to Dentin Regeneration. *J Jpn Assoc Dent Sci* 22, 76-80.
5. Kajiya M (2021) Basic research on cytokine and cell therapy to establish a novel promising strategy for periodontal tissue regeneration. *J Jpn S Soc Periodontol* 63, 105-112.
6. Horie T, Ryu T, Fujitani M, Kawai T, Senda A (2009) Effect of Direct Pulp Capping with MTA Containing BMP. *Jpn J Conserv Dent* 52, 393-401.

7. Kim K, Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira S, Jung S (2011) In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine, *Blood* 118, 56-67
8. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall T, Yoshie O (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion, *Cell* 14, 521-530
9. Imai T, Nishimura M, Nanki T, Umehara H (2005) Fractalkine and inflammatory diseases. *Proc Jpn Soc Immunol* 28, 131-139.
10. Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguchi D, Nakae H, Matsuo T (2005) Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in periodontal diseased tissue. *Clin Exp Immunol* 139, 506-512.
11. Souza GR, Talbot J, Lotufo CM, Cunha FQ, Cunha TM, Ferreira SH (2013) Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 11193-11198.
12. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM (2008) Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol* 180, 569-512.

13. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ (2010) Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 38, 687-697.
14. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
15. Sakamoto M, Shiozawa A, Matsushima K, Yamazaki M (2003) Stimulation of Hard Tissue Formation on Human Dental Pulp Cells by Prostaglandin E2. *Jpn J Conserv Dent* 46, 445-450.
16. Takiguchi T, Kobayashi M, Nagashima C, Yamaguchi A, Nishihara T, Hasegawa K (1999) 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.
17. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T (2013) Iimura T. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *J Cell Sci* 126, 1032-1045.

18. Yang T, Guo L, Chen L, Li J, Li Q, Pi Y, Zhu J, Zhang L (2020) A novel role of FKN/CX3CR1 in promoting osteogenic transformation of VSMCs and atherosclerotic calcification. *Cell Calcium* 91, 102265.
19. Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116, 1647-1648.
20. Ishikawa M, Nakashima M, Iohara K, Akamine A (2005) Expression and Transcriptional Regulation of Osterix Transcription Factor during Odontoblast Differentiation. *Jpn J Conserv Dent* 48, 813-821.
21. D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, et al. (1997) Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12, 2040-2049.
22. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I, MacDougall M (2009) Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res* 88, 904-909.
23. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002) The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17-29.

24. Ito K, Arakawa T, Murata M, Takuma T, Arisue M (2007) Expression of Bone morphogenetic proteins (BMPs) in human dental pulp. *J Hard Tissue Biol* 16, 199-204.

25. Matsui S, Komine C, Takahashi C, Wada Y, Iwai H, Miura H et al (2010) Effects of Ga-Al-As laser irradiated conditions on calcified nodules formation in human dental pulp cells. *J Endod Assoc* 31, 71-77.

