

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09918

研究課題名（和文）骨代謝制御機構に注目した歯周関連疾患における β -クリプトキサンチンの有用性の検討研究課題名（英文）Investigation of the usefulness of β -cryptoxanthin in periodontal related diseases focused on bone metabolism regulation mechanism

研究代表者

大迫 文重（Oseko, Fumishige）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10398406

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）：破骨細胞前駆細胞（THP-1）に *Porphyromonas gingivalis*（以下、*P. gingivalis*）由来LPS刺激を行い炎症性サイトカインの発現が増大した。さらに β -cryの添加により5FU刺激による炎症性サイトカイン発現レベルの増大が抑制された。これより β -cryはTHP-1に対して抗炎症効果を有していた。マウス間葉系幹細胞（KUSA-A1）およびマウス骨芽細胞（MC3T3E-1）は β -cryを添加すると濃度依存的に強い骨形成を示した。 β -cryは骨芽細胞の活性が上げる効果があり歯周病や歯周病関連疾患に対する治療薬となる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

歯学・医学は凄まじい勢いで進歩しているが歯周病や歯周病関連疾患は未だ制圧できていない。また、超高齢化社会さらには2025年問題と社会保障費は増大の一途をたどっている。骨代謝制御機構に注目して β -cryを歯周病や歯周病関連疾患に対する予防・治療薬として応用する研究を実施することで、歯周病や歯周病関連疾患の制圧、骨粗しょう症や骨折予防につながると考えられる。その結果、健康長寿な高齢者が増加し、社会保障費削減の一助となると考える。また、歯周病および歯周病関連疾患に対する、細胞増殖因子、抗酸化ストレスタンパクの産生について検討ができ、歯周病関連疾患の病態解析に寄与できる。

研究成果の概要（英文）： β -cryptoxanthin (β -cry) is a carotenoid that is abundant in Satsuma mandarins. The plasma concentration of β -cry is higher in the Japanese population than in other countries. In addition, a low plasma concentration of β -cry was reported to be associated with a high prevalence of periodontal diseases. In the field of dentistry, β -cry is known to suppress alveolar bone resorption. When we stimulated THP-1 cells with *P. gingivalis*-derived LPS, the expression of the inflammatory cytokines IL1- β and TNF and the anti-inflammatory cytokine IL-10 increased. This suggests that inflammatory cytokines, which are produced by THP-1 cells due to *P. gingivalis*-derived LPS stimulation, are involved in the inflammatory response of RA. We also found that the addition of β -cry increased the expression of adiponectin, IL-8, and INF- γ . This was likely because the analysis was performed on macrophages prior to their differentiation into osteoclasts.

研究分野：歯科口腔科学

キーワード：骨代謝 カルテノイド

1 . 研究開始当初の背景

歯周病や関節リウマチは、炎症により破骨細胞が活性化され骨破壊が生じる疾患である。骨代謝制御機構(炎症性サイトカインの抑制,破骨細胞分化の抑制,骨芽細胞の活性)に着目すると、炎症性サイトカインの増加に伴い、破骨細胞が活性化することで、これらの疾患は骨吸収が促進する。そのため、炎症を制御することが骨吸収を抑制すると考えられている。また、我が国が迎えている超高齢化社会において、歯周病関連疾患(関節リウマチ,糖尿病,骨粗鬆症等)が原因で骨が脆弱になった高齢者が多くなると考えられる。

そこで、骨代謝制御機構に注目し、天然由来の食物化合物である β-クリプトキサンチン(β-cryptoxanthin 以下,β-cry)を用いることで歯周病関連疾患に対する予防・治療薬としての新たな可能性や応用性を旨す。

