

機関番号：30110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791946

研究課題名（和文） プラチナナノコロイドの抗菌蛋白質発現について

研究課題名（英文） Induction of antimicrobial proteins by colloid solution of platinum nanoparticles.

研究代表者

長野 二三（NAGANO FUTAMI）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：10534448

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、プラチナナノコロイド（以下 CPN）の抗菌作用に着目し、抗菌蛋白質発現の関与について調べることであった。ヒト初代培養歯肉線維芽細胞（GF）、歯髄線維芽細胞（PF）、ヒト咽頭癌細胞（KB）を、CPN 添加培地で培養し、抗菌蛋白質（S100A7, S100A15, クロモグラニン A）の発現と、その機序を調べた。結果、GF、PF、KB 全ての細胞において、CPN 添加培地で上記 3 種類の抗菌蛋白質の発現が確認された。また、CPN による抗菌蛋白質発現誘導の機序について、MAPK シグナル伝達経路を調べたところ、ERK1/2、p38、JNK、及び ASK の関与がウェスタンブロット法にて確認された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to evaluate the induction of antimicrobial protein, such as S100A7, S100A15 and Chromogranin A by stimulation of colloid solution of platinum nanoparticles (CPN) on human gingival fibroblast, pulp fibroblast and KB cell. We proved that CPN induced the expression of antimicrobial protein. Also we found that the induction of gene expression of all the candidate genes was necessarily bound to the induction of the MAP-Kinase pathway like ERK 1/2, p-38 and JNK as proved by Immunoblotting experiments. ASK involvement as well as the phosphorylation of ASK has been evidenced in our experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料学

1. 研究開始当初の背景

プラチナナノコロイド (Colloid solution of platinum nanoparticles; 以下 CPN と称する) は宮本らが開発した機能性素材であり、直径約 2 nm の白金コロイド粒子の表面にポリアクリル酸ナトリウムやクエン酸ナトリウム等がコーティングされている。CPN は高い活性酸素除去能を有し、新世代の抗酸化剤として期待されている (参考文献: Kajita M et al., Free Radic Res. 41(6):615-26, 2007 and Kim J et al., Mech Ageing Dev. 29(6):322-31, 2008)。

根管治療の際に頻用される次亜塩素酸ナトリウムの酸化作用によって、4-META/MMA-TBB レジンと象牙質との接着強さが低下することが知られている。一方、アスコルビン酸などの抗酸化剤を処理すると接着強さが回復するという報告がある。

申請者は、CPN の持つ抗酸化作用に着目し、4-META/MMA-TBB レジンの象牙質接着において CPN の及ぼす影響を調べた。CPN (200 ppm) ならびに 10 %希釈 CPN (20ppm) を用いてエッチング前後の象牙質面を処理し、スーパーボンド C&B (4-META/MMA-TBB レジン) を塗布し、接着強さを微小引張試験にて行って評価した。その結果、CPN を 1 分歯面処理した試験群の接着強さは、コントロール群と比較して約 2 倍となった。また、CPN で処理した試験材では、コントロール群よりも遥かに長いレジンタグが観察された。

以上の結果から、歯科接着材料を用いた保存修復の前処理剤として CPN は有用であることが示唆された。

また、ナノサイズのプラチナ粒子が成分である CPN は、口腔組織細胞に直接作用し、抗菌作用を発現する可能性があり、う蝕予防効果をもつ材料としての応用も期待できる。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は、CPN がヒト口腔組織の細胞にどのような影響を及ぼすかを、抗菌蛋白質の発現を誘導するかを中心に調べることを目的とした。

まず、CPN を初代培養ヒト歯肉線維芽細胞 (GF)、初代培養ヒト歯髄線維芽細胞 (PF) ならびに口腔咽頭癌細胞株 (KB) に作用した際の細胞への影響のうち、毒性について、CPN 濃度や培養時間を変えて調べる。

次に、CPN 添加培地において、上記細胞が抗菌蛋白質を発現するか否かを調べる。検討する抗菌蛋白質は S100A7、S100A15、Chromogranin A とし、それらの抗体を用いて、抗菌蛋白質を発現するか否かをウェスタンブロット法で調べる。

