

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09929

研究課題名(和文)慢性歯周炎によるがん化シグナルメカニズムの解明から漢方薬由来創薬開発

研究課題名(英文)Elucidation of carcinogenesis signaling mechanism by chronic periodontitis and development of drug discovery derived from Kampo medicine

研究代表者

王 宝禮 (OH, Hourei)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20213613

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)：口腔扁平上皮癌細胞株(CAL27)において、黄連湯は歯周病原菌である *P. gingivalis* LPS およびPAMP刺激によるIL-6の産生を有意に阻害した。黄連湯がTLRシグナル伝達に関与する因子の機能と活性化を抑制し、それによって様々な遺伝子のNF- κ B依存性発現を抑制する。黄連湯はPAMP刺激を受けたCAL27におけるIRAK4、IRAK1、およびJNKのリン酸化を抑制した。黄連湯がPAMPによるTLRシグナル伝達の開始に関与し、MAPKやNF- κ BカスケードなどのMyD88の下流シグナル伝達経路を抑制している可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は歯周病関連細菌とがん細胞とのIL-6の発現を分子生物学的にTLRシグナル伝達経路で解明でき、その経路を漢方薬が遮断したことである。一方、社会的意義としてはまず歯周病は細菌感染による慢性疾患である。つまり慢性疾患はがん発症に関与することから、抗炎症作用のある漢方薬は「未病を防ぐ」発想になり、予防医学に発展すると考えることができる。従って、患者様のがんによる痛みや治療費の負担は軽減する。

研究成果の概要(英文)：In oral squamous cell carcinoma cell line CAL27, orento significantly inhibited periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) and lipoproteins (PAMP)-stimulated production of interleukin (IL)-6. This finding indicates that orento may suppress the function and activation of factors involved in TLR signaling, thereby suppressing NF- κ B-dependent expression of various genes. Orento suppressed IL-1 receptor-associated kinase (IRAK4), IRAK1, and c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation in PAMP-stimulated CAL27 cells. This result indicates that orento is involved in the initiation of TLR signaling by PAMP and suppresses the downstream signaling pathways of myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- κ B cascades. These findings suggest that orento has an inhibitory effect on the production of inflammatory cytokines.

研究分野：漢方医学

キーワード：漢方薬 歯周病 慢性炎症 抗炎症作用 発ガン抑制

1. 研究開始当初の背景

「歯周医学」という概念が歯科医療界に定着するなか、歯周病と全身疾患の発症あるいは進行リスクの関係が明らかになりつつある。2008年のLancet Oncology誌にImperial College Londonの研究者のグループによって、約5万人を研究対象者として約17年間追跡調査の結果「歯周病は癌のリスクファクターである」という画期的な報告が発表された。肺癌、腎癌、膵癌、血液癌などで、歯周病を有しない場合と比較して歯周病を有する場合に発がんリスクが特に高まることが判明した。その後、Harvard Medical Schoolの研究チームがJ Natl Cancer Inst誌で、51529人を対象に実施された16年間の追跡調査データを検討し、歯周病患者は膵臓がんリスクが64%高いことを発表した。さらに、本邦では国立がんセンターの調査で、約2000検体の食道がんの細胞から歯周病関連細菌が32%の割合で検出された。しかし、現在歯周病とがんの生物学的な関係は明らかでない。本研究の学術的背景はこのような統計学的な研究結果から導かれた「歯周病はがんのリスクファクター」であるという可能性から、病態メカニズムを解明する¹⁾。一方、がん治療の現場では抗がん剤治療の進歩とともにがんの治療成績は向上しているが、それぞれ特徴的な副作用を有する。それゆえ、本研究で明らかにされた病態メカニズムを基本に、抗マラリア薬として開発された伝統薬物(漢方薬)である青蒿(キク科ヨモギ属植物)から抽出されたアルテミシニンの発見の発想から、漢方薬構成成分より副作用の少ない薬物が必要と考える²⁾。

