

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06044

研究課題名(和文)ポリフェノールと過酸化水素光分解殺菌法を併用した新たな義歯性潰瘍治療法の提案

研究課題名(英文) Proposal of a novel therapy for denture ulcer applying combination of polyphenol and disinfection technique with hydrogen peroxide photolysis

研究代表者

倉内 美智子 (KURAUCHI, MICHIKO)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：00757263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：短時間処理で線維芽細胞増殖促進作用を示したカフェイン酸(CA)およびクロロゲン酸(ChA)は、いずれも短時間前処理で各種過酷ストレスおよび酸化ストレスに暴露されたヒト歯肉線維芽細胞(hGF)に対して細胞保護効果を発揮した。加えて、歯周病の主要な病原菌であるPorphyromonas gingivalis(Pg)由来のLPS(Pg-LPS)で刺激されたヒト単球系細胞であるTHP-1からの炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ の産生をCAおよびChAの1分間前処理は抑制した。これらポリフェノールは過酸化水素光分解殺菌法との併用で潰瘍部位の組織保護、炎症抑制などの作用を発揮することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Caffeic acid (CA) and chlorogenic acid (ChA), both of which accelerated proliferation of fibroblasts by short-term treatment, exerted cytoprotective effect on human gingival fibroblast (hGFs) exposed to various harsh and oxidative stressors. In addition, 1-min pretreatment with CA and ChA reduced an inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  production by human monocyte cell line THP-1 stimulated with LPS derived from Porphyromonas gingivalis, a major causative bacterial species of periodontitis. The results suggest that these polyphenols could be adjunctive agents for disinfection by H2O2 photolysis via cytoprotective and anti-inflammatory effect on ulcer lesion.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ポリフェノール 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の研究グループは、はこれまでに没食子酸やプロアントシアニジン (PA) のようなポリフェノールへの光照射によりフェノール性水酸基が酸化され、放出したプロトンと電子が溶存酸素を還元することにより過酸化水素が生成し、更に過酸化水素が光分解することで生成するヒドロキシラジカルが短時間で殺菌作用を発揮することを見出した (図1)

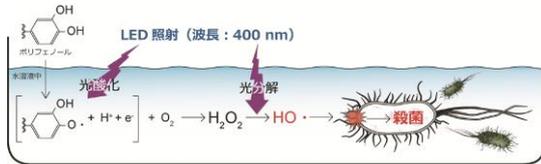


図1 光照射ポリフェノールの想定殺菌機構

(2) ラット全層皮膚欠損モデルで行った過酸化水素光分解殺菌試験において創傷治癒が促進される傾向にあったことから (Yamada et al.: J Toxicol Sci, 2012)、ポリフェノールへの光照射が線維芽細胞に及ぼす影響の検討を行い、マウスの線維芽細胞においてポリフェノールの短時間前処理が光照射の有無に関わらず線維芽細胞の増殖を促進することを見出した (Tsuruya et al.: Appl Biochem Biotechnol, 2014)。さらに、申請者はヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblast, hGF) を対象とし、ポリフェノールの1種であるプロアントシアニジン (PA) 単独の短時間前処理はヒト歯肉線維芽細胞の増殖を促進するのみならず、過酷環境に暴露された場合でも細胞生存性を確保し、増殖を促進する (図2)。すなわち PA がストレス負荷細胞に対して細胞保護効果を発揮することを明らかとした (Kurauchi et al: PLoS ONE, 2014)。

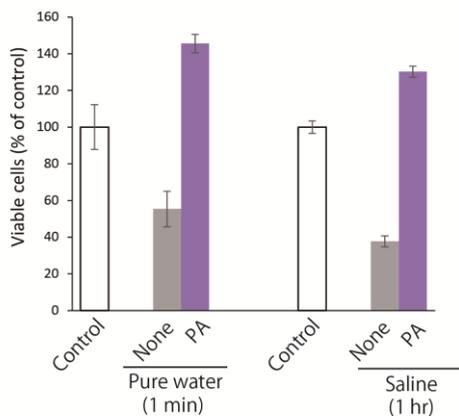


図2 純水に1分間および生理食塩水に1時間暴露されたヒト歯肉線維芽細胞に対するプロアントシアニジン (PA) 1分間前処理の細胞保護効果

2. 研究の目的

食品由来成分のポリフェノールの安全性は担保されており、さらに創傷治癒促進効果および細胞保護効果に加えて消毒剤の毒性軽減効果を発揮するのであれば、様々な分野への応用が予想される。特に光照射による殺菌効果という特長を加味するならば、既存の消毒剤に添加することで消毒剤の低濃度化を実現し、生体への侵襲を抑え、且つ創傷治癒促進や組織保護に働く新しい消毒剤の開発に繋がる可能性がある。