また、これらタンパク質の発現を誘導する経路を調べるために、MAPK シグナル伝達経路の活性化を調べ、抗菌蛋白質発現の経路を調べる。

3. 研究の方法

(1) CPN の細胞毒性

GF、PF、KB の 3 種類の細胞を、CPN 濃度が 2 ppm、20 ppm の DMEM 培地 (10 % FBS, 1 % ペニシリン-ストレプトマイシン, 0.01 % アンフォテリシン含有) で 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間培養し、細胞の生存率を Alamar Blue、細胞毒性フルオロテストワコー (和光純薬) によって測定した。

(2) CPN の抗菌蛋白質の発現誘導能

2 ppm、20 ppm の CPN を添加した DMEM 培地 (10 % FBS, 1 % ペニシリン-ストレプトマイシン, 0.01 % アンフォテリシン含有) で 24 時間培養し、PBS で洗浄後、RIPA Buffer にて蛋白質を抽出し、S100A7、S100A15、

Chromogranin A の発現をウェスタンブロット法にて調べた。

(3) 抗菌蛋白質の発現誘導経路

CPN 添加培地で培養し、S100A7、S100A15、Chromogranin A の、抗菌蛋白質の発現を誘導する細胞伝達経路について、MAPK ファミリーの発現とそれらのリン酸化について調べるために Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK1/2)、p38、c-jun N-terminal kinase (JNK)、及び ASK のそれぞれについてウェスタンブロット法、in vitro kinase assay を行った。

4. 研究成果

(1) CPN の細胞毒性

GF、PF、KB 全ての細胞において、CPN 濃度が 2 ppm、20 ppm の CPN 添加群共にコントロールと比較して、細胞生存率に有意差は認められなかった。また、培養時間による影響も認められなかった。

(2) CPN の抗菌蛋白質の発現誘導能

CPN 添加培地で 24 時間培養した GF、PF、KB において、S100A7、S100A15、クロモグラニン A の発現が、CPN 無添加培地で培養したコントロール群に比べ、より強く確認された。

さらに、その発現は 20 ppm CPN 添加群の方が 2 ppm CPN 添加群より強く、CPN 添加の濃度に依存して発現が強くなることが示唆された。

(3) 抗菌蛋白質の発現誘導経路

CPN 投与による上記 3 種類の抗菌蛋白質発現の機序について、MAPK シグナル伝達経路を調べたところ、ERK1/2、p38、JNK、及び ASK の関与がウェスタンブロット法にて確認された。また、これらキナーゼのリン酸化は、発現が異なっていることが確認された。

本研究によって、ヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯髄線維芽細胞、ヒト口腔咽頭癌細胞株において、CPN が抗菌蛋白質である S100A7、S100A15、クロモグラニン A の発現を誘導することが示された。今後、CPN の抗菌性について、口腔組織の細胞に対する長期的な影響や、う蝕の原因となる口腔内細菌や歯周病関連菌への直接的な効果、バイオフィーム形成能の抑制効果についてなど、さらなる検討が必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) F. NAGANO, K. ENDO, H. OHNO, M. HASHIMOTO, H. HONGO, Y. MIKAWA, T. MITA, S. HOSHIKA, D. SELIKMOVIC, Y. MIYAMOTO, H. SANO.

Two-kinds of Colloidal-Platinum-Nanoparticles improve the resin/dentin bond-strength using 4-META/MMA-TBB.
The 44 th meeting of the IADR- Continental European Division (CED) together with the Scandinavian Division and Israeli Division.

September 10, 2009, Munich, Germany,

(2) F. NAGANO, M. HASHIMOTO, S. HOSHIKA, D. SELIKMOVIC, Y. MIYAMOTO, H. OHNO, H. SANO, K. ENDO

Priming-effects of colloid solutions of platinum-nanoparticles on 4-META/MMA-TBB resin/ dentin bond- strength.

The 88 th General Session & Exhibition of

the IADR.
July 16, 2010, Barcelona, Spain

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 二三 (NAGANO FUTAMI)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：10534448

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：