【Fig. 1】

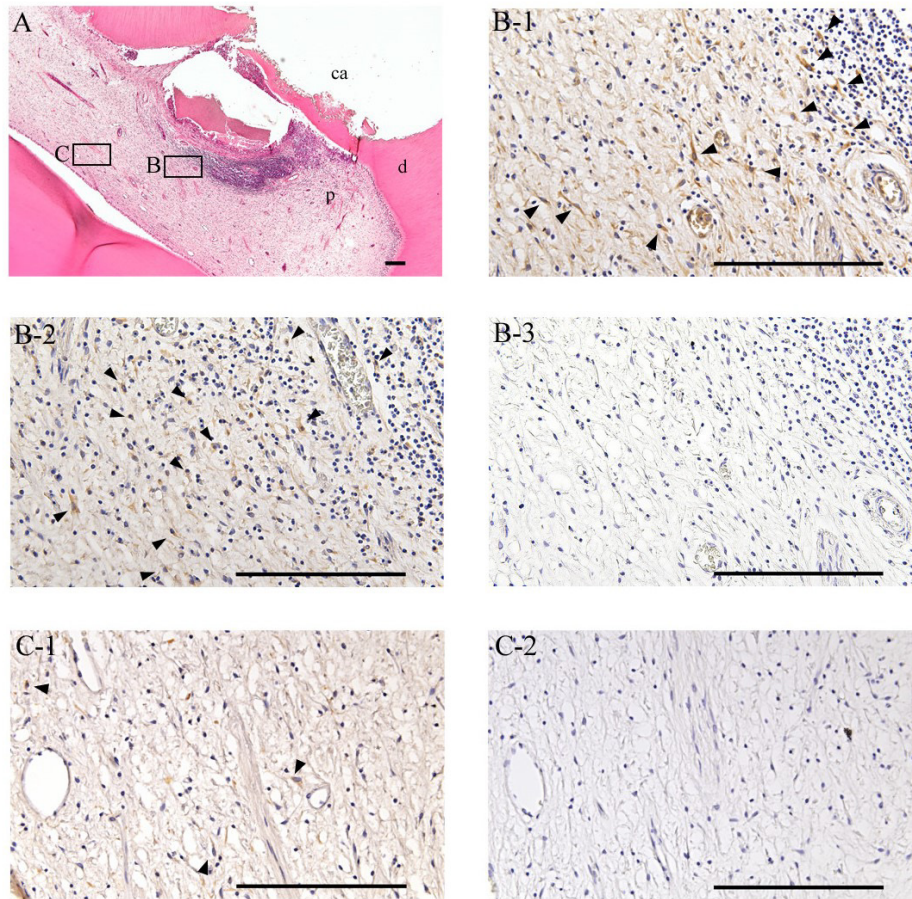


Fig. 1 Immunohistochemical localization of fractalkine and CX3CR1 in human teeth affected by pulpitis. (A) Hematoxylin/eosin staining of human teeth affected by pulpitis. Caries progressed, pulp showed the signs of purulent inflammation. (B) Selected area from A with intense inflammation. (B-1, B-2) A strong fractalkine and CX3CR1 signal was observed at the site of intense inflammation, which was consistent with pulpal fibroblasts. (C) Selected area from A with non-inflammation. (C-1) Lack of fractalkine and CX3CR1 signal in dental pulp located in the non-inflammation part. (B-3, C-2) Section from negative control showing no specific immunoreactivity. d: dentin, p: pulp, ca: caries. Scale bar = 200 μ m.

