

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11834

研究課題名(和文) 歯周炎病変局所における炎症性骨吸収に関する白血球浸潤機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of leukocyte infiltration mechanism to participate in inflammatory bone resorption in periodontal lesion

研究代表者

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：90346601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯周炎局所の歯槽骨吸収への関与が報告されているCCR5陽性白血球に着目し、そのリガンドであるCCL3とCCL5を歯周組織構成細胞であるヒト歯根膜由来細胞(HPDLC)が産生できるか否かを検討した。さらにCCR5陽性細胞浸潤減少が歯槽骨吸収を抑制できるのではないかと仮説のもと、ルリジサに含まれる生理活性物質であるアルカンニンに着目し検討した。その結果、IL-1刺激がHPDLCのCCL3およびCCL5の産生を誘導した。アルカンニンはIL-1が誘導したCCL3とCCL5の産生を抑制し、その抑制作用にはIL-1が活性化したNF- κ B経路を抑制する事が関与している事も明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒト歯根膜由来細胞が産生するCCR5リガンド産生をアルカンニンが抑制できる事を明らかとした。CCR5陽性白血球が歯周炎病変局所において歯槽骨吸収に関与している事より、アルカンニンを歯周炎局所に投与する事によりCCR5陽性細胞数が減少した結果歯槽骨吸収も抑制できる可能性も考えられ、アルカンニンを歯周炎治療に用いる事が出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CC chemokine receptor (CCR)5 positive leucocytes were involved in bone resorption in periodontal lesion. So, we examined if human periodontal ligament cells (HPDLC) could produce CCR5 ligand {CC chemokine ligand (CCL)3 and CCL5} in this experiment. We found IL-1beta could induce CCL3 and CCL5 production in HPDLC. Next, we will find the material that could inhibit CCL3 or CCL5 production in HPDLC. We focused on alkannin which is extracted from *Alkanna tinctoria*, a member of the borage family that grows in France. We found alkannin could inhibit CCL3 and CCL5 production in IL-1beta-stimulated HPDLC. Moreover, we reported alkannin could inhibit nuclear factor (NF)- κ B activation in IL-1beta-stimulated HPDLC. These results suggest that HPDLC is involved in CCR5-positive leukocytes infiltration because HPDLC could produce CCR5 ligands. Topical application of alkannin might decrease the number of CCR5-positive leucocytes because alkannin could inhibit CCL3 and CCL5 production in HPDLC.

研究分野：歯周病態学分野

キーワード：歯周炎 白血球 ケモカイン 歯周組織構成細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎はデンタルプラーク中に含まれる細菌に対する免疫応答が関与する慢性炎症性疾患であり、歯肉結合組織の炎症性細胞浸潤、歯槽骨吸収がその特徴となっている。

近年、歯周炎組織中に浸潤している CC chemokine receptor (CCR)5 陽性白血球が歯槽骨吸収に積極的に関与している事が報告された (*J Dent Res.* 90: 632-637. 2011)。また、その中でも CCR5 陽性 CD4 陽性リンパ球が破骨細胞活性化に関与する receptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL)を高発現している事ならびに歯周炎局所に存在する CCR5 陽性 F4/80 陽性白血球は IL-1 や TNF- α を産生する活性化マクロファージである事も明らかとなっている (*J Dent Res.* 90: 632-637. 2011)。さらに、歯周炎病変局所に存在する CCR5 陽性白血球の中に破骨細胞前駆細胞が多く含まれており、CCR5 欠損マウスの歯周炎モデルにおいて正常マウスと比較し歯槽骨吸収が減少した事も報告されており、歯周炎病変局所の CCR5 リガンドが歯槽骨破壊に大きく関与している可能性が示唆されている (*J Dent Res.* 90: 632-637. 2011)。

CC chemokine ligand (CCL)3, CCL4, CCL5 が CCR5 のリガンドであり、全身の様々な炎症局所への CCR5 陽性白血球浸潤に関与している事が明らかとなっている。すでに歯周炎においても歯周炎患者の歯肉溝浸出液に CCL3 および CCL5 が存在する事 (*J Periodont Res.* 45: 148-152. 2010) や免疫組織化学的解析によりヒト歯周炎組織において CCL3 陽性細胞ならびに CCL5 陽性細胞が存在する事が報告されている (*Oral Microbiol Immunol.* 15: 166-171. 2000)。ゆえにヒト歯周炎病変局所においても CCR5 リガンドが CCR5 陽性細胞浸潤に実際に関わっている事が示唆される。また、*E.coli* LPS 刺激がヒト歯根膜由来細胞の CCL3 および CCL5 産生を誘導する事も明らかとされており (*J Periodont Res.* 45: 796-802. 2010)、歯周組織構成細胞が CCR5 リガンドを産生する事により CCR5 陽性細胞浸潤に関与している可能性も考えられる。しかしながら、*E.coli* LPS 以外の炎症性物質が歯周組織構成細胞の CCR5 リガンド産生を誘導できるか否かについては不明である。

