

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792177

研究課題名（和文） カテキンの抗炎症・抗菌作用を応用した新規歯髄保護療法の開発

研究課題名（英文） Development of new dental pulp protection therapy by anti-inflammatory effect of catechin

研究代表者

平尾 功治（HIRAO KOUJI）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00581399

研究成果の概要（和文）：歯髄炎は、主にう蝕病巣から象牙細管を通じて、う蝕関連細菌の病原因子が歯髄組織へ波及し生じる感染症であり、その進行には、種々のサイトカインや炎症性メディエーターが関与する。今回の研究において、カテキンは、歯髄細胞において、自然免疫レセプターのリガンド刺激にて発現が増強した、HMGB1 や MINCLE といった細胞傷害に関与するメディエーターの発現を抑制させることが明らかとなった。また、カテキンはこれらリガンドのレセプターへの結合を阻害する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Pulpitis, dental pulpal inflammation, is mainly associated with the dental caries-related pathogen invaded into dentinal tubules. Many types of cytokines and inflammatory mediators are induced for the initiation and progression of pulpitis. This study has demonstrated that HMGB1 and MINCLE were up-regulated by the stimulation with the ligands of innate immune receptors and the up-regulated expression of these mediators was inhibited by catechin. Moreover, this study was suggested that the binding of pathogen on cell surface receptors were inhibited by catechin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：自然免疫、カテキン、抗炎症作用、歯髄保護、歯髄炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年の超高齢化社会と呼ばれる時代において、口腔機能の改善を通じてQOL向上を図ろうとする取り組みが行われている。特に、21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）において、8020運動の推進が掲げられ、多数の歯を残そうという取り組みが行われている。

歯を喪失する主な疾患としてう蝕と歯周病が挙げられるが、歯髄炎はう蝕に継発する感染症であり、早期に歯髄組織の不可逆性変化を引き起こし、除去療法の適応となる。し

かし、歯髄を除去された失活歯は破折等の転機を辿ることも少なくなく、その予後は必ずしも良好とはいえない。

そのため、近年、歯髄保存の機運が高まっており、歯髄炎の病態の把握や歯髄保存のための新規材料の開発が行われている。申請者は、これまでに培養歯髄細胞を用いた歯髄炎モデルにおいて、LPS や PGN などの細菌由来因子の各種炎症性サイトカイン発現誘導のメカニズムや、自然免疫反応の歯髄炎における役割について解析し、培養歯髄細胞において IL-8 や IL-6, MCP-1, CXCL-10, Prostaglandin E2 (PGE2) といったサイトカ

イン・ケモカイン類が、自然免疫反応に関わるレセプターである Toll-like receptor (TLR)2, TLR4, Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)2 を介して産生されることを報告している (Hirao et al. J Dent Res. 2009)。また、近年 Heat shock proteins (HSPs)や High mobility group box 1 (HMGB1)等の alarmin と総称される細胞内蛋白質や、抗菌ペプチドが、自然免疫に関連して産生されるとの報告もある。

カテキンはポリフェノール類の一種であり、主に、Catechin、Gallocatechin (GC)、Epicatechin (EC)、Epigallocatechin (EGC)、Epicatechin gallate (ECG)、Epigallocatechin gallate (EGCG)の5種が緑茶中に多く含まれる (Kim et al. Biol Pharm Bull. 2006)。その中でも、ECG、EGCGには抗炎症作用があることが知られており (Crespy et al. J Nutr. 2004)、近年、申請者らは培養歯髄細胞において、ECG、EGCG が LPS 等の自然免疫に関与する細菌由来物質によって産生された炎症性サイトカインや接着分子の発現を抑制することを報告した (Nakanishi et al. Eur J Oral Sci. 2010, Hirao et al. Life Sci. 2010)。さらに、カテキンは抗菌作用を有することも知られており (Hamilton-Miller JM et al. J Antimicrob Chemother. 2000)、口腔細菌に対する抗菌作用も報告されている (Sasaki H et al. Caries Res. 2004)。カテキンが細胞に与える影響には、67 kDa ラミニンレセプター (67LR) の関与が疑われている (Tachibana H et al. Nat Struct Mol Biol. 2004)が、その詳細なメカニズムは依然明らかとなっていない。