また、申請者らのグループでは過酸化水素の光分解殺菌法にポリフェノールを加えることで相乗的に殺菌効果が増強されることを見出している (Ikai et al.: Biocontrol Sci, 2013)。このように、ポリフェノールと過酸化水素の併用に現在の歯科臨床で用いられる照射器を利用することで、低コストで非常に独創的な組織修復・保護作用を兼備した殺菌消毒技術の開発に繋がり、歯科臨床の発展に大きく寄与すると考える。

そこで、ポリフェノールの創傷治癒効果や毒性軽減効果を応用することにより、殺菌消毒・組織保護・創傷治癒促進効果を発揮し、高齢者にもより安全で負担の少ない創傷に対する新しい治療システムの実現を最終的な目標とした上で、本研究では各種ポリフェノールの毒性軽減効果の検証を行い、その作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PA の hGF に対する増殖促進作用—経時変化—

PA の subconfluent の hGF に対する細胞増殖促進作用を確認する目的で、hGF を 0.25 および 1.0 mg/ml の PA 生理食塩水溶液に 1 分間処理し、洗浄後 3, 6, 12 および 24 時間の細胞増殖の程度を MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole) 法にて追跡した。

(2) カフェイン酸およびクロロゲン酸の hGF に対する増殖促進作用

Tsuruya らによりマウス線維芽細胞に対して細胞増殖促進作用を示すことが報告されているコーヒー豆ポリフェノールであるカフェイン酸 (CA) およびクロロゲン酸 (ChA) の 1 分間処理が subconfluent の hGF の細胞増殖におよぼす影響を検討した。CA は 0.031-0.5 mg/ml, ChA は 0.063-1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 hGF を処理した。洗浄後 24 時間の細胞増殖の程度を MTT 法にて調べた。CA および ChA の構造式を図3に示す。

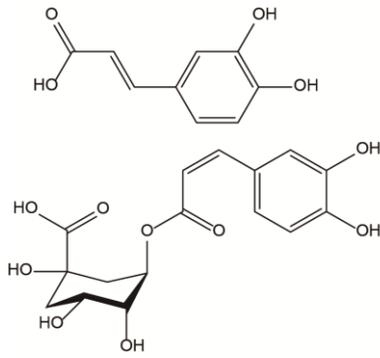


図3 カフェイン酸 (CA, 上) および  
クロロゲン酸 (ChA, 下) の構造式

(3) 浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスに暴露された hGF に対する CA および ChA 同時処理の影響

浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスとして培地の代わりにそれぞれ純水および生理食塩水に暴露された subconfluent の hGF に対する CA および ChA の同時処理による細胞保護効果を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように純水および生理食塩水に溶解し、前者は 2 分間、後者は 1 時間 hGF に処理した。洗浄後 24 時間培養し、細胞増殖の程度を MTT 法にて調べた。

(4) CA および ChA 1 分間前処理が浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスに暴露された hGF に及ぼす影響

浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスとして培地の代わりにそれぞれ純水および生理食塩水に暴露された subconfluent の hGF に対する CA および ChA の短時間前処理による細胞保護効果を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 hGF を処理した。洗浄後 hGF は純水あるいは生理食塩水にそれぞれ 2 分間あるいは 1 時間暴露した。洗浄後 24 時間培養し、細胞増殖の程度を MTT 法にて調べた。

(5) 血清無添加培地で培養した hGF の細胞生存性および細胞内 ROS 生成におよぼす CA および ChA 1 分間前処理の影響

血清無添加という過酷条件に暴露された hGF に対する CA および ChA の 1 分間前処理による細胞保護効果を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 subconfluent の hGF を処理した。洗浄後 hGF は血清無添加培地にて 24 および 48 時間培養し、細胞増殖の程度および細胞内活性酸素 (ROS) 量をそれぞれ MTT 法および蛍光プローブ (CM-H2DCFDA) 法にて調べた。蛍光プローブ法の概略を図 4 に示す。

