

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592228

研究課題名(和文) 歯髄保存療法への緑茶カテキン応用に関する研究

研究課題名(英文) Study on a therapeutic application of tea catechins to vital pulp treatment.

研究代表者

中西 正 (NAKANISHI TADASHI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：00217770

研究成果の概要(和文)：

むし歯が進行すると、歯髄組織に炎症が生じ、歯髄炎を発症する。進行した歯髄炎の治療は歯髄除去が一般的であるが、歯髄除去された歯は将来的に破折のリスクが高まるとされる。本研究では、カテキンを応用した歯髄保存療法の開発を目的とし、歯髄細胞を用いて種々の細菌関連因子による刺激を行ったときのカテキンの影響を検討した。その結果、カテキンは歯髄細胞から誘導される炎症関連物質の産生を抑制することが示され、歯髄炎の治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Caries progression induces pulp tissue to inflammation, which can develop pulpitis. The treatment for severe pulpitis is commonly pulpectomy, but it is thought that teeth stripped of pulp increased fracture risk in the future. The purpose of this study was development of the pulp preservation therapy using catechin, and we evaluated the effect of catechins on dental pulp cells stimulated with various bacteria-related factors. As a result, we showed that the catechins inhibited the expression of inflammatory factors in the dental pulp cells, and this finding suggested that they could be applied in the treatment of pulpitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：歯内療法学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：カテキン、歯髄炎、歯髄細胞、抗炎症作用、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎における細菌侵襲の実態や歯髄免

疫応答のメカニズムを理解することは、歯髄保存適否の診断基準を確立するうえで必要不可欠であると考え、本研究開始前までに、侵襲側であるう蝕細菌と防御側である歯髄免疫機構とが反応する露髄部における侵入細菌の特定や免疫系細胞の局在の一端を明らかにしてきた。申請者らは、得られた歯髄炎の病態に関する知見を踏まえたうえで、歯髄をできる限り積極的に保存する方法を検討すべく、抗菌作用に加え抗炎症作用も有するとされるポリフェノール的一种である緑茶カテキンに着目した。研究開始当初、歯科領域においてカテキンの作用を検討したものとして、抗う蝕効果に関する研究が少数報告されていたが、抗炎症性作用に着目し追求した報告はなされていなかった。さらに、歯髄に対するカテキンの作用について検討した報告は全くなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯髄保存療法的一端を担う新しい治療法として、緑茶カテキンを歯髄炎病変部に応用する方法を開発するため、歯髄組織を構成する中心的細胞である歯髄（線維芽）細胞を主に用いて、細菌あるいは細菌関連因子に曝されたこれらの細胞に対するカテキンの作用について検討することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 細菌関連因子刺激をうけた歯髄細胞における炎症関連物質および接着分子発現に及ぼすカテキンの影響： 健全な歯髄を有する抜去歯より歯髄を摘出し、初代培養を行い、5~10代継代したものを歯髄細胞として、実験に供した。細菌関連因子として、Toll-like receptor (TLR) 4リガンドであるリポポリサッカライド (LPS) やTLR2リガンドであるペプチドグリカンあるいはPam3CSK4を用い、細胞を刺激したときの炎症関連物質（血管内

皮成長因子 (VEGF), インターロイキン (IL)-8, IL-6 やシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の mRNA 発現ならびにタンパク発現に対するカテキン (エピガロカテキンガレート; EGCG、エピカテキンガレート; ECG) の影響を RT-PCR ならびに ELISA にて検討した。さらに、接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) 発現に対する影響についてもフローサイトメトリー法により検討した。また、石灰化誘導培地を用いて誘導させた象牙芽細胞様細胞や単球様 cell line である THP-1 細胞についてもカテキンの影響を検討した。

(2) 細菌関連因子刺激時の歯髄細胞におけるシグナル伝達物質のリン酸化に対するカテキンの影響： 炎症関連物質の発現に関与の深いシグナル伝達経路 (MAP Kinase; ERK1/2, p38 MAP kinase, JNK/SAPK, nuclear factor - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)) について、各経路特異的阻害剤で前処理してから TLR リガンドにて刺激した歯髄細胞における炎症関連物質の産生を定量した。また、シグナル伝達物質のリン酸化に対するカテキンの影響をウエスタンブロット法にて検討した。

(3) 67-kD ラミニンレセプター (67LR) の歯髄細胞における発現： カテキンの歯髄細胞に対する作用が、カテキンのレセプターとして確認されている 67LR を介した反応か否かを確かめるため、歯髄細胞におけるレセプター発現の有無ならびにその発現誘導についてウエスタンブロットおよびフローサイトメトリーを用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト培養歯髄細胞を用いて、TLR リガンドを中心とした自然免疫反応に関与する因子による刺激を行ったとき