【Fig. 2】

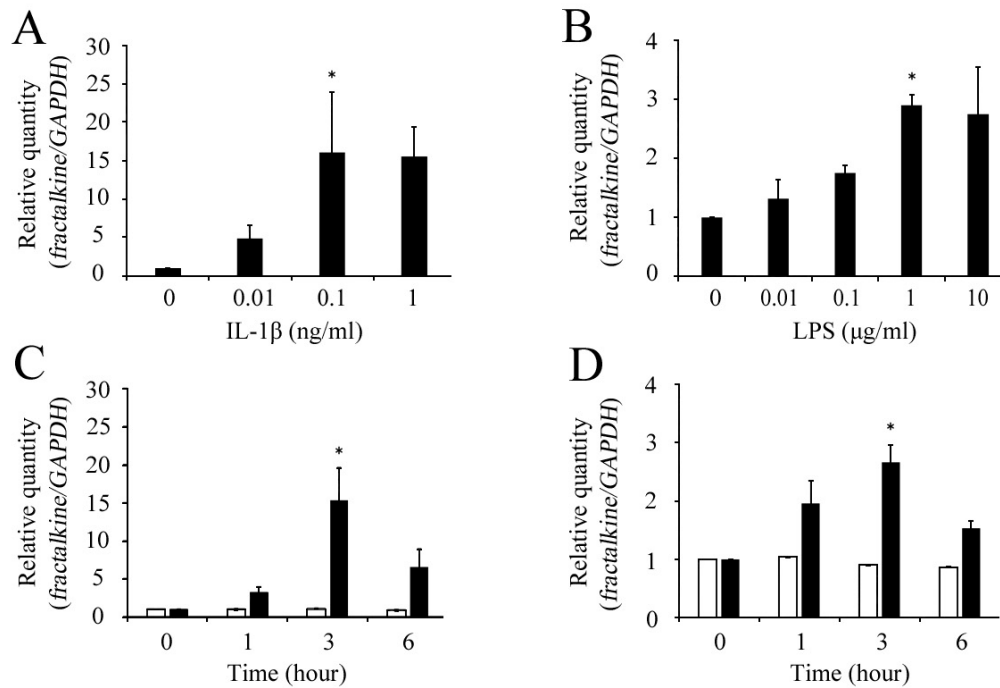


Fig. 2 Effect of IL-1β and LPS on fractalkine mRNA expression.

(A, B) fractalkine expression detected by real-time RT-PCR in human dental pulp cells treated with various concentrations of IL-1β and LPS. fractalkine expression was normalized to the expression of GAPDH and reported relative to the amount expressed in unstimulated cells. (C, D) Human dental pulp cells were stimulated with 100 ng/mL IL-1 and 1.0 μg/ml LPS for the indicated times, and fractalkine 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 ± SEM of three independent experiments. Statistical significance of differences between groups is indicated as follows: *P < 0.05 versus the expression in unstimulated cells.

【Fig. 3】

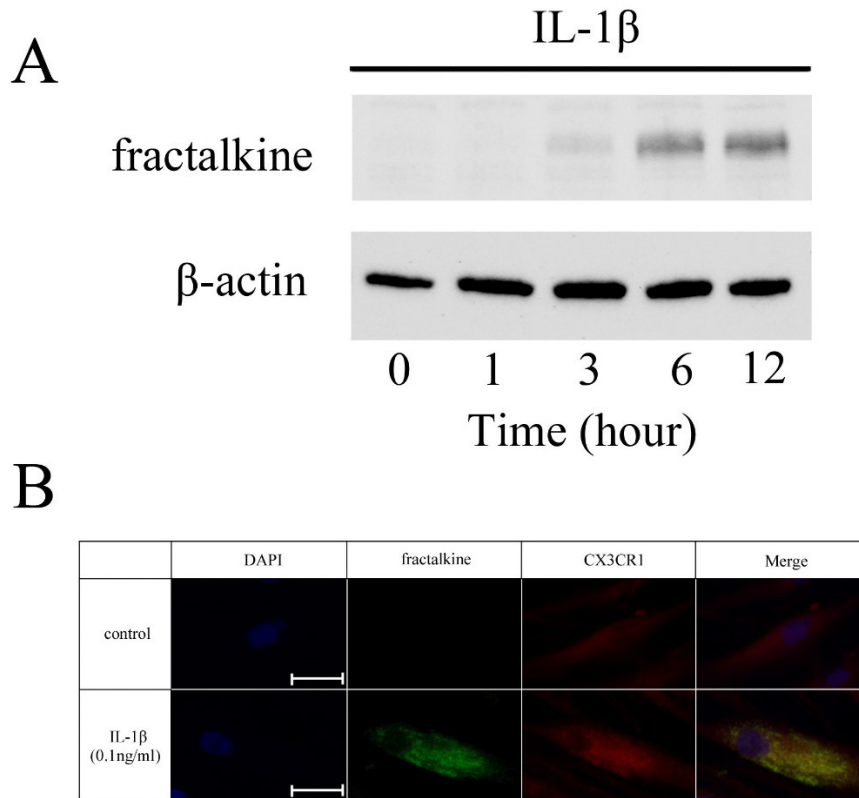


Figure. 3 Induction of fractalkine protein expression by IL-1 β stimulation and expression of fractalkine/CX3CR1 by fluorescent staining of immune cells.

(A) Expression levels of fractalkine and β -actin were evaluated by western blotting in human dental pulp cells treated for the indicated times with 0.1 ng/mL IL-1 β . (B) Cells stimulated with 0.1 ng/mL were stained with anti-fractalkine and anti-CX3CR1 antibodies to assess expression. Scale bar = 20 μ m.