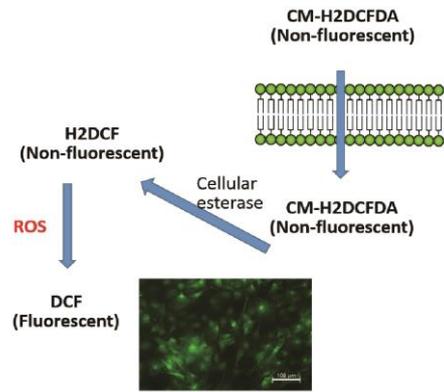


図4 細胞内活性酸素 (ROS) 検出法の概略  
(蛍光プローブ法)

(6) 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷 hGF に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> という酸化ストレスに暴露された confluent の hGF に対する CA および ChA の 1 分間前処理による細胞保護効果を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 hGF を処理した。洗浄後 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を hGF に 20 分間負荷した。洗浄後 24 時間培養した時の細胞増殖の程度を MTT 法にて調べた。加えて、10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を hGF に 20 分間負荷後の細胞内 ROS を蛍光プローブ法にて測定した。

(7) 酸性電解水 (AEW) 負荷 hGF に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

酸化力が強い殺菌消毒剤酸性電解水 (acid electrolyzed water, AEW) に暴露された confluent の hGF に対する CA および ChA の 1 分間前処理による細胞保護効果を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 hGF を処理した。洗浄後、hGF を AEW にて 30 秒間処理した。洗浄後 24 時間培養した時の細胞増殖の程度を MTT 法にて調べた。加えて、AEW にて 30 秒間処理した hGF の細胞内 ROS を蛍光プローブ法にて測定した。

(8) *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 由来 LPS で刺激された hGF の IL-8 産生に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

主要な歯周病原菌である Pg 由来のエンドトキシンであるリポ多糖 (LPS) に刺激された confluent の hGF の炎症性サイトカイン IL-8 産生に対する CA および ChA の 1 分間前処理の影響を検討した。CA は 0.13 および 0.5 mg/ml、ChA は 0.25 および 1.0 mg/ml になるように溶解した生理食塩水溶液にて 1 分間 hGF を処理した。洗浄後 5 μg/ml の Pg-LPS を hGF に加え、24 時間培養後の培養液中の IL-8 を ELISA 法により測定した。

(9) Pg 由来 LPS で刺激された THP-1 からの炎症性サイトカインの産生に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

Pg-LPS により刺激されたヒト単球系細胞

である THP-1 の炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  産生に対する CA および ChA の 1 分間前処理の影響を検討した。100 nM の PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) で分化誘導した THP-1 を CA (0.13 および 0.5 mg/ml) および ChA (0.25 および 1.0 mg/ml) 生理食塩水溶液にて 1 分間処理した。洗浄後 1  $\mu$ g/ml の *Pg*-LPS を加え、24 時間培養後の培養液中の IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  を ELISA 法により測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PA の hGF に対する増殖促進作用—経時変化—

PA 生理食塩水溶液に 1 分間処理することにより subconfluent の hGF の細胞増殖は、濃度依存性的および培養時間依存的に促進された (図 5)。

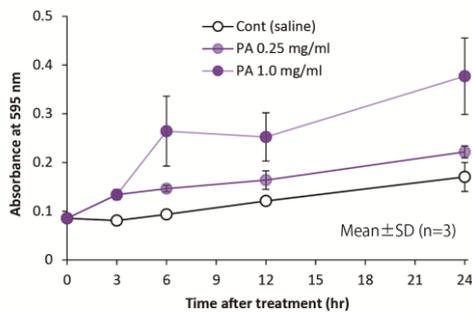


図 5 PA の hGF に対する増殖促進作用—経時変化—

##### (2) カフェイン酸 (CA) およびクロロゲン酸 (ChA) の hGF に対する増殖促進作用

CA および ChA ともそれぞれ 0.5 mg/ml および 0.25~1.0 mg/ml の濃度で 1 分間前処理することにより subconfluent の hGF の細胞増殖は有意に促進された (図 6)。

