

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09971

研究課題名（和文）機能性食品成分プロアントシアニジンの創傷治癒促進効果：老年歯学分野への応用

研究課題名（英文）Facilitation of wound healing by proanthocyanidin: Application in gerodontology

研究代表者

石山 希里香 (Ishiyama, Kirika)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20712904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ポリフェノール的一种であるプロアントシアニジンの水溶液で線維芽細胞モノレイヤー創傷モデルを処理した際に、創閉鎖促進作用が得られるかどうかの検証を行った。0.25～2.0 mg/mLに調製したプロアントシアニジン水溶液でモノレイヤー創傷モデルを処理したところ、生理食塩水で処理を行ったコントロール群よりも創閉鎖が遅くなるという結果が得られた。これは、プロアントシアニジン水溶液中で過酸化水素が生成されることに起因する可能性がある。Amplex Red試薬で過酸化水素生成を分析したところ、水溶液調製後経時的に過酸化水素が生成されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究ではポリフェノール的一种であるプロアントシアニジンの水溶液による短時間処理が線維芽細胞の増殖を促進することが報告されている。線維芽細胞の増殖は創傷治癒と関連性が深いため、プロアントシアニジン処理が創傷治癒促進効果を有するという仮説の検証を本研究で行った。しかしながら、プロアントシアニジン水溶液では創傷治癒促進効果は認められないという結果が得られた。今後は他のポリフェノールあるいは他の天然化合物による創傷治癒促進効果を検証し新しい創傷治癒促進技術の研究を実施する。

研究成果の概要（英文）：This study investigated whether short-term treatment with a proanthocyanidin solution would enhance the closure of a monolayer wound model. Proanthocyanidin was dissolved in pure water at concentrations of 0.25-2.0 mg/mL. The monolayer wound model, established using fibroblasts, was treated with the proanthocyanidin solution for 1, 2, or 3 minutes. The results demonstrated that the treatment did not enhance the closure of the wound model. This might be due to the generation of hydrogen peroxide in the solution, as demonstrated by Amplex Red analysis.

研究分野：老年歯科学

キーワード：プロアントシアニジン 過酸化水素 モノレイヤー創傷モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔内では、外傷、熱傷、咬傷、微生物感染などによる口内炎など多種多様な創傷が発生する。さらに、抜歯や歯周治療などの外科的な歯科治療は、治療の性質上創傷の発生を伴う。これらの創傷は疼痛を伴うことが多く、一時的あるいは永続的に QOL の低下をきたす原因となる。また、創傷部位は二次的な感染の原因ともなるため適切な処置により治癒を促す必要がある。特に、免疫が低下している高齢者などでは、頻繁に創傷治癒遅延が認められるため原因除去療法後の安全かつ簡便な新しい創傷のマネジメント方法の確立が求められている。

申請者の所属する研究グループでは、機能性食品の成分としても注目されているプロアントシアニジンを用いた単回の短時間処理が線維芽細胞の増殖を促進することを発見した¹⁾。細胞抽出物の質量分析 (LC/MS) の結果、短時間処理であっても、線維芽細胞がプロアントシアニジンを取り込んでいることが示唆されており、この取り込まれたプロアントシアニジンが効果を発揮したものと考えられる。

創傷治癒は炎症、細胞増殖、リモデリングの過程を経る。従って、プロアントシアニジンによる線維芽細胞増殖促進効果によって、創傷治癒が促進されることが期待できる。本方法では単回短時間処理によって線維芽細胞増殖促進効果が得られるため、臨床応用の観点から考えても実用性が高く簡便に用いることができる。したがって、プロアントシアニジンを応用した方法は、新たな創傷治癒促進技術として臨床で応用されることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、プロアントシアニジンの創傷治癒促進効果の実証とその作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロアントシアニジンのモノレイヤー創傷モデル閉鎖効果の検証

線維芽細胞を用いてモノレイヤー創傷モデルを作製し、プロアントシアニジンによる創閉鎖の促進効果の評価を行った。実験には、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (V79) を用いた。細胞培養用フラスコ中で MEM 培地を用いて線維芽細胞を増殖させ、90%コンフルエントになったことを確認して実験に供試した。フラスコから培地を廃棄して細胞を PBS で洗浄し、トリプシン/EDTA を用いてフラスコから細胞をはがした。細胞懸濁液の遠心分離を行い、細胞を回収して MEM 培地に再懸濁し $1E+6$ cells/mL に調整した。