臨床的に抗菌作用・抗炎症作用を共に有する覆髄剤は未だに開発されておらず、カテキンを覆髄材として歯髄炎に応用することで、抜髄ひいては歯の喪失を予防できる可能性が示唆される。カテキンを歯髄炎に応用するにあたっては、歯髄細胞や口腔細菌に対するカテキンの影響を解析するとともに、その詳細な作用機序の解明や、動物実験による in vivo での効果の解析が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯髄をより積極的に保存する方法を検討すべく、抗炎症作用・抗菌作用を有し、一般に広く受け入れられやすいと考えられる緑茶カテキンに着目し、カテキンが歯髄細胞やう蝕原性細菌に与える影響を解析するとともに、カテキンの抗炎症作用における作用機序の解明と、露髄面におけるカテキンの抗炎症作用と歯髄保護の効果を検討する。ために動物実験を行い、カテキンの覆髄剤としての

臨床応用の可能性を検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

①ヒト培養歯髄細胞(HDPC)は、徳島大学病院歯科を受診し、抜去智歯または矯正目的による便宜抜去歯でう蝕及び歯周炎を有さない健全歯より歯髄を摘出・細切した後、1mM ピルビン酸ナトリウム、10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)にて 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 °Cにて初代培養を行い、5~10 代継代したものを実験に供した。(徳島大学倫理委員会 承認番号 329)

②ラット象牙芽細胞様細胞として、KN-3 細胞を使用した。なお、培養には 10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したα-Eagle's Minimal Medium を用い、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 °Cにて培養した。

③ヒト単球系細胞株として、THP-1 細胞を用いた。培養には、10 % FBS、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 培地にて、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 °Cにて培養した。

### (2) 口腔細菌の培養

口腔細菌として、*Streptococcus mutans* UA159 株を用いた。*S. mutans* は Brain Heart Infusion (BHI) 培地を用い、37°Cにて 8 時間培養し、継代した後、再度 8 時間培養したものを実験に供した。

### (3) PAMPs 刺激における、歯髄細胞の炎症反応とカテキンの抗炎症作用の解析

24 穴プレートに各細胞を播種し、サブコンフルエントまで培養した後、2% FBS 含有培地に交換し、24 時間経過後に自然免疫に関与するレセプターのリガンド(PAMPs; Pam3CSK4, LPS, MDP)やサイトカイン(IL-1β, TNF-α)、口腔内細菌(*S. mutans* UA159 株)にて刺激すると同時にカテキン (EGCG)にて処理を行った。一定時間経過後、培養上清、total RNA、ならびに細胞蛋白を回収した。

培養上清は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法を用い、そのプロトコールに従い、培養上清中のサイトカイン濃度の定量を行った。

total RNA は NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL, Germany)を用い、回収・精製後、PrimrScript RT Master Mix (タカ

ラバイオ、滋賀)にて cDNA 合成を行い、半定量的 RT-PCR ならびに real-time RT-PCR 法にて mRNA の発現解析を行った。

細胞蛋白は、RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, USA)にて回収し、BCA 法を用い蛋白濃度を定量後、SDS-PAGE を行い、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法にて蛋白発現の解析を行った。

#### (4) フローサイトメトリー法

培養細胞を Trypsin-EDTA 溶液にて回収し、4% パラホルムアルデヒドにて固定後、特異的抗体にて 1 次標識を行った。FITC 標識された 2 次抗体にて反応後、フローサイトメーター (EPICS XL; Beckman Coulter, USA)を用い、細胞膜上に発現する蛋白の解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養歯髄細胞に対するカテキンの細胞障害性