の成長因子やサイトカイン発現に対するカテキン (EGCG および ECG) の影響について検討したところ、VEGF, IL-8, IL-6 や COX-2 の mRNA ならびにタンパク発現は、EGCG および ECG のいずれのカテキンにおいても濃度依存的に有意に減少した。また、接着分子発現についてフローサイトメトリー解析したところ、ICAM-1 および VCAM-1 発現はカテキン濃度依存的に有意に減少していた。さらに、リンパ球浸潤に関与するケモカインであり歯髄炎の病態形成に重要な役割を担っている可能性がある CXCL10 発現についても検討したところ、カテキン濃度依存的に CXCL10 発現は有意に減少した。う蝕関連細菌である *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* にて歯髄細胞を刺激したときの IL-8 産生もカテキンは抑制し、加えて、象牙牙細胞様細胞様細胞に対し TLR リガンド刺激したときの IL-8 産生や、THP-1 細胞に対し TLR リガンド刺激したときの COX-2 発現についてカテキンの影響を検討したところ、カテキンはこれらの産生・発現についても抑制させた。これらの結果より、カテキンが有している抗炎症効果は歯髄に対しても歯髄に対しても有効であることが示された。

(2) カテキンの培養歯髄細胞に対する抗炎症効果のメカニズムを解明するために、細菌関連因子刺激時の歯髄細胞におけるシグナル伝達経路について、カテキンが及ぼす影響を解析した。まず、ヒト培養歯髄細胞を用いて、各シグナル伝達経路特異的阻害剤 で前処理後、Toll-like receptor (TLR) リガンドの一つである Pam3CSK4 にて刺激したときの

サイトカイン産生 (IL-8, IL-6) を定量したところ、p38 MAP kinase, JNK/SAPK あるいは NF- $\kappa$ B 阻害剤にてその産生が抑制された。また、Pam3CSK4 刺激時の培養歯髄細胞におけるシグナル伝達物質のリン酸化をウエスタンブロット法にて検討したところ、ERK1/2, p38 MAP kinase, JNK/SAPK のリン酸化が認められ、cytosol において NF- $\kappa$ B と complex を形成する I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化も認められた。さらに、カテキン (EGCG および ECG) の影響について検討したところ、Pam3CSK 刺激による ERK1/2, p38 MAP kinase, JNK/SAPK のリン酸化ならびに I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が抑制された。その効果は、EGCG の方が ECG より強かった。これらの結果から、Pam3CSK 4 刺激した培養歯髄細胞において、NF- $\kappa$ B や ERK1/2, p38 MAP kinase, JNK/SAPK 経路が活性化され、IL-8, IL-6 などのサイトカイン産生が増強されるが、これらのシグナル伝達経路の活性化はカテキンにより抑制されることが明らかとなった。

(3) カテキンの歯髄細胞に対する作用が、カテキンのレセプターとして確認されている 67LR を介した反応であるか否かを確かめるため、ヒト培養歯髄細胞における 67LR の発現をウエスタンブロット法ならびにフローサイトメトリーを用いて解析したところ、その発現は認められなかった。さらに、TLR リガンドである LPS や Pam3CSK4 にて刺激したときの 67LR 発現を検討したが、その発現は誘導されなかった。これらの結果より、歯髄細胞の活性化反応に対するカテキンの抑制作用は、67LR 経路非依存的であり、他の経路により効果が発揮されていることが示唆された。

以上の成果は、カテキンを歯髄病変部に  
に應用する歯髄保存療法の開発に際し、  
実際の歯髄炎病態像を想定したうえで  
の細胞レベルにおける知見が得られた  
と確信しており、臨床応用に向かうため  
の基盤になるものと考えている。国内外  
問わず、歯髄に対するカテキンの作用を  
示した研究は現時点でも存在しない。今  
後は抗炎症に加え、組織を修復させる機  
能を積極的に導き出せるか否かについ  
て検討することを考えている。

#### 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8件)

- ① T. Nakanishi, K. Mukai, H. Yumoto,  
K. Hirao, Y. Hosokawa, T. Matsuo.  
Anti-inflammatory effect of  
catechin on cultured dental pulp  
cells affected by bacteria-derived  
factors. Eur J Oral Sci 118, 145-150,  
(2010) (査読有)
- ② 中西 正. 歯髄炎の病態形成における  
細菌侵襲と歯髄の反応性. 日歯保存誌  
53, 489-491, (2010) (査読なし)
- ③ K. Hirao, H. Yumoto, T. Nakanishi, K.  
Mukai, K. Takahashi, D. Takegawa, T.  
Matsuo. Tea catechins reduce  
inflammatory reactions via  
mitogen-activated protein kinase  
pathways in toll-like receptor 2  
ligand-stimulated dental pulp cells.  
Life Sci 86, 654-660, (2010) (査読  
有)
- ④ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki,  
T. Nakanishi, H. Nakae, T. Matsuo.  
Tea polyphenol inhibit IL-6  
production in tumor necrosis factor  
superfamily 14-stimulated human  
gingival fibroblasts. Mol Nutr Food  
Res 54, S151-S158, (2010) (査読有)
- ⑤ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki,  
T. Nakanishi, H. Nakae, T. Matsuo.  
Catechins inhibit CXCL10 production  
from oncostatin M-stimulated human

