

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17280

研究課題名(和文)クルクミンペプチドによる根面う蝕予防素材の開発

研究課題名(英文)Development of a Root Surface Caries Preventive Material with Curcumin Peptide

研究代表者

泉井 秀介(Izui, Shusuke)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：00806052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンが、Porphyromonas gingivalis(P.g)外膜小胞(OMV)の細胞毒性作用からヒト歯肉上皮細胞(HGE)を保護するかを調べた。P.g由来のOMVで刺激したHGE細胞におけるIL-6、IL-1、TNF- α の遺伝子発現は、クルクミンによって用量依存的に有意に抑制され、タンパク質産生の抑制も認められた。さらに、クルクミンは、OMVの細胞移動に対する細胞毒性作用を抑制した。また用量依存的にOMVの細胞への付着と侵入、および細胞のアポトーシス死を抑制した。これらの結果はクルクミンが、P.g-OMVの細胞障害作用に対して顕著な抑制効果を示し歯周病を予防する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔保健活動の高まりや歯科治療の進展により、成人すべての年代において残存歯数が増加している。それに伴い、急速に増加しているのが、高齢者における歯肉退縮に伴う根面う蝕である。歯周疾患とともに根面う蝕の予防を図ることが高齢者の口腔機能維持において重要であり、根面う蝕機序の解明や予防法の開発が喫緊の課題となっている。

クルクミンが歯周病原性菌の増殖を強く抑制すること、P. gingivalisのビルレンス因子であるタンパク質分解酵素の活性を阻害することで、高齢者における歯肉退縮を予防し、結果根面う蝕予防効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether curcumin protects human gingival epithelial cells (HGE) from the cytotoxic effects of Porphyromonas gingivalis (P.g.) outer membrane vesicles (OMVs). Curcumin significantly suppressed by curcumin in a dose-dependent manner and protein production was also suppressed. Furthermore, curcumin suppressed the cytotoxic effect of OMV on cell migration. Curcumin also dose-dependently inhibited OMV cell adhesion and invasion, as well as cell apoptotic death. These results indicate that curcumin has a significant inhibitory effect on the cytotoxic effect of P.g-OMV and may prevent periodontal disease.

研究分野：社会系歯学

キーワード：クルクミン 歯周病予防 根面う蝕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔保健活動の高まりや歯科治療の進展により、近年では成人すべての年代において残存歯数が増加している。それに伴い、急速に増加しているのが、高齢者における歯肉退縮に伴う根面う蝕である。歯周疾患とともに根面う蝕の予防を図ることが高齢者の口腔機能維持において重要であり、根面う蝕機序の解明や予防法の開発が喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

健康な口腔内状態を維持するための栄養素や機能性食品の臨床応用を目指した研究が進んでいる。申請者はこれまでに、クルクミンが歯周病原性菌の増殖を強く抑制すること、*P. gingivalis* のビルレンス因子であるタンパク質分解酵素の活性を阻害することを報告している (Izui et al, J Periodontol 2016)。本研究ではこれらの多様な活性を有するクルクミンを応用し、高齢者における歯肉退縮に伴う新規の根面う蝕予防素材の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

***P. gingivalis* OMV の調整**

P. gingivalis OMV OMZ314 の培養上清を、0.22 μ m のフィルターでろ過した後、遠心分離 100,000 \times g, 60 min, 4 $^{\circ}$ C で処理した。その後、OMV を含む沈殿物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.4) に懸濁した。OMV のタンパク質含量は、タンパク質アッセイキット (BCA protein assay kit) を用いて測定した。

OMV で刺激した HE 細胞における炎症反応の評価

Epi 4 細胞を 20 μ g/mL の OMV とともに、様々な濃度のクルクミン (和光純薬) の存在下または非存在下でインキュベートした。6 時間培養後、抽出液を用いて細胞から total RNA を抽出した。RNeasy Micro kit を用いて抽出し、相補的な反応液混合物 (PrimeScript RT Master Mix, Takara Bio) で相補的 DNA(cDNA)に逆転写した。リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を実施し IL-6、IL-1 β 、および TNF- α 遺伝子の mRNA 発現を定量した。サイトカインの産生は、酵素結合免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いて測定した。すべてのアッセイを 3 回に分けて実施した。

HE 細胞の遊走能と増殖能の評価

スクラッチアッセイを実施し、OMV と培養した Epi4 細胞の移動に対するクルクミンの効果を評価した。コンフルエントな細胞を鋭利なチップで軽く引っ掻き、その後、OMV と一緒に 20 μ g/mL の OMV とともにインキュベートした。スクラッチの閉鎖は、24 時間後に顕微鏡 (Axiovert 40) を用いて評価し、閉鎖率を決定した。

細胞増殖に対するクルクミンの効果を調査するために、細胞を 20 μ g/mL の OMV と 1.5 時間インキュベートし、PBS で 2 回洗浄した。その後、様々な濃度のクルクミンを培地に添加し 3 時間インキュベートした後、PBS で 2 回洗浄し、細胞増殖アッセイ試験 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies)を実施した。

HGE 細胞への OMV 侵入

このアッセイでは、HGE 細胞として Ca9-22 細胞 (ヒト歯肉扁平上皮癌細胞) を使用した。その理由はクルクミン非存在下で OMV と相互作用した Epi4 細胞が固定後の免疫染色に十分な耐性を示さなかったためである。