アルカンニンとはフランス南部で自生するルリジサに含まれる天然色素であり、食品の着色に使用されている。近年アルカンニンに抗菌作用や抗癌作用などの生理活性作用がある事が報告され注目されている。しかしながら、アルカンニンを歯周炎治療に用いようとする試みはなく基礎的な実験も行われていない。

2. 研究の目的

本研究ではアルカンニンに抗炎症作用があると仮定し、炎症性サイトカインが誘導する歯周組織構成細胞のケモカイン産生、特に CCR5 リガンド産生を抑制できるか否かを明らかにするため研究を行った。具体的には、歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) に着目し、HPDLC が産生する CCL3 および CCL5 産生に与えるアルカンニンの影響を調べる事とした。さらにアルカンニンがどのシグナル伝達経路の活性化に影響を与えるか明らかにするために多くのケモカイン産生に関与するシグナル伝達経路である nuclear factor (NF)- κ B 経路の活性化に与えるアルカンニンの影響を調べる事とした。

3. 研究の方法

(1) HPDLC の培養:

HPDLC は Lonza 社より購入し、10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY)) を含む Dulbecco's modified Eagle medium 培地 (Sigma, St. Louis, MO) において 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下のインキュベーター内で培養した。HPDLC は 5 継代から 10 継代のものを実験に用いた。

(2) HPDLC の CCL3 および CCL5 産生の解析:

(1) の条件で培養した HPDLC を IL-1 β (1 ng/ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ) 存在下で 24 時間刺激し、その後、培養上清を採取し、ELISA 法にて CCL3 および CCL5 濃度を解析した。ELISA キットは DuoSet ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN) を用いた。一部の実験においてアルカンニン (0.25, 0.5, 1, 2 μ M; 長良サイエンス社)あるいは NF- κ B 経路阻害物質 (SC514: Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) において 1 時間前処理した後、IL-1 β (1 ng/ml) 刺激を 24 時間行い、培養上清中の CCL3 および CCL5 濃度を ELISA 法を用い解析した。

(3) IL-1 β 刺激およびアルカンニン前処理により活性化された NF- κ B 経路の解析:

(1) の条件で培養した HPDLC を IL-1 β 単独刺激、あるいはアルカンニン (0.5, 1 μ M) で 1 時間前処理後に IL-1 (1 ng/ml) で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激した後、タンパクを回収した。遠心分離を行い debris を除去した後、Bradford protein assay を用いてタンパク定量を行い、ポリアクリルアミド電気泳動を用いて蛋白分離を行った後に、PDVF 膜に蛋白を転写した。

その後、NF- κ B p65 のリン酸化ならびに I κ B- α の分解を確認するために western blot 解析を行った。すなわち、1 次抗体として抗 phospho-NF- κ B p65 ラビット抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、抗 NF- κ B p65 ラビット抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 I κ B- α マウス抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 GAPDH ラビット抗体 (Cell Signaling Technology) を 4、24 時間反応させた。その後、horseradish peroxidase-conjugated 2 次抗体 (Sigma) を室温で 1 時間反応させた後に、ECL prime western blot detection system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を用いてバンドを検出した。

4. 研究成果

(1) アルカンニンが IL-1 β 刺激 HPDLC の CCL3 および CCL5 産生に与える影響:

最初に 0.1, 1, 10 ng/ml の IL-1 刺激を 24 時間行い HPDLC の CCL3 および CCL5 産生を確認したところ、IL-1 濃度依存的に CCL3 および CCL5 の HPDLC からの産生が増強された。また、1 ng/ml の IL-1 刺激で誘導された CCL3 および CCL5 産生は 0.5, 1, 2 μ M のアルカンニン 1 時間前処理で濃度依存的に有意に抑制された。

(2) アルカンニンが IL-1 刺激により活性化される NF- κ B 経路に与える影響:

IL-1 β (1 ng/ml) 刺激により HPDLC の NF- κ B p65 のリン酸化および I κ B- α の分解が誘導された。アルカンニン (0.5 μ M あるいは 1 μ M) の 1 時間前処理により NF- κ B p65 のリン酸化は抑制されなかったが I κ B- α の分解は抑制された。

(3) IL-1 が誘導する CCL3 および CCL5 産生に NF- κ B 経路が関与するか否かの解析:

