

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792128

研究課題名(和文) タンニン酸を応用した生体親和性の高い材料開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental research on the material development of high biocompatibility applying tannic acid

研究代表者

中村 光一 (NAKAMURA, Koichi)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50580932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：グラスアイオノマーセメントはフッ素徐放性を有し、歯髄親和性が高いと言われている。本研究においてまず細胞障害の有無について検討した。RPC-C2A細胞に対してセメント浸出液を作用させた場合、対照群と比較して細胞増殖障害を起こしていないことがわかった。セメント浸出液を作用させる事によりCOX-2 mRNA発現が誘導されたが、タンニン酸の作用により発現が抑制された。グラスアイオノマー浸出液を作用させることによりPGE2の産生量ならびにCOX-2タンパク質およびmRNAの発現の増加、さらにはその上流に存在する細胞内情報伝達系の活性化が認められた。タンニン酸はこれらを抑制することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Glass ionomer cement have a fluoride-releasing. It is said that pulp affinity is high. At first, We examined for the presence of cytotoxic. It was found that COX-2 mRNA expression was induced by cement elution. Tannic acid suppressed the phenomenon. The increased expression of COX-2 mRNA and protein and the production of PGE2 by cement elution. Furthermore, activation of intracellular signal transduction systems present in the upstream was observed. Tannic acid was found to suppress them.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

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：タンニン酸 抗炎症作用 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

乳歯においては永久歯と比較して齲蝕の進行速度が早く、齲蝕は容易に歯髄に達する。齲蝕が歯髄に達し、歯髄炎に罹患した場合、生活歯髄切断もしくは抜髄を行うが、生活歯髄切断においては水酸化カルシウム製剤等が歯髄切断面に、抜髄後では根充材が根尖に直接材料が接する。材料が直接細胞に接するため、その材料には高い生体親和性が求められる。現在の日本ではこれらの処置においては主に水酸化カルシウム製剤が用いられているが、その効果は満足しうるものではなく、MTA セメントやポートランドセメントなど多くの材料が主に海外で開発されている。

タンニン・フッ化物合材(HY材)配合カルボキシレートセメントは日本歯科保存学会の非侵襲性歯髄覆罩のガイドラインにおいて、う窩の細菌数が減少する、齲蝕象牙質が再石灰化する、第三象牙質の形成が認められると述べられている。しかし、HY材またはそれに含まれるタンニン酸の効果に関しては組織学的観察研究にとどまり、細胞内情報伝達系などそのメカニズムに関する研究報告はほとんどされていない。

2. 研究の目的

分子生物学的手法を用いてタンニン酸の歯髄に対する影響のメカニズムを明らかにすることにより、タンニン酸の効率の良い応用法を検索する。

3. 研究の方法

(1) 歯冠修復材料とセメント浸出液の作製。セメントは充填用ガラスアイオノマーセメント(ガラスアイオノマーセメント F、松風)を使用した。本セメントはタンニン酸を含有しており(HY(+))、タンニン酸を含有していないもの(HY(-))も使用した。セメントはメーカーの指示通りに練和し、直径6mm、高さ3mmのテフロンモールドに充填してディスク状にした後に、紫外線照射下で24時間、室温にて硬化させた。硬化した試料を3mlのDMEM培地に7日間浸漬し、その上清をセメント浸出液とした。

(2) 細胞はラット歯髄由来RPC-C2A(RPC)細胞を使用し、10%牛胎仔血清(FBS)を添加したDulbecco's modified eagle medium(DMEM)(対照群)あるいはセメント浸出液(実験群)を用いて通法に従い培養した。

(3) RPC-C2A細胞をDMEM培地にて96穴プレートに播種し、培養液をセメント浸出液と交換し、24、48時間後に細胞内ATP量の測定を行った。測定はViaLight Plus® Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kit(Lonza)を用い、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ(PerkinElmer)にて蛍光量の測定を行った。

(4) 100mmプラスチックディッシュを使用してRPC-C2A細胞を70%コンフルエンスまで培養した後、セメント浸出液を3、6、12

時間作用させ、TRIzol® Reagent(Invitrogen)を用いてtotal RNAを抽出した。cDNA合成はRever Tra Ace-α-TM(東洋紡績)を用いて行った。PCR反応はAmpliTag Gold®(Applied Biosystems)を用いて、PCR System 9700(Applied Biosystems)により行った。プライマーはCOX-2、GAPDH、L19を用いた。臭化エチジウム含有1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、PCR増幅産物を紫外線照射下で確認した。バンド強度はPhotoshop Elements 2.0(Adobe Systems Inc)を用いて数値化した。