【Fig. 4】

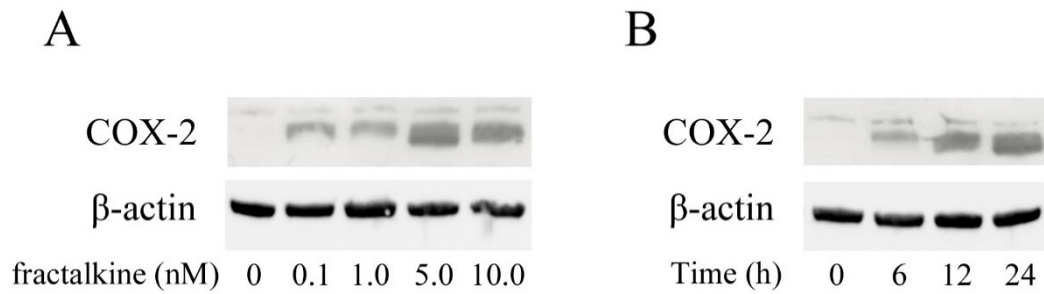


Figure. 4 Fractalkine induces COX-2 protein expression in cultured human dental pulp cells

Cultured human dental pulp cells were stimulated both with and without fractalkine. (A)

Following 24 h of stimulation at specified concentrations, cytoplasmic extracts were examined for COX-2 and β -actin levels using western blotting. (B) The expression levels of COX-2 and β -actin, stimulated with fractalkine (5.0 nM) for varying time intervals, were analyzed using western blotting.

【Fig. 5】

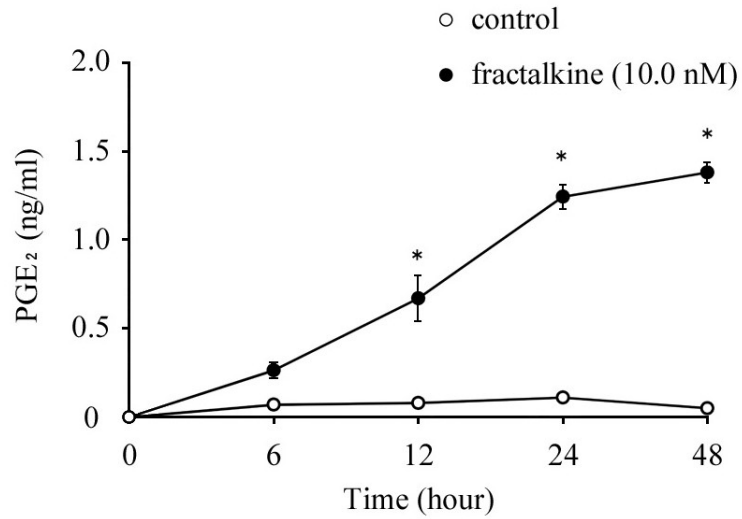


Figure. 5 Effects of fractalkine on the secretion of PGE₂ in human dental pulp cells

Human dental pulp cells were stimulated with or without 10.0 nM fractalkine for the indicated times.

*P < 0.05 versus control.