(2) の解析によりアルカンニンが I κ B- α の分解を抑制する事により NF- κ B シグナル伝達経路を抑制する事が明らかとなった。次に NF- κ B 伝達経路が IL-1 β が誘導する CCL3 および CCL5 産生に関与するかシグナル伝達阻害物質を用いて検討した。その結果、CCL3 および CCL5 産生は NF- κ B 阻害物質 (SC514) の前処置により有意に抑制される事が明らかとなり、NF- κ B 経路が IL-1 誘導 CCL3 および CCL5 産生に関与している事が示唆された。

これらの結果より炎症性サイトカインである IL-1 は歯周組織構成細胞の HPDLC の CCL3 および CCL5 産生を誘導する事により歯周炎病変局所への CCR5 陽性白血球の浸潤・集積を促す事で歯周炎組織における歯槽骨吸収に関与している事が示唆された。また、アルカンニンを歯周炎局所に投与する事で CCR5 リガンド産生を減少させる事により歯槽骨破壊を抑制できる新たな治療薬の候補になる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

Storu Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Hideki Shiba, Interleukin (IL)-35 Suppresses IL-6 and IL-8 Production in IL-17A-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells, Inflammation, in press (2019 年) 査読有り

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Honokiol and Magnolol inhibit CXCL10 and CXCL11 production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells, Inflammation, 41 巻, 2110-2115 頁 (2018 年) 査読有
DOI: 10.1007/s10753-018-0854-z

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Transforming growth factor- β 1 increases C-C chemokine ligand 11 production in interleukin 4 stimulated human periodontal ligament cells, Cell Biology International, 42 巻, 1395-1340 頁 (2018 年) 査読有
DOI: 10.1007/s10753-018-0854-z

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志、テアフラビンが口腔上皮細胞のケモカイン産生に与える影響の解析、日本歯科保存学会雑誌、61 巻、10 - 16 頁 (2018 年) 査読有
DOI: 10.11471/shikahozon.61.10

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-27 modulates chemokine production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells, Cellular Physiology and Biochemistry, 43 巻, 1198-1206 頁 (2017 年) 査読有
DOI: 10.1159/000481760

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-29 enhances CXCL10 production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells, Immunological Investigations, 46 巻, 615-624 頁 (2017 年) 査読有

DOI:10.1080/08820139.2017.1336176.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Gomisin N decreases inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells, *Inflammation*, 40 巻、360-365 頁 (2017 年) 査読有
DOI: 10.1007/s10753-016-0482-4.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Yoshihiro Ohta, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Alkannin inhibits CCL3 and CCL5 production in human periodontal ligament cells, *Cell Biology International*, 40 巻、1380-1385 頁 (2016 年) 査読有
DOI: 10.1002/cbin.10692.

Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Melatonin inhibits CXCL10 and MMP-1 production in IL-1 α -stimulated human periodontal ligament cells, *Inflammation*, 39 巻、1520-1526 頁 (2016 年) 査読有
DOI: 10.1007/s10753-016-0386-3.

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Shikonin inhibits inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells, *Inflammation*, 39 巻、1124-1129 頁 (2016 年) 査読有
DOI: 10.1007/s10753-016-0344-0.

[学会発表](計 7 件)

細川育子、細川義隆、尾崎和美、松尾敬志：Carnosic acid はヒト口腔上皮細胞の IL-27 誘導 CXCR3 リガンド産生を抑制する、第 149 回 2018 年日本歯科保存学会 (2018. 11. 1, 京都市勧業館みやこめッセ、京都府京都市)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：IL-27 はヒト口腔上皮細胞の CXCR3 リガンド産生を誘導する、第 61 回日本歯周病学会春季学術大会 (2018.6.1, 京王プラザホテル、東京都新宿区)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：IL-29 は TNF- α が誘導するヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 (2017. 12. 16, 国立京都国際会館、京都府京都市)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：IL-29 はヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する、第 147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会 (2017. 10. 26, 盛岡地域交流センター、岩手県盛岡市)

進藤智、池田敦史、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志、シトルリン化ビメンチンは破骨細胞分化を促進する、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (2016.10.27, キッセイ文化ホール、長野県松本市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、松尾敬志：Gomisin N はヒト歯根膜由来細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (2016.10.27, キッセイ文化ホール、長野県松本市)

進藤智、池田敦史、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：シトルリン化ビメンチンは破骨細胞活性化とマウス歯周炎による骨吸収を促進する、第 59 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2016.10.7, 朱鷺メッセ、新潟県新潟市)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中西 正

ローマ字氏名：NAKANISHI, Tadashi

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：00217770

研究分担者氏名：細川 育子

ローマ字氏名：HOSOKAWA, Ikuko

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：助教

研究者番号（8桁）：50707908

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。