2 . 研究の目的

(1) -cry の骨代謝機構に与える影響について

歯周病や骨粗鬆症は、破骨細胞と骨芽細胞による連関した制御システムのバランスに破綻が生じることが原因でおきる疾患である。骨代謝制御機構に着目すると、骨芽細胞は間葉系幹細胞由来なのに対して、破骨細胞は血球系の細胞由来のため、全く起源の異なる細胞が骨吸収量と骨形成量をカップリングすることにより骨量を保っている。我が国が迎えている超高齢化社会において、骨吸収と骨形成の共役(カップリング機構)の不良が原因で骨が脆弱になる高齢者が多くなると考えられる。我々は、以前の研究で天然由来の食物化合物である β-クリプトキサンチン(以下 β-cry)が破骨細胞分化因子である RANKL の発現を抑制することを報告した。β-cry は、温州みかんなどの柑橘類に多く含有され、さらに無味無臭であるため、食品に添加が可能で、サプリメント、機能性食品への応用が可能である。そこで、β-cry が骨代謝制御機構に与える影響が明らかとなれば、骨代謝性疾患の新たな予防になり得ると考えた。

(2) -cry の粘膜炎に対する効果について

口腔膜炎は、化学療法に伴う代表的な副作用の 1 つであり、口腔内の疼痛、嚥下痛を引き起こすことで、患者の栄養状態の低下、会話困難などの影響を与え、患者の QOL を著しく低下させる。口腔粘膜炎の発症には多くの因子が関与しており、詳細なメカニズムは未だ不明な部分もあるが、現在のところ化学療法剤による直接的な細胞障害に加え、化学療法剤により惹起される活性酸素(ROS)による障害や炎症性サイトカインによる口腔内局所の炎症などが主な原因として報告されている。

β-cryptoxanthin(β-cry)は温州みかんによく含有されるカルテノイドであり、これまでに抗酸化・抗炎症作用などが報告されており、我々のグループでも歯根膜細胞や歯肉線維芽細胞に対して抗炎症効果を示すことを報告してきた。しかしながら β-cry の口腔粘膜炎に対する効果は未だ不明である。

そこで本研究では、頭頸部領域の化学療法によく用いられる 5-fluorouracil(5-FU)で口腔粘膜由来上皮細胞を刺激するとともに、β-cry を添加し、その効果について検討した。

3 . 研究の方法

(1) -cry の骨代謝機構に与える影響について

マウス間葉系幹細胞(KUSA-A1)およびマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を DMEM 培地、骨分化誘導培地、骨分化誘導培地に -cry を添加したもので培養し、alizarinredS 染色、免疫蛍光化学染色および QT-RealtimePCR を実施し、石灰化基質産生能、遺伝子発現の評価を行った。また、マウスマクロファージ(RAW264.7)を播種し、RPMI 培地、sRANKL 添加破骨細胞分化誘導培地、sRANKL 添加破骨細胞分化誘導培地に -cry を添加したもので培養し、TRAP 染色および Actin 染色を行い、ダブルポジティブを示した細胞を示し、破骨細胞数を定量比較、検討を加えた。

(2) -cry の粘膜炎に対する効果について

口腔粘膜由来正常上皮細胞(以下 hOMK, CellResearchCorp)を、実験に応じて各種 plate に播種し、5-FU ならびに β-cry の添加を行った。その後 hOMK の細胞カウント、Real-timeRT-PCR による炎症性サイトカイン、MMPs の発現解析、ELISA による炎症性サイトカイン産生の解析、蛍光比色試験での Reactiveoxygenspecies(ROS)活性解析ならびに NF-κB シグナル解析を行った。さらに、5-FU に加えて PorphyromonasgingivalisLPS(P.g.LPS)で刺激した場合での炎症性サイトカイン産生の解析も行った。

4 . 研究成果

(1) -cry の骨代謝機構に与える影響について

マウス間葉系幹細胞(KUSA-A1)およびマウス骨芽細胞(MC3T3E-1)は DMEM 培地では骨分化を認めなかったのに対して、骨分化誘導培地により骨分化を alizarinredS 染色にて認めた。さらに -cry を添加した群は濃度依存的により強い石灰化物質産生および骨分化マーカーの発現