モノレイヤー創傷モデルの作製には、CytoSelect Wound Healing Assay Kit (Cell Biolabs) を用いた。Wound Field Insert を 24-well セルカルチャープレートの各ウェルに設置し、インサートの両サイドに $250 \mu\text{L}$ ずつ細胞懸濁液を入れ、 CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ピンセットでインサートを注意深く撤去し、 $250 \mu\text{L}$ の MEM 培地で洗浄した。倒立型位相差顕微鏡で一定幅 (0.9 mm) のギャップ (創傷モデル) が作製されていることを確認して実験に用いた。

プロアントシアニジン (Leucoselect, Indena) を生理食塩水に 0.25 , 0.5 , 1.0 , 2.0 mg/mL となるように溶解し、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで除菌した。各ウェルの培地を廃棄し、テスト群にはプロアントシアニジン溶液を入れ、コントロール群には生理食塩水を入れた。処理時間は 1 , 2 , 3 分間とし、処理後に各溶液を廃棄して MEM 培地で洗浄を行った。最終的に各ウェルに $500 \mu\text{L}$ の MEM 培地を入れて CO_2 インキュベーター内で培養を行った。 24 , 48 , 96 時間の培養後に倒立型位相差顕微鏡を用いて創傷モデルの写真を撮影し、画像解析ソフト Image J を用いて閉鎖度合の評価を行った。また、同様の実験をマウス線維芽細胞 (3T3-L1) と -MEM 培地を用いて実施した。

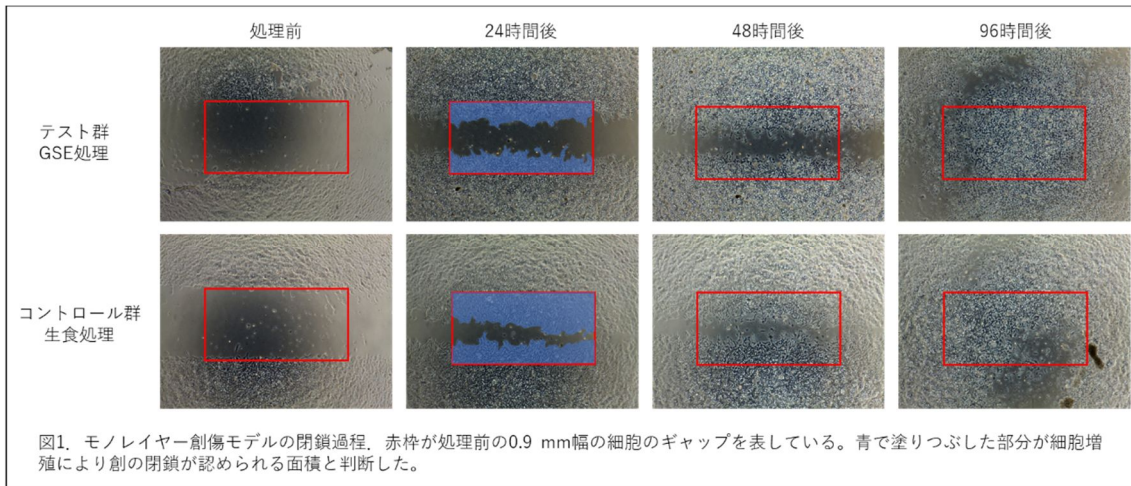
(2) プロアントシアニジン水溶液中の過酸化水素の定量分析

プロアントシアニジンは、青色可視光や紫外線の照射によって酸化され、水溶液中に過酸化水素が生成されることが報告されている²⁾。しかしながら、光照射を伴わない場合のプロアントシアニジン水溶液中での過酸化水素生成反応に関しては未解明な部分が多い。微量の過酸化水素が細胞に軽度酸化ストレスを及ぼし、その後の増殖 (創傷モデルの閉鎖) を促進することが考えられたため、プロアントシアニジン中に生成される過酸化水素の定量分析を行った。プロアントシアニジン水溶液を生理食塩水に 0.5 mg/mL となるように溶解して 37°C のインキュベーター内で反応させた場合に生成される過酸化水素を、Amplex Red 試薬 (ThermoFisher Scientific) を用いて分析した。Amplex Red 試薬は、過酸化水素によって酸化されるとレゾルフィンに代わり、このレゾルフィンの蛍光分析によって高感度で過酸化水素の定量分析を行う方法である。プロアントシアニジン水溶液調製後 24 時間と 48 時間の時点において、メーカー指示に従ってプロアントシアニジン水溶液と Amplex Red 試薬を反応させ、マイクロプレートリーダー (FilterMax F5, Molecular Devices) を用いて 535 nm の励起光で 595 nm 蛍光を測定し、検量線法を用いて定量分析を行った。