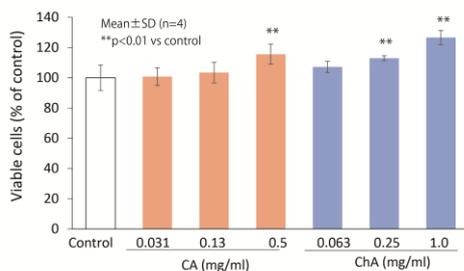


図 6 カフェイン酸 (CA) およびクロロゲン酸 (ChA) の hGF に対する増殖促進作用

##### (3) 浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスに暴露された hGF に対する CA および ChA 同時処理の影響

浸透圧ストレスとして純水 (PW) に 2 分間暴露された hGF に対して、CA および ChA とも同時処理で濃度依存的な細胞保護効果を示した。飢餓ストレスとして生理食塩水 (saline) に 1 時間暴露された hGF に対しては、CA の同時処理は濃度依存的な細胞保護効果を示したが、ChA では細胞保護効果は認められな

った (図 7)。

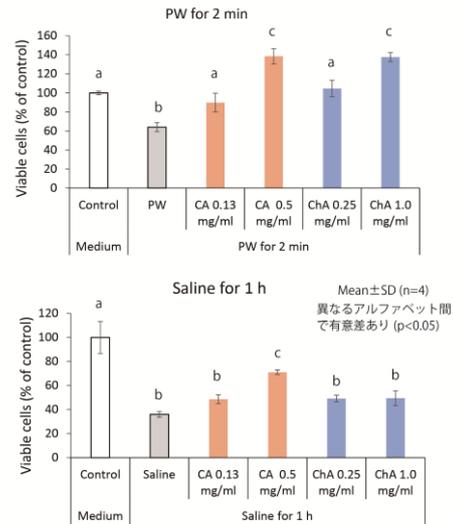


図 7 浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスに暴露された hGF に対する CA および ChA 同時処理の影響

##### (4) CA および ChA 1 分間前処理が浸透圧ストレスおよび飢餓ストレスに暴露された hGF に及ぼす影響

浸透圧ストレスとして純水 (PW) に 2 分間および飢餓ストレスとして生理食塩水 (saline) に 1 時間暴露された hGF に対して CA および ChA の 1 分間前処理は、それぞれ 0.5 mg/ml および 1.0 mg/ml でのみ有意な細胞保護効果を示したが、飢餓ストレスの負荷ではその効果は軽度であった (図 8)。

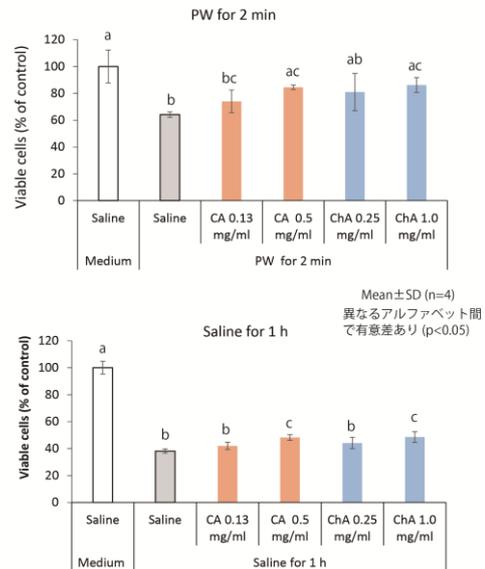


図 8 CA および ChA 1 分間前処理が浸透圧ストレスに暴露された hGF に及ぼす影響

##### (5) 血清無添加培地で培養した hGF の細胞生存性および細胞内 ROS 生成におよぼす CA および ChA 1 分間前処理の影響

CA および ChA ともそれぞれ 0.5 mg/ml および 1.0 mg/ml の濃度で 1 分間前処理することにより血清無添加培地で 24 時間培養された hGF に対して細胞増殖促進効果を発揮した。48 時間培養された場合には、CA 0.5 mg/ml で