を認めた。また、マウスマクロファージ (RAW264.7) は RPMI 培地にて破骨細胞分化を認めなかったが、sRANKL 添加破骨細胞分化誘導培地では破骨細胞分化を TRAP 染色にて認め、Actin 染色を加えることで破骨細胞特有の Actinring が検出された。ダブルポジティブを示した細胞をセルカウントしたところ、破骨細胞数の現象は認められたものの、有位差は認めなかった。また、-cry 添加による破骨細胞の割合に変化は認められなかった。

マウス間葉系幹細胞 (KUSA-A1) およびマウス骨芽細胞 (MC3T3E-1) は -cry を添加すると濃度依存的に強い骨形成を示すため、-cry は骨芽細胞の活性が上げる効果があると考えられる。また、マウスマクロファージ (RAW264.7) は -cry を添加すると濃度依存的に分化破骨細胞数は減少するものの、割合は減少せず、-cry の溶媒による細胞毒性の影響が正常細胞にも及んだと考えられる。今回の結果から、-cry は骨代謝制御機構の骨形成作用を促進させる可能性がある。

(2) -cry の粘膜炎に対する効果について

5-FU 刺激群では、control 群に比べ hOMK 細胞数の有意な減少を認めた、また -cry 添加群では control 群に比べ有意な増大を認めた。

5-FU 刺激群では、control 群に比べ IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9mRNA 発現量と IL-6, IL-8 産生量の有意な増大を認めたが、-cry 添加群および 5-FU+ -cry 群では、control 群に比べこれらの有意な増大は認めなかった。また IL-8, MMP-2mRNA 発現, IL-8 産生においては、5-FU+ -cry 群では 5-FU 単独刺激群と比べて有意な減少を認めた。

5-FU 刺激群および 5-FU+ -cry 群では、control 群に比べ ROS 産生量の有意な増大を認めたが 5-FU+ -cry 群での産生量は 5-FU 単独刺激群に比べ有意に低かった。また 5-FU 刺激群では、control 群に比べ核内 NF- κ B 量は有意に増大した。5-FU+P.g.LPS 共刺激群では、5-FU 単独刺激群に比べ IL-6, IL-8 産生量が有意に増大したが、-cry の添加により IL-6 産生は有意に減少した。

-cry 添加により 5-FU によって口腔粘膜上皮細胞に誘発される炎症性サイトカイン, MMPs や ROS の増大が抑制されることが判明するとともに、-cry には上皮細胞の細胞増殖を増大させる作用があることが判明した。また P.g.LPS の存在下では 5-FU による炎症性サイトカイン産生が増大することも判明した。本研究より、-cry には化学療法によって引き起こされる口腔粘膜炎の症状を緩和させる可能性が示唆されるとともに、口腔ケアとの併用が効果的である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Oseko F, Yamamoto T, Nakai K, Adachi T, Takizawa S, Adachi K, and Kanamura N
2. 発表標題 The effects of - cryptoxanthin on bone metabolism.
3. 学会等名 41th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大迫文重・山本俊郎・中尾恵理子・滝沢茂太・足立哲也・足立圭司・雨宮 傑・金村成智
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞に -クリプトキサンチンが及ぼす影響
3. 学会等名 第49回日本口腔外科学会近畿地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 敬、大迫文重、佐藤良樹、滝沢茂太、足立圭司、山本俊郎、金村成智.
2. 発表標題 -クリプトキサンチンの口腔粘膜由来線維芽細胞への抗細胞障害作用の検討.
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤良樹、大迫文重、宮本奈生、中井 敬、雨宮 傑、坂下敦宏、中村 亨、山本俊郎、金村成智.
2. 発表標題 -クリプトキサンチンが骨代謝制御機構に与える影響.
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会2020年度春季大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	足立 哲也 (ADACHI Tetuya) (10613573)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	山本 俊郎 (YAMAMOTO Toshiro) (40347472)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	金村 成智 (KANAMURA Narisato) (70204542)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	

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