gingival fibroblasts. J Nutr Biochem  
21, 659-664, (2010) (査読有)

- ⑥ Y. Hosokawa, I. Hosokawa, K. Ozaki,  
T. Nakanishi, H. Nakae, T. Matsuo.  
Catechins inhibit CCL20 production  
in IL-17A-stimulated human gingival  
fibroblasts. Cell Physiol Biochem 24,  
391-396, (2009) (査読有)
- ⑦ K. Hirao, H. Yumoto, K. Takahashi, K.  
Mukai, T. Nakanishi, T. Matsuo.  
Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1  
in pulp fibroblasts. J Dent Res 88,  
762-767, (2009) (査読有)
- ⑧ K. Takahashi, T. Nakanishi, H.  
Yumoto, T. Adachi, T. Matsuo. CCL20  
production is induced in human  
dental pulp upon stimulation by  
*Streptococcus mutans* and  
pro-inflammatory cytokines. Oral  
Microbiol Immunol 23, 320-327,  
(2008) (査読有)

[学会発表] (計11件)

- ① 中西 正 他、ヒト歯髄細胞におけるサ  
イトカイン発現に対する Prostaglandin  
F<sub>2α</sub>の影響、日本歯科保存学会 2010 年  
度秋季学術大会 (第 133 回)、2010 年 10  
月 28 日、長良川国際会議場 (岐阜県)
- ② Nakanishi T, et al、Catechins  
suppress cyclooxygenase-2 expression  
in human dental pulp cells、2010 IADR  
General Session、2010 年 7 月 17 日、バ  
ルセロナ (スペイン)
- ③ Takegawa D, et al、Interferon-gamma  
enhances toll-like receptor  
ligand-induced cytokine production in  
pulpal cells、2010 IADR General  
Session、2010 年 7 月 16 日、バルセロナ  
(スペイン)
- ④ 武川 大輔 他、TLR リガンド刺激した  
ヒト培養歯髄細胞における IL-6、  
CXCL10 産生をインターフェロンは増  
強させる、日本歯科保存学会 2009 年  
度秋季学術大会 (第 131 回)、2009 年 10  
月 31 日、仙台国際センター (宮城県)
- ⑤ 中西 正 他、ヒト歯髄細胞における炎  
症関連因子発現に対するカテキンの影  
響、日本歯科保存学会 2009 年度春季学  
術大会 (第 130 回)、2009 年 6 月 11 日、  
札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑥ 湯本 浩通 他、カテキンの培養歯髄細  
胞における抗炎症効果に関与するシグ  
ナル伝達機構の解析、第 30 回日本歯内  
療法学会学術大会、2009 年 4 月 25 日、  
都市センターホテル (東京都)

- ⑦ 湯本 浩通 他、カテキンによるTLRやNOD ligands刺激培養歯髄細胞における炎症性メディエーター産生抑制機構、第82回日本細菌学会総会、2009年3月13日、名古屋国際会議場（愛知県）
- ⑧ 平尾 功治 他、培養歯髄細胞におけるカテキンのcell signalingに対する影響、日本歯科保存学会2008年秋季学術大会（第129回）、2008年11月6日、富山国際会議場（富山県）
- ⑨ Mukai K, et al, Effect of catechins on cytokine production in human odontoblast-like cells、2008 IADR General session、2008年7月3日、トロント（カナダ）
- ⑩ 向井 佳代 他、カテキンがヒト培養歯髄細胞のサイトカイン産生に与える影響 ～石灰化誘導培地を用いた環境下において～、日本歯科保存学会2008年春季学術大会（第128回）、2008年6月6日、朱鷺メッセ（新潟県）
- ⑪ 平尾 功治 他、カテキンのヒト培養歯髄細胞に対する抗炎症効果、第29回日本歯内療法学会千葉大会、2008年5月24日、東京歯科大学（千葉県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 正 (NAKANISHI TADASHI)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：00217770

### (2) 研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO HIROMICHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：60284303

細川 義隆 (HOSOKAWA YOSHITAKA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：90346601

向井 佳代 (MUKAI KAYO)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：30464340

### (3) 連携研究者

なし