は効果は減弱したが、ChA 1.0 mg/ml の効果は持続した (図 9)。

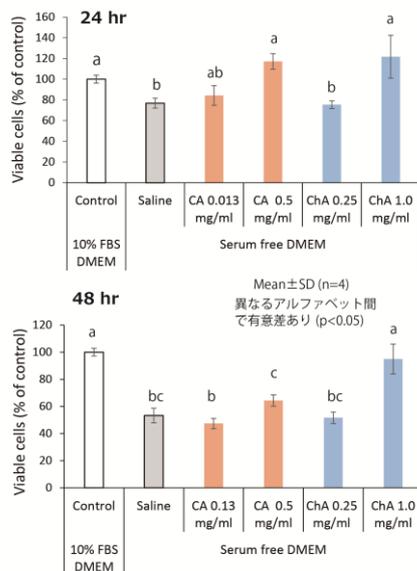


図 9 CA および ChA 1 分間前処理が血清無添加培地で培養された hGF の増殖におよぼす影響

細胞内 ROS については、24 時間培養後では上昇の程度が軽度であり、CA および ChA の影響がみられなかったが、48 時間後では CA 0.5 mg/ml および ChA 0.25~1.0 mg/ml で血清無添加での ROS の上昇を有意に抑制した (図 10)。

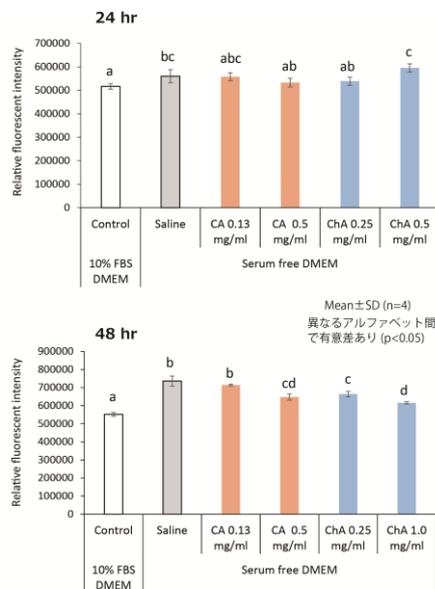


図 10 CA および ChA 1 分間前処理が血清無添加培地で培養された hGF の細胞内 ROS におよぼす影響

(6) 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷 hGF に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

CA および ChA とも 1 分間前処理で濃度依存的に 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷 hGF の細胞内 ROS の増加を抑制したが、10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷による細胞増殖の低下は、CA 0.5 mg/ml でのみ有意に改善された (図 11)。

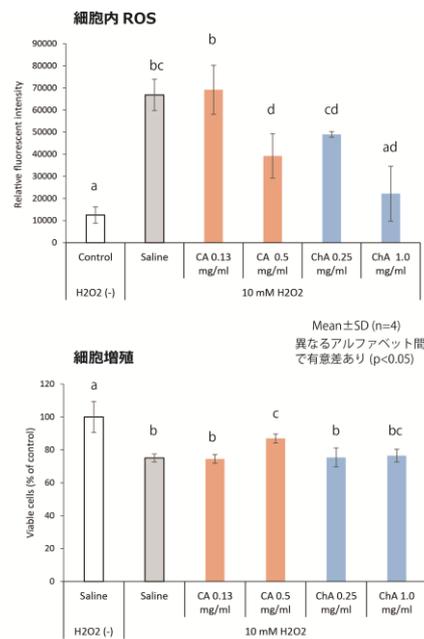


図 11 CA および ChA 1 分間前処理が 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に暴露された hGF の細胞内 ROS および細胞増殖におよぼす影響

(7) 酸性電解水 (AEW) 負荷 hGF に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

AEW 負荷 hGF の細胞内 ROS の増加に対しては CA 0.5 mg/ml 1 分間前処理でのみ有意に抑制された。細胞増殖については、AEW の細胞障害性が非常に強く、CA および ChA のいずれの前処理も細胞保護効果は示さなかった (図 12)。