【Fig. 6】

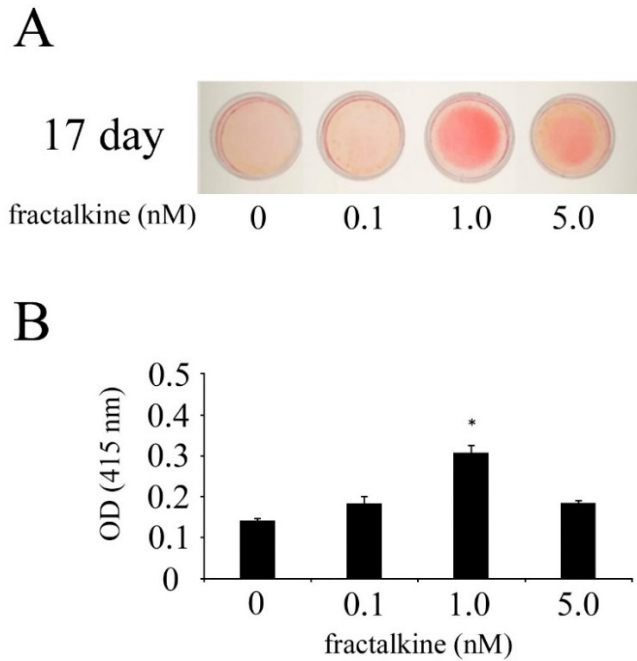


Figure. 6 Calcified nodule formation in cultured human dental pulp cells influenced by fractalkine

This figure illustrates Alizarin red staining of cultured human dental pulp cells after a 17-day incubation period, both without (control) and with fractalkine. (A) Calcification was evaluated using a calcification assessment kit designed for cultured human dental pulp cells. (B) The absorbance of the released Alizarin red stain was measured at 415 nm with an absorbance spectrophotometer. The results are expressed as the mean (\pm SEM) of three independent experiments. Statistical analysis was conducted using Tukey's test, in which significant differences vs the control are indicated by $*p < 0.05$.

【Fig. 7】

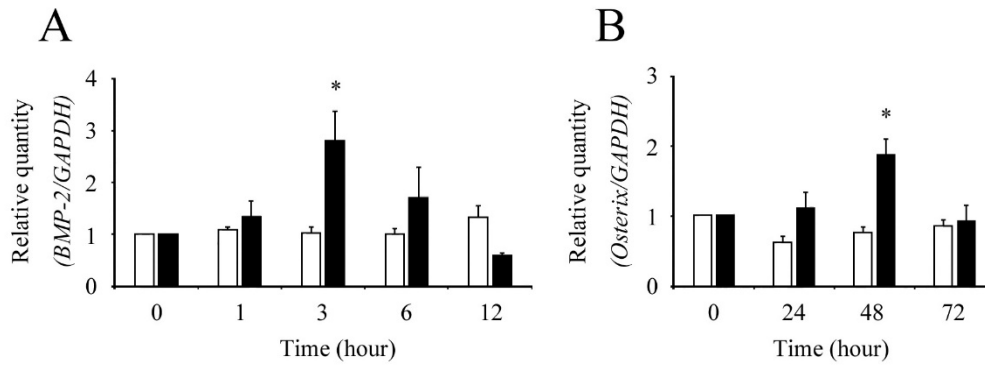


Figure. 7 Fractalkine-induced alterations in BMP-2 and Osterix gene expression in cultured human dental pulp cells.

Cultured human dental pulp cells underwent treatment for specified durations, either without any intervention (control) or with 1.0 nM fractalkine. White bar, unstimulated; black bar, stimulated with 1nM fractalkine. The mRNA expression levels of BMP-2 and Osterix were quantified as the ratio of either BMP-2 or Osterix to GAPDH and subsequently normalized to the control values. The results are presented as the mean (\pm SEM) from three independent experiments. Tukey's test was employed for statistical analyses.

【Fig. 8】

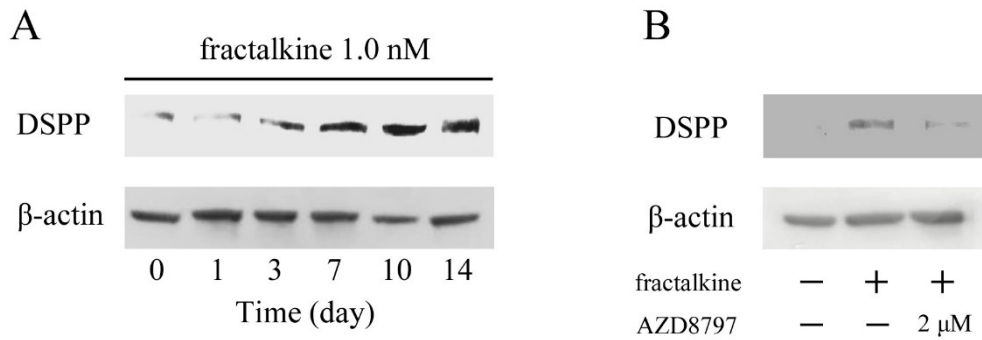


Figure. 8 Changes in DSPP Protein Expression Induced by Fractalkine in Cultured Human Dental Pulp Cells