4. 研究成果

(1) プロアントシアニジンのモノレイヤー創傷モデル閉鎖効果の検証

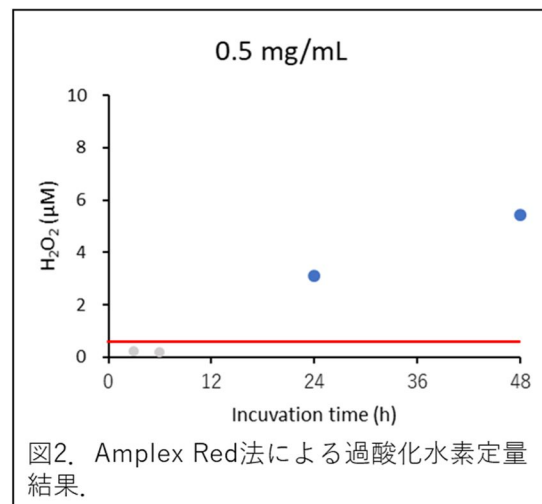
図1にV79を用いたモノレイヤー創傷モデルを0.5 mg/mL プロアントシアニン水溶液で1分処理した場合の創傷閉鎖状態を示す。処理前にはどちらの群においても0.9 mm幅の細胞ギャップ(創傷モデル)が認められた。24時間後の創閉鎖割合を画像解析によって算出したところ、テスト群では平均58.8%、コントロール群では平均74.8%となった。経時的に創閉鎖割合は増加し、96時間培養後にはいずれの群においても完全な創閉鎖が認められた。また、プロアントシアニン濃度や処理時間の影響はほとんど認められなかった。さらに、3T3-L1を用いた実験においても同様の結果が得られた。先行研究では、プロアントシアニン短時間処理による細胞増殖促進効果をMTTアッセイなどで示していたが、本研究で用いたモノレイヤー創傷モデルではプロアントシアニン短時間処理による創閉鎖促進効果は認められないという結果となった。



(2) プロアントシアニン水溶液中の過酸化水素の定量分析

プロアントシアニン処理が上記のモノレイヤー創傷モデルを用いた実験で創閉鎖を遅延させた結果の原因を調べるために、水溶液中の過酸化水素濃度を分析した。ポリフェノールの一種であるプロアントシアニンでは、豊富に存在する水酸基が酸化されて過酸化水素が生成されると考えられる。

過酸化水素の標準液を0.5 mg/mL プロアントシアニン水溶液中に添加して、検量線作成を行ったところ、定量下限は0.625 μM であった。一方、プロアントシアニン水溶液の代わりに超純水を用いた場合の過酸化水素の定量下限は0.08 μM であった。したがって、プロアントシアニンによって励起光や蛍光がプロアントシアニンに吸収される、あるいはAmplex Red試薬が抗酸化作用の強いプロアントシアニンによって酸化されにくくなるために、過酸化水素の定量下限が上昇することが示唆された。そこで、定量下限よりも高い濃度の過酸化水素生成が期待できる24時間後と48時間後に過酸化水素の定量分析を行った。結果を図2に示す。24時間で3.1 μM 、48時間で5.4 μM の過酸化水素生成が認められた。したがって、1時間あたり約0.12 μM の過酸化水素が生成されていることが示唆された。1分間の生成量に換算すると約2nMであり、このような極低濃度の過酸化水素が細胞増殖および創閉鎖に影響を及ぼすのかどうかについて、今後さらなる検証が必要である。



本研究では、「プロアントシアニン水溶液による短時間処理によって創閉鎖が促進される」といった仮説を実証することができなかった。しかしながら、他のポリフェノール(カフェイン酸など)で創閉鎖促進効果を示唆する予備試験のデータが得られた。今後、創閉鎖に最適なポリフェノールの探索と処理条件の最適化が必要であると考えられる。

<引用文献>

- 1) Tsuruya M et al. Appl Biochem Biotechnol, 174, 2223-2235, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅野 太郎 (Kanno Taro) (30302160)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	中村 圭祐 (Nakamura Keisuke) (30431589)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関