(5) 96穴プレートにRPC-C2A細胞を播種し、セメント浸出液を3、6、12、24時間作用させ培養上清を回収した。培養上清中のPGE2量の測定はProstaglandin E2 Enzymeimmunoassay system(GE Healthcare)を使用した。

(6) 100mmプラスチックディッシュにて各種セメント浸出液でRPC-C2A細胞を90%コンフルエンスまで培養した後、Lysis buffer(10mM HEPES-KOH(pH7.5), 100mM KCl, 0.1% NP-40)で細胞を溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質濃度はDC Protein Assay(Bio-Rad)を用いて定量した。15µgのタンパク質抽出液を10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動して分離した後、polyvinylidene difluoride(PVDF)膜(Millipore Corporation)に転写した。転写したPVDF膜はイムノブロック(DSファーマバイオメディカル、大阪)で室温にて1時間ブロッキング反応を行った後、TBS-T(40mM Tris-HCl(pH7.4), 0.9% NaCl, 0.3% Tween20)にて、15分間1回、5分間3回洗浄して一次抗体と4℃で16時間反応させた。一次抗体は、抗ヤギCOX-2ポリクローナル抗体、抗マウスp-IκBαモノクローナル抗体、抗マウスp-p38モノクローナル抗体および抗マウスp-ERKモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。ブロッキング後と同様に膜を洗浄した後に二次抗体で室温で1時間反応させた。二次抗体はHRP標識抗ヤギIgG抗体、HRP標識抗マウスIgG2b抗体、HRP標識抗マウスIgM抗体、HRP標識抗マウスIgG2a抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。actinの検出にはHRP標識抗ヤギactinポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。一次抗体の場合と同様に洗浄した後にChemiluminescence reagent plus(Perkin Elmer)を用い化学発光によりバンドの検出を行った。バンド強度の比較にはScionimage(Scioncorporation)を用いた。

(7) lipopolysaccharide(LPS)刺激に対するタンニン酸の作用について。LPS(10ng/ml)含有mediumにタンニン酸を各濃度(1,10,100nM)添加し、RPC-C2A細胞を24時間培養した後に、cell proliferation reagent wst-1で評価した。

(8) 石灰化に対する影響の検索。MC3T3E1細胞

胞にタンニン酸を作用させ、アリザリン染色を行い、石灰化の評価を行った。

4. 研究成果

(1) セメント成分の刺激による細胞内 ATP 量の変化について検討した。セメント浸出液による刺激後 24 時間では HY(+)群ならびに HY(-)群で対照群と比較して有意な細胞増殖促進が認められたが、48 時間後では有意差は認められなかった (図 1)。

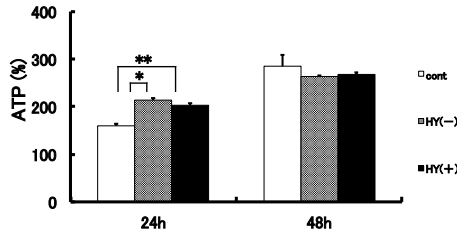


図 1 ATP 量の変化

(2) セメント浸出液の刺激により COX-2 mRNA の発現が誘導され、HY(-)において刺激後 3 時間で刺激前と比較して約 1.6 倍に増加し、ピークに達したが、その後徐々に減少した。HY(+)では 3 時間後に約 1.3 倍に増加し、HY(-)と同様の発現傾向を示したが、全ての時間で HY(-)と比較して発現の減少が認められた (図 2)。また、HY(-)のセメント浸出液に HY(+)のセメント浸出液を混合し、HY(+)の割合を増加させると濃度依存的に COX-2 mRNA 発現の減少が認められた。さらに、HY(-)のセメント浸出液にタンニン酸を添加すると、濃度依存的に COX-2 mRNA 発現が減少し、1000 nM では発現が約 30% 程度に達してほぼ飽和状態となった (図 3)。

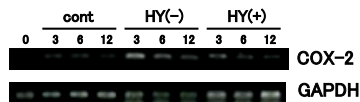


図 2 COX-2 mRNA 発現量の変化

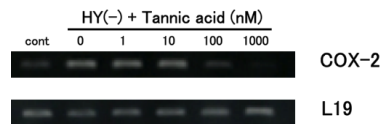


図 3 タンニン酸を添加した際の COX-2 mRNA 発現量の変化

(3) 培養上清中の PGE2 量の測定結果。HY(-)群で培養液中の PGE2 量の増加が認められた。HY 材を添加することにより (HY(+)群) その産生量は減少し、刺激後 12 時間、24 時間では有意差が認められた (図 4)。