2. 研究の目的

現在、歯周病は「癌のリスクファクターである」と考えられてきた。がんの発症メカニズムは腫瘍組織内に白血球が浸潤していることから慢性炎症が促進的に働く。歯周病は慢性炎症である。歯周病関連細菌は宿主細胞への持続的な刺激により炎症性サイトカイン産生を誘導し、慢性炎症疾患である歯周病を発症・進行させる。最近、特にIL-6はがん細胞の増殖、転移、浸潤などといった生物学的活性を促進する事が注目されている。本研究では歯周病と関連があると考えられている口腔扁平上皮癌、食道癌、大腸の細胞に対して歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の構成成分LPS(P.g.LPS)によるIL-6産生の病態メカニズムを解明し³⁾、このシグナリングメカニズムから現在抗腫瘍効果を期待し投薬されている漢方薬を探索していき、その漢方薬に含まれる生薬成分から抗腫瘍活性の候補を絞っていく。本研究では第一に黄連湯をターゲットにして炎症性サイトカインの抑制を分子生物学的に解明し、抗腫瘍活性の可能性を探求するものである⁴⁾(図1)。

3. 研究の方法

MTT assay: CAL27細胞(1×10^4)に黄連湯 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ を加え、24時間培養した。MTT 500 mg/ml を細胞に加えて4時間培養し、その後、0.04 N HCl-イソプロパノールを加えて十分溶解した。マイクロプレートリーダーにて595 nm (test)、655 nm (reference)で測定した。

ELISA assay: CAL27細胞(1×10^4)に黄連湯 10 $\mu\text{g/ml}$ 、P. g. LPS 100 ng/ml を加え、24時間培養した。培地中に分泌されたIL-6量について、抗IL-6抗体とHRP-抗IL-6抗体を用いて反応させ、マイクロプレートリーダーにて450 nm (test)、655 nm (reference)で測定した。

Luciferase assay: IL-6プロモーター(GenBank accession No. NG_011640の2636~5035領域)を合成し、ルシフェラーゼ遺伝子に連結したプラスミド(phIL-6pro-Luc)を構築した。これ(1 μg)とpRSV- β -gal(0.1 μg 、内部標準)をCAL27細胞に導入し、24時間培養した。その後、黄連湯 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加し、24時間培養した。P. g. LPS 100 ng/ml を加えて6時間培養後、細胞抽出液を調製した。この抽出液を用い、ルシフェラーゼアッセイ及び β -ガラクトシダーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性値は β -ガラクトシダーゼ活性値で標準化した。

Luciferase assay: NF- κ B結合配列をルシフェラーゼ遺伝子に連結したプラスミド(pIg-Luc, 0.5 μg)とプラスミドpRSV- β -gal(0.05 μg 、内部標準)を293-TLR2/CD14細胞(HEK293細胞でTLR2とCD14が恒常的に発現している細胞)に導入し、24時間培養した。黄連湯 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加し、24時間培養後、P. g. LPS 100 ng/ml を加えて6時間培養し、細胞抽出液を調製した。この抽出液を用いてルシフェラーゼアッセイ及び β -ガラクトシダーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性値は β -ガラクトシダーゼ活性値で標準化した。

Western blotting: 黄連湯 10 $\mu\text{g/ml}$ 存在下でCAL27細胞を24時間培養後、P. g. LPS 100 ng/ml を加え、30分間培養した。その後、細胞抽出液を調製し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、IRAK4・IRAK1・JNKの抗リン酸化或いは非リン酸化抗体を使用してWestern blottingを行った。

4. 研究成果

CAL27細胞の生存率は黄連湯 10 $\mu\text{g/ml}$ でコントロールと同程度であったが、それ以外は濃度依存的に低下した。以上から、黄連湯は比較的低濃度で作用し、効果を示す漢方薬であると考えられる。まず、CAL27細胞において、黄連湯はP. g. LPS刺激によるIL-6の産生を有意に抑制し

<引用文献>

1) 王 宝禮

歯周病はガンリスクファクターか.

Precision Medicine 2019,2,89-92.

2) Paoli Wang, Akihiro Kaneko.

Introduction to Kampo medicine for dental treatment—Oral pharmacotherapy that utilizes the advantages of Western and Kampo medicines.