カテキンを臨床応用するにあたり、生体への為害性がないことを確認するため、培養ヒト歯髄細胞ならびに KN-3 細胞に 0~100  $\mu\text{g/ml}$  までのカテキンを一定時間作用させ、細胞が傷害されると培養上清中に分泌される、Lactate dehydrogenase (LDH) を LDH Cytotoxicity Assay kit (Cayman, USA)を用いて測定した。その結果、EGCG は HDPC において 50  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で、KN-3 細胞においては 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度において LDH を放出させ、細胞障害性を認めた (図 1)。

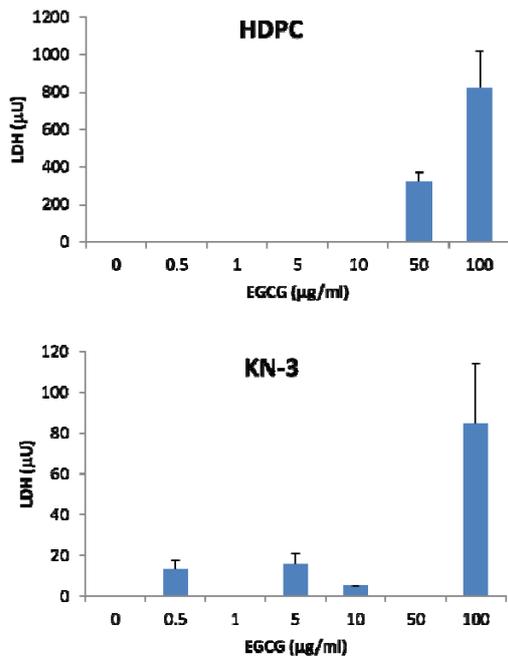


図1 カテキンの細胞障害性

そのため、以後の実験においては、細胞障害性を認めない 10  $\mu\text{g/ml}$  程度の EGCG を用い実験を行った。

#### (2) 歯髄細胞に対するカテキンの抗炎症作用の解析

培養歯髄細胞を自然免疫に関与するレセプターのリガンドである各種細菌関連因子 (PAMPs; Pam3CSK4, LPS 等)によって刺激し、細胞が傷害されると放出される HMGB1 の産生を ELISA 法にて解析したところ。カテキンは PAMPs 刺激によって生成された HMGB1 の産生を抑制することが明らかとなった。

さらに、THP-1 細胞において、細胞が傷害されると核内から細胞外へと放出される Spliceosome associated protein 130 (SAP130) を認識し、炎症反応に関与するとされる Macrophage Inducible C-type Lectin (Mincle) の mRNA 発現も PAMPs 刺激によって増強され、カテキンが抑制することが明らかとなった。これらの結果は、カテキンが炎症反応のみならず、細胞傷害も抑制することを示唆するものであり、カテキンの歯髄保護への応用に対し期待できる成果である。

一方、ラット象牙芽細胞様細胞である KN-3 細胞においては、PAMPs 等のリガンド刺激や *S. mutans* 刺激において、サイトカインの産生は認められなかった。そこで、PAMPs 刺激における、MAPK family (p38 MAPK, ERK1/2, SAP/JNK) のリン酸化をウエスタンブロット法を用い確認したところ、PAMPs 刺激による MAPK family のリン酸化は確認された。これらの結果は、KN-3 細胞においては PAMPs 刺激に対して、シグナル経路の活性化は認めるものの、何らかの阻害因子により炎症性サイトカインの産生は抑制されていることを示唆するものである。

また、KN-3 細胞を TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ にて刺激を行ったところ、ケモカインである CCL-20 を濃度依存的に産生することが明らかとなり、カテキンはこの CCL-20 産生を抑制することも明らかとなった (図 2)。