Cultured human dental pulp cells were treated with and without fractalkine (1.0 nM) for the indicated durations. (A) Cytoplasmic extracts were analyzed for DSPP and β-actin levels using the western blot method. (B) In a separate set of experiments, these cells were pretreated with the CX3CR1 inhibitor AZD8797 (2 μM) for 1 h, followed by treatment with or without fractalkine (1.0 nM) for 10 days.

【Table】

Gene	Primer Sequence	Product size (bp)
fractalkine	Forward 5'-GGATGCAGCCTCACAGTCCT-3'	169
	Reverse 5'-GGCCTCAGGGTCCAAAGAGACA-3'	
BMP-2	Forward 5'-CTGGCTGATCATCTGAACTCCACT-3'	94
	Reverse 5'-TCGGGACACAGCATGCCTTA-3'	
Osterix	Forward 5'-GCCATTCTGGGCTTGGGTA-3'	150
	Reverse 5'-TGTGGCAGGGCCAGAGTCTA-3'	
GAPDH	Forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	138
	Reverse 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

Expression of fractalkine/C-X3-C motif chemokine ligand-1 and CX3CR1 in cultured human dental pulp cells and their effects on inflammation and hard tissue formation

Furuya Natsuko

Department of Endodontics

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

Key words: fractalkine, CX3CR1, hard tissue formation, pulpitis, cultured human dental pulp cells.

ABSTRACT

The pulp is surrounded by dentin, and communication with surrounding tissues is in closed space with only the apical foramen. When pulpitis is induced, the healing process is difficult and often irreversible. The prognosis of inactive teeth is statistically shorter than that of living teeth, and research on pulp-preservation therapy is underway.

Currently, materials predominantly containing calcium, such as calcium hydroxide preparations and mineral trioxide aggregate, are used for direct pulp capping on exposed surfaces. Although these techniques promote healing in the guttation area through the formation of hard capsular tissue, they subject the guttation surface to a highly alkaline environment. This exposure can lead to the formation of a necrotic layer just beneath the guttation surface, which in turn diminishes pulpal activity and results in a low success rate when treating inflamed pulp tissue.

Fractalkine, or C-X3-C motif chemokine (CX3C) ligand 1, is a chemokine primarily expressed in activated vascular endothelial cells. By binding to its receptor (CX3C receptor 1/CX3CR1), fractalkine mobilizes inflammatory cells.

Recent reports indicate that the fractalkine-CX3CR1 pathway might play a role not only in inflammation but also in healing. CX3CR1 promotes granulation tissue formation, collagen deposition, fibroblast accumulation, and angiogenesis, suggesting that the fractalkine-CX3CR1 system might serve as an angiogenic mediator in skin wound healing.

In this study we examined the expression of fractalkine/CX3CR1 at inflammatory sites in human dental pulp tissue. When IL-1 β and LPS were added to cultured human dental pulp cells, fractalkine mRNA and protein expression was observed. Moreover, fractalkine-stimulated increases in COX-2 and PGE₂ protein expression were observed. Furthermore, Alizarin red staining revealed enhanced hard tissue formation. This effect of fractalkine on expression of DSPP protein was inhibited in the presence of the

CX3CR1 inhibitor ADZ8797. In conclusions, fractalkine/CX3CR1 had identified in dental pulp cells at sites of pulp tissue inflammation. Stimulation of inflammatory cytokines and LPS promoted fractalkine mRNA expression levels and produced COX-2, PGE₂ protein, suggesting that it may be involved in the progression of pulpitis. Concurrently, increased expression of BMP-2, Osterix mRNA, and DSPP protein, coupled with Alizarin staining results, suggest its involvement in hard tissue formation.