Jpn Dent Sci Rev. 2018 Nov; 54(4): 197-204. doi: 10.1016/j.jdsr.2018.03.004

3) Horei Oh, Kazuya Masuno, Nobutake Okusa, Yoshimasa Makita, Shin-ichi Fujiwara, Yasuhiro Imamura.

Effect of Orento, a Traditional Japanese Medicine, on IL-6, IL-8 Secretion, Type 1 Collagen Production and Alkaline Phosphatase Secretion in the Human Osteosarcoma Cell Line Saos-2. Medicines 2020, 7(10), 61; <https://doi.org/10.3390/medicines7100061>

4) Yasuhiro Imamura, Yoshimasa Makita, Kazuya Masuno and Horei Oh.

Inhibitory Mechanism of IL-6 Production by Orento in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line CAL27 Stimulated by Pathogen-Associated Molecular Patterns from Periodontopathogenic Porphyromonas gingivalis.

Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(1), 697; <https://doi.org/10.3390/ijms24010697>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 王 宝禮 | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 歯周病に対する排膿散及湯を用いた基礎研究と臨床研究 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 痛みと漢方 | 6. 最初と最後の頁 11-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 王 宝禮, 原山周一郎, 益野一哉, 西川哲成, 大草亘孝, 今村泰弘 | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 川崎病患者の急性化膿性根尖性歯周炎に対する立効散の鎮痛効果 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 痛みと漢方 | 6. 最初と最後の頁 108-111 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Yasuhiro Imamura, Yoshimasa Makita, Kazuya Masuno and Hourei Oh. | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Inhibitory Mechanism of IL-6 Production by Orento in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line CAL27 Stimulated by Pathogen-Associated Molecular Patterns from Periodontopathogenic Porphyromonas gingivalis. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24010697 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Hourei Oh , Kazuya Masuno , Nobutaka Okusa , Yoshimasa Makita , Shin-Ichi Fujiwara , Yasuhiro Imamura | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Effect of Orento, a Traditional Japanese Medicine, on IL-6, IL-8 Secretion, Type 1 Collagen Production and Alkaline Phosphatase Secretion in the Human Osteosarcoma Cell Line Saos-2 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Medicines | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicines7100061 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 王 宝禮, 大草亘孝, 益野一哉 | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 柿渋ジェルの口腔病原性微生物に対する抗菌活性 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 診療と新薬 | 6. 最初と最後の頁 694-697 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 王 宝禮 | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 歯周病がガンになるのか | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Precision Medicine | 6. 最初と最後の頁 112-115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 王 宝禮 | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 歯周病はガンのリスクファクターか | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Precision Medicine | 6. 最初と最後の頁 89-92 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 口腔扁平上皮細胞に対する黄連湯の癌細胞活性抑制メカニズム解析 |
| 3. 学会等名 第34回日本疼痛漢方研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 黄連湯のヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞における骨形成能及び抗炎症作用の基礎研究 |
| 3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 川崎病患者の歯科治療後の鎮痛効果を期待する立効散選択の考え方 |
| 3. 学会等名 2019年度日本東洋医学会関西支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 吉益東洞経験方の処方に基づく排膿散及湯の抗炎症作用機序解明 |
| 3. 学会等名 第24回吉益東洞顕彰会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 筋骨草のヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞における骨形成能及び抗炎症作用の基礎研究 |
| 3. 学会等名 第28回硬組織再生生物学会学術大会・総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 歯周病治療と排膿散及湯：骨芽培養細胞に対する作用機序 |
| 3. 学会等名 第32回日本疼痛漢方研究会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 王 宝禮 |
| 2. 発表標題 歯周炎誘発動物モデルに対する排膿散及湯の影響 |
| 3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 朝波惣一郎, 王 宝禮, 矢郷 香. | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 クインテッセンス出版 | 5. 総ページ数 189 |
| 3. 書名 薬YEAR BOOK 19/20患者に聞かれても困らない! 歯科医師のための「薬」飲み合わせ完全マニュアル. | |

〔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 | 今村 泰弘 (IMAMURA Yasuhiro) (00339136) | 松本歯科大学・歯学部・講師 (33602) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|