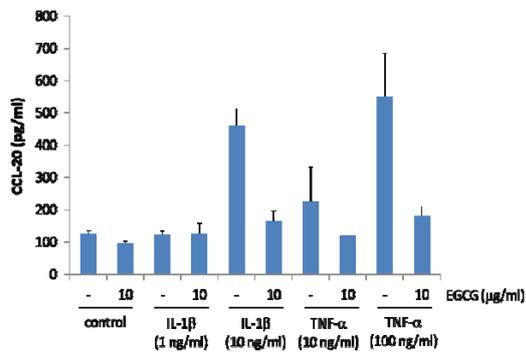


図2 KN-3細胞におけるCCL-20産生

KN-3 細胞における以上の結果は、う蝕からの細菌感染を第一に認識する象牙芽細胞特有の反応である可能性があり、非常に興味深い。

### (3) カテキンの抗炎症作用のメカニズムの解析

近年、カテキンの抗がん作用、抗炎症作用において、67-kDa Laminin Receptor (67LR) の関与が報告されている。そこで、フローサイトメトリー法にてヒト培養歯髄細胞の 67LR 蛋白発現を調査したところ、細胞膜表面での 67LR 蛋白発現は認められなかった。また、67LR と関連してカテキン処理にて増加し、カテキンの抗炎症作用を調節するとされる、Tollip の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて確認したところ、その発現量にも変化は認められなかった。

一方、カテキンは細胞膜の脂質二重膜に非特異的に結合するとの報告がなされている。そこで、カテキン処理した培養ヒト歯髄細胞を蛍光標識を行った Pam3CSK4 にて刺激し、その蛍光強度を測定したところ、カテキン処理濃度に反比例して、蛍光強度は減弱した (図3)。これは、カテキンが細胞膜表面に結合することで、Pam3CSK4 のレセプターへの結合を抑制し、抗炎症作用を示すことを示唆するものである。

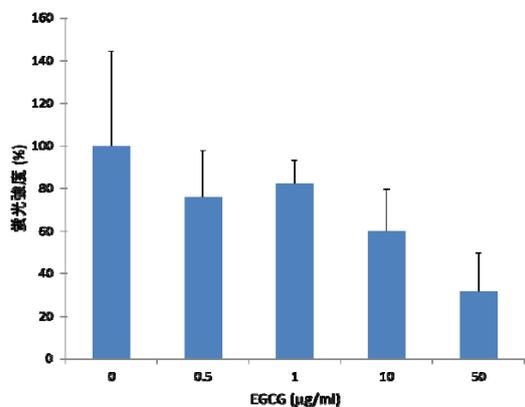


図3 Pam3CSK4のレセプター結合に対するカテキンの影響

## 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1件)

①平尾功治、歯髄炎発症における自然免疫機構の役割と緑茶カテキンの歯髄炎抑制効果の検討、四国歯学会雑誌、査読無、24(2)、2012、21-27、

[学会発表] (計6件)

① T Nakanishi、Prostaglandin F2-alpha Regulates Cytokine Expression in Dental Pulp Cells、91th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research、2013. 3. 23、Washington State Convention & Trade Center、Seattle (USA)

② D Takegawa、Interferon-gamma modulates the immune response of dental pulp cells、91th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research、2013. 3. 23、Washington State Convention & Trade Center、Seattle (USA)

③ 中西 正、ProstaglandinF2αは歯髄細胞における炎症性メディエーター発現を増強する、日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第136回)、2012. 6. 29、沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

④ K Hirao、Global Gene Analysis in Monocytes Stimulated with Streptococcal Histone-Like Protein、90th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research、2012. 6. 21、Foz do Iguazu Convention Center、Iguazu falls (Brazil)

⑤ Katsuhiko Hirota、GENE EXPRESSION PROFILING OF HUMAN MONOCYTIC THP-1 CELLS STIMULATED WITH EXTRACELLULAR STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS HISTONE-LIKE DNA BINDING PROTEIN、International Union of Microbiological Societies 2011 congress、2011. 9. 7、札幌コンベンションセンター (北海道)

⑥ 武川 大輔、ヒト培養歯髄細胞の自然免疫応答に対するインターフェロンγの影響、日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第134回)、2011. 6. 9、東京ベイ舞浜ホテルクラブリゾート (千葉県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平尾 功治 (HIRAO KOUJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00581399