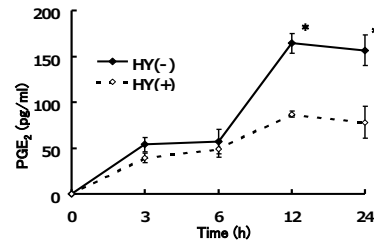


図 4 PGE2 産生量

(4) セメント浸出液による COX-2 タンパク質発現と細胞内情報伝達系への作用。歯髄細胞にセメント浸出液を作用させると COX-2 の発現は刺激後 120 分では HY(-)、HY(+)ともに発現の増加が認められた。240 分において HY(-)では依然発現が認められたが、HY(+)では発現が著しく減少していた。IkBα のリン酸化は HY(-)では刺激後 120 分で HY(+)の 1.8 倍に増加していた。一方、HY(+)では 240 分後には刺激前と同程度まで減少した。また、ERK は HY(-)においてわずかなリン酸化が認められたが、HY(+)ではほとんど観察されなかった。さらに、HY(-)では p38 のリン酸化の経時的な増加が認められ、240 分では刺激前の約 5.1 倍に達した。一方、HY(+)では今回調べた全ての時間において発現の誘導はほとんど見られなかった。

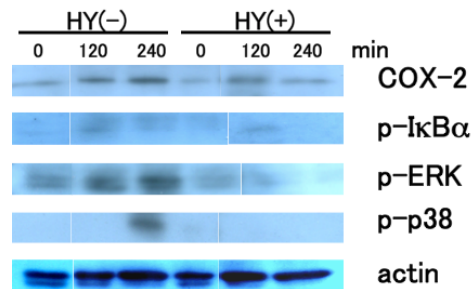


図 5 ウェスタンブロッティングの結果

(5) LPS 刺激により RPC-C2A 細胞の生存率は 80%程度となった。タンニン酸の作用により、90%以上まで増加した。このことから、タンニン酸は LPS による細胞増殖抑制を抑制することが明らかとなった (図 6)。

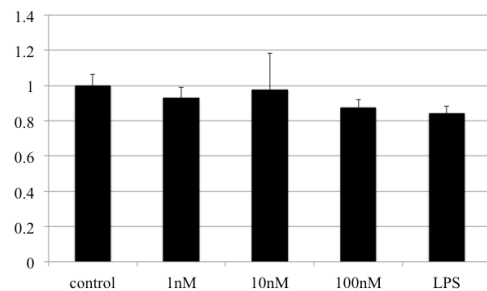


図 6 wst-1 結果

(6) MC3T3E1 細胞を 1 ヶ月培養したが、タンニン酸の添加による明らかな石灰化誘導

は確認されなかった。

(7) グラスアイオノマーセメントはフッ素徐放性を有し、歯髄親和性が高いと言われている。本研究においてまず細胞障害の有無について検討した。RPC-C2A 細胞に対してセメント浸出液を作用させた場合、対照群と比較して細胞増殖障害を起こしていないことがわかった。ある種の化学物質やサイトカインなどが細胞に作用すると細胞膜のリン脂質の代謝を生じ、アラキドン酸カスケードが活性化して、PGE2 の産生を生じる。COX はその過程に関与する重要な酵素であり、産生された PGE2 は炎症のケミカルメディエーターとして作用している。そこで本研究では COX-2 に着目して、グラスアイオノマーセメント浸出液の歯髄細胞における COX-2 発現に与える影響について検討した。セメント浸出液を作用させる事により COX-2 mRNA 発現が誘導されたが、タンニン酸の作用により発現が抑制された。一方で、RAW 細胞において 100 μ M のタンニン酸が COX-2 の発現を増強したとの報告もある (Rapizzi E, et al: Inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase by gallotannin selectively up-regulates expression of proinflammatory genes. Mol Pharmacol 66:890-898, 2004.)。本研究で用いた低濃度では COX-2 mRNA の発現を抑制するが、高濃度ではその発現を増強する可能性が示唆された。本研究により、グラスアイオノマー浸出液を作用させることにより PGE2 の産生量ならびに COX-2 タンパク質および mRNA の発現の増加、さらにはその上流に存在する細胞内情報伝達系の活性化が認められた。タンニン酸はこれらを抑制することがわかった。一方で石灰化には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

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 0 件)

〔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

中村 光一 (NAKAMURA, Koichi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 50580932

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし