

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23084

研究課題名（和文）歯髄炎病変におけるCAPEの炎症制御機構とVEGF産生機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of CAPE on inflammation control and VEGF production in pulpitis lesions

研究代表者

蔵本 瞳（KURAMOTO, Hitomi）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70876060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロポリスの生理活性物質であるCAPEを応用した新規歯髄保護療法の開発を目指し、歯髄細胞における歯髄炎の病態形成に関与するサイトカイン産生ならびに修復象牙質形成に関与するVEGF産生に対し、CAPEが及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

その結果、ヒト歯髄細胞において、CAPEは細菌関連因子であるPam3CSK4および炎症性サイトカインであるTNF- α によって誘導されたCXCL10の産生を抑制することが示された。さらに、CAPEはヒト歯髄細胞におけるVEGF産生を誘導することが明らかとなり、新規歯髄保護療法開発につながっていく可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄を除去された歯は歯根破折のリスクが上昇するため、その長期的予後は必ずしも良好とはいえず、歯の喪失の原因につながることから、歯髄保護の重要性が謳われている。今回の研究で、プロポリスの生理活性物質であるCAPEはヒト歯髄細胞に対し、ケモカイン産生抑制作用とVEGF誘導作用があることが明らかになった。したがって、CAPEを歯髄炎治療に応用することで、過剰な炎症反応を抑制し、組織修復を誘導させる作用が期待され、新規歯髄保護療法開発につながっていく可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the effects of CAPE, a physiologically active substance of propolis, on inflammatory cytokines and VEGF production in human dental pulp cells to develop a novel treatment by a more ideal dental pulp protective agent. I found that CAPE could inhibit CXCL10 production in Pam3CSK4- and TNF- α -stimulated human dental pulp cells. Moreover, CAPE had a capacity to induce VEGF production in human dental pulp cells. These findings suggest that CAPE might be useful as a novel biological material for the vital pulp therapy.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄炎 CAPE VEGF 抗炎症 歯髄保護療法

1. 研究開始当初の背景

歯髄炎は、主にう蝕細菌やその構成成分が象牙細管を通じて象牙芽細胞や歯髄細胞を刺激することで惹起され、その発症には自然免疫の関与が示唆されている。歯髄炎が進行すると歯髄組織に不可逆性の変化が生じ、最終的に歯髄除去療法の適応となるが、無髄歯は歯根破折を生じるリスクが高くなるとされ、その予後は必ずしも良好ではない。したがって、歯髄の積極的な保存を可能にする新規歯髄保護療法の開発が望まれている。

ポリフェノール的一种でプロポリスの生理活性物質である Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)には、抗炎症作用、抗酸化作用、抗癌作用など多彩な作用があることが知られている。申請者はこれまでに、ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)において、CAPEがVascular endothelial growth factor (VEGF)の産生を誘導することを報告してきた(Kuramotoら、Biomed Res Int., 2019)。さらに、血管新生因子であるVEGFは、歯髄細胞の活性化や象牙芽細胞への分化、修復象牙質の形成に関与することが報告されている。しかしながら、CAPEの歯髄組織に対する影響、さらにはCAPEとVEGFを関連付けた報告は少なく、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究ではヒト歯髄細胞において、歯髄炎の発症や増悪に関連するとされている炎症性サイトカインの産生、ならびにVEGF産生に対するCAPEの影響を解析することで、歯髄の不可逆変化の抑制を目指し、CAPEを応用した信頼性の高い新規歯髄保護療法の開発を目的とした。この研究により、CAPEの歯髄炎病変局所へ果たす役割が明らかとなれば、歯髄炎の病態解明だけでなく、抗炎症効果とCAPEにより誘導されるVEGFを介した生理的な修復象牙質の形成を期待できる、歯髄炎治療に結びつく可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞の採取

徳島大学病院歯科を受診し、う蝕及び歯周炎を有さず、矯正目的のため抜去された健全智歯より歯髄を採取し、細切後outgrowthした細胞を歯髄細胞とし、5~9代継代したものを実験に使用した。なお、試料の収集は徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認のもとで実施し、被験者には本研究の内容を説明し、同意を得た後に試料を実験に使用した(承認番号329)。

(2) ヒト歯髄細胞の培養

ヒト歯髄細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycinを添加したDulbecco's modified Eagle medium (DMEM)培地にて、37℃、5% CO₂存在下で培養を行った。

(3) CAPEの細胞障害性の確認

ヒト歯髄細胞をCAPE処理後、24時間培養し、Cell Count Kit-8を用いて解析した。ポジティブコントロールとしてTriton X-100によって処理を行ったものを使用した。

(4) CAPEがVEGF産生に与える影響の解析

ヒト歯髄細胞をCAPEにて24時間処理後、培養上清を採取し、ELISA法にてVEGFの濃度を解析した。

(5) CAPEがVEGF産生に関与するシグナル伝達機構に与える影響の解析

ヒト歯髄細胞にCAPE処理を行い、15分、30分あるいは60分後に細胞を抽出し、タンパクを回収した。その後、Western blot法を用い、MAPKsのリン酸化を解析した。

(6) CAPEが炎症性サイトカイン産生に与える影響の解析

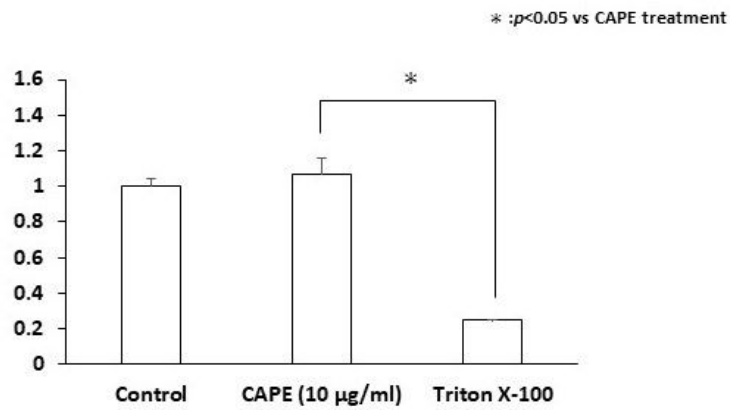
ヒト歯髄細胞に、細菌関連因子であるPam3CSK4等の自然免疫関連受容体(PRRs: Pattern recognition receptors)に特異的なリガンドや、TNF- α 等の炎症性サイトカイン存在下でCAPEにて24時間処理後、培養上清を回収し、ELISA法にてCXCL10の濃度を解析した。

4. 研究成果

(1) CAPE の細胞障害性の確認

10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、CAPE にヒト歯髄細胞に対する細胞障害性は認められなかった。
(Fig.1 参照)

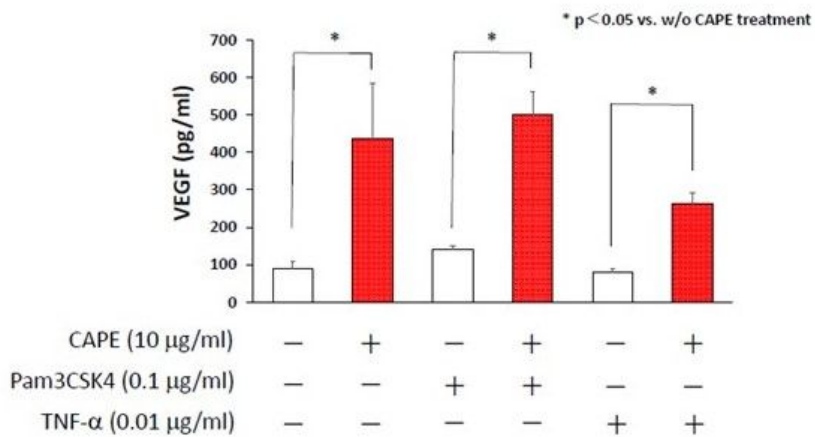
Fig.1 Cytotoxicity of CAPE on dental pulp cells



(2) CAPE が VEGF 産生に与える影響の解析

ヒト歯髄細胞に CAPE 処理を行うことで、有意に VEGF の産生が増強された。
(Fig.2 参照)

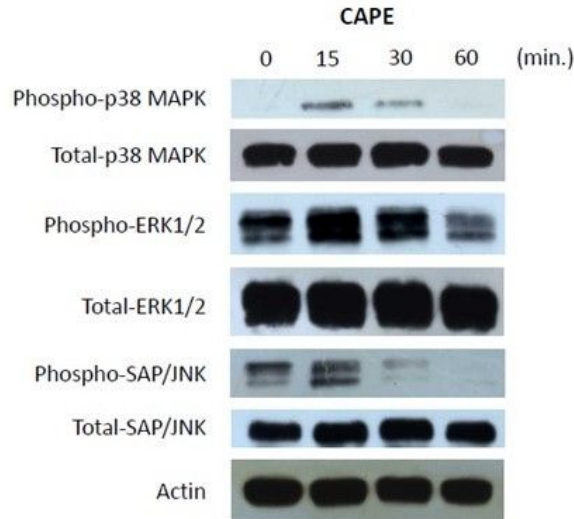
Fig.2 The effect of CAPE on VEGF production from dental pulp cells



(3) CAPE が VEGF 産生に關与するシグナル伝達機構に与える影響の解析

ヒト歯髓細胞に CAPE 処理を行うことで、p38 MAPK、ERK1/2 および SAP/JNK のリン酸化が確認された。(Fig.3 参照)

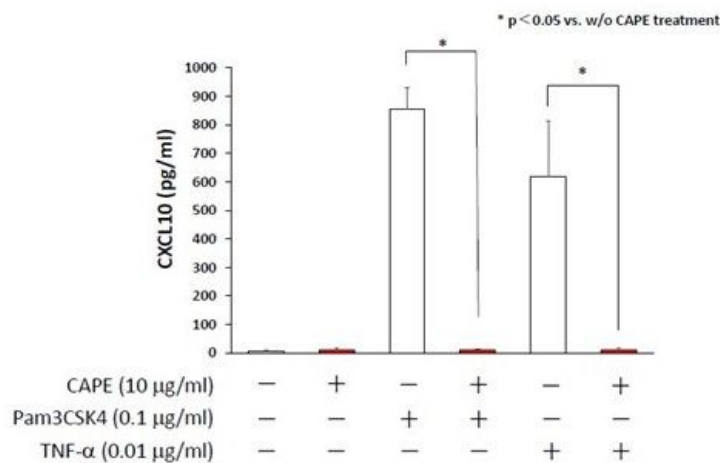
Fig.3 The effect of CAPE on MAPKs phosphorylation in dental pulp cells



(4) CAPE が炎症性サイトカイン産生に与える影響の解析

CAPE は、Pam3CSK4 および TNF- α によって誘導された CXCL10 の産生を有意に抑制することが確認された。(Fig. 4 参照)

Fig.4 The effect of CAPE on CXCL10 production from dental pulp cells



これらの結果より、CAPE を歯髓炎治療に応用することによって、過剰な炎症反応を抑制し、組織修復を誘導させる作用が期待され、新規歯髓保護療法開発につながっていく可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蔵本 瞳、中西 正、武川 大輔、細川 由樹、三枝 克啓、保坂 啓一
2. 発表標題 Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)が歯髄細胞のVEGF産生に与える影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会 2021年度秋季大会（第155回）
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------