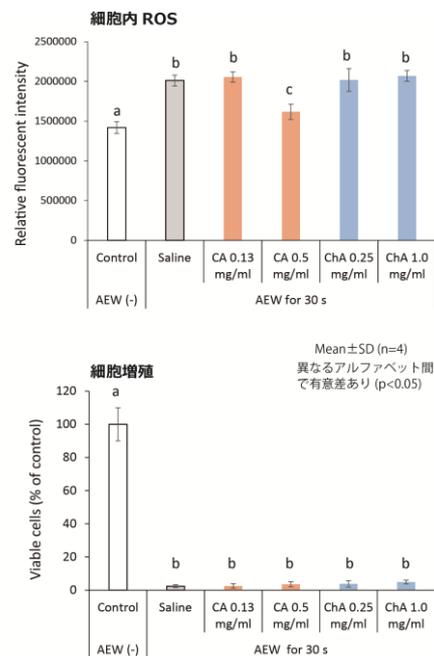


図 12 CA および ChA 1 分間前処理が AEW に暴露された hGF の細胞内 ROS および細胞増殖におよぼす影響

(8) *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)由来 LPS で刺激された hGF の IL-8 産生に対する CA および Ch1 1 分間前処理の影響

*Pg*-LPS 刺激 hGF で産生が亢進した IL-8 に対しては、CA および ChA のいずれの前処理も影響しなかった(図 1 3)。

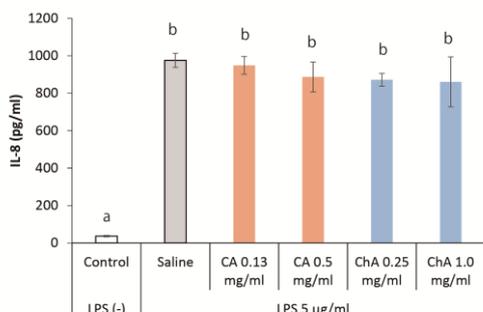


図 1 3 *Pg*-LPS で刺激された hGF の IL-8 産生に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

Mean±SD (n=4)  
異なるアルファベット間で有意差あり (p<0.05)

(9) *Pg* 由来 LPS で刺激された THP-1 からの炎症性サイトカインの産生に対する CA および ChA 1 分間前処理の影響

*Pg*-LPS 刺激 THP-1 で産生が亢進した IL-1 $\beta$  に対しては、CA および ChA いずれの前処理も顕著な影響は示さなかった (ChA 1.0 mg/ml で軽度ではあるが低下は認めた) が、TNF- $\alpha$  に対しては CA および ChA いずれの前処理も濃度に依存して産生の亢進を抑制した (図 1 4)。

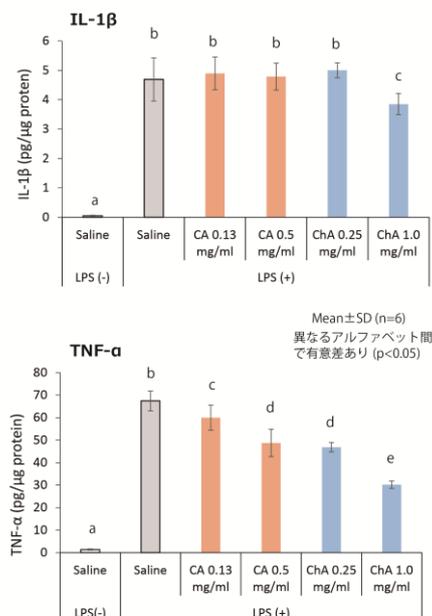


図 1 4 *Pg*-LPS で刺激された THP-1 からの炎症性サイトカインの産生に対する CA および ChA 1 分前処理の影響

(10)まとめ

•CA および ChA の短時間処理は、純水暴露 (浸

透圧ストレス) および 生理食塩水暴露 (飢餓ストレス) などの過酷環境に暴露された hGF に対して細胞保護効果を発揮する。

• CA および ChA の短時間処理は、serum deprivation stress 下で培養された hGF 内の酸化ストレス亢進と生存細胞数の低下を改善した。

• CA および ChA の短時間処理は、過酸化水および酸性電解水など酸化促進物質による hGF の細胞内酸化ストレスの亢進に対して改善効果を発揮した。

• CA および ChA の短時間処理は、*Pg*-LPS 刺激 THP-1 からの炎症性サイトカイン産生を抑制した。

以上、CA や ChA のようなポリフェノールは、短時間処理で細胞保護効果、抗酸化効果、および抗炎症効果などを介して歯周疾患の進展を軽減することが期待される。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉内 美智子 (KURAUCHI, MICHIKO)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：00757263