Ca9-22 細胞を、様々な濃度のクルクミンの存在下で 30 分間培養した後、20 μ g/mL の OMV を添

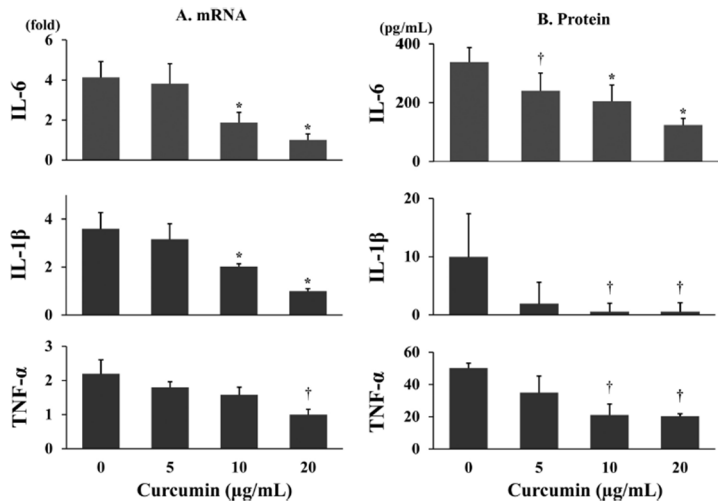
加した。37 °C で 3 時間インキュベートした後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4 %パラホルムアルデヒドで固定した。その後、0.1 % Triton X-100 (Sigma) in PBS 溶液で細胞を透過化し、1 % ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma) でブロッキングした。その後、PBS で 2 回洗浄し細胞骨格を Streptavidin-Oregon Green 488 conjugate (Molecular Probes)で 10 分間染色した。OMV の Ca9-22 細胞への侵入に対するクルクミンの効果は共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM ; LSM510、Carl Zeiss) を用いて調べた。OMV はウサギポリクローナル抗体でプローブした。

4 . 研究成果

OMV で刺激した HE 細胞における炎症反応の評価

OMV の添加により、Epi4 細胞の炎症性サイトカイン産生が顕著に増加することを確認した後、クルクミンの影響を調べたところ、クルクミンは、図 A に示すように IL-6、IL-1 β 、TNF の mRNA 発現を濃度依存的かつ有意に抑制した。

また、これらサイトカインのタンパク質レベルも、図 B に示すように濃度依存的に抑制した。

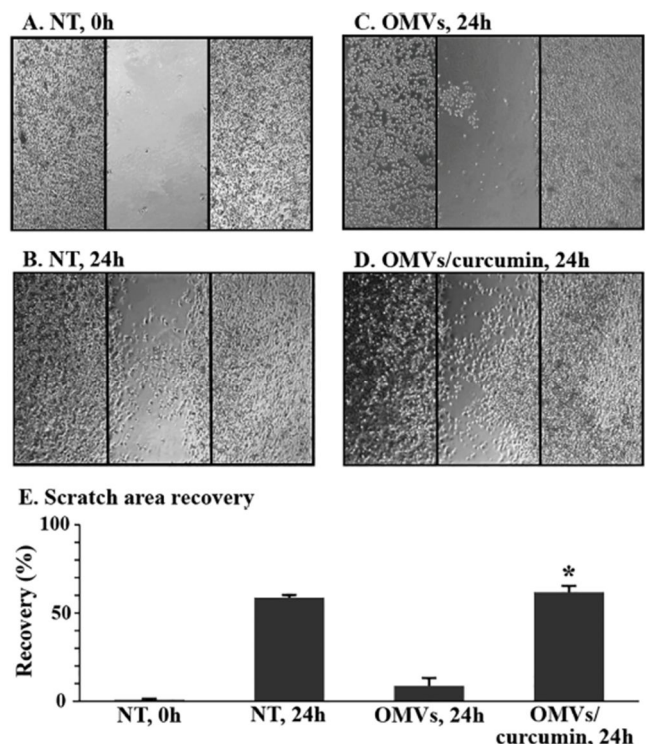


HE 細胞の遊走能と増殖能の評価

HE 細胞の遊走能の評価を示す。コンフルエントな細胞の外層を鋭利なチップで引っ掻いたものが図 A で示したものであるが、その 24 時間後には図 B、E で示すように 58.6% 遊走することが分かった。

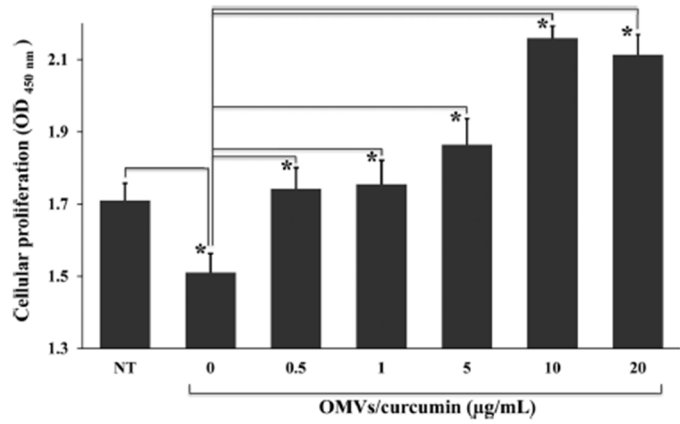
OMV を添加した場合、図 C、E に示すようにスクラッチの閉鎖は著しく抑制された。

一方、クルクミンを 10 μ g/mL 添加すると、図 D、E に示すように OMV の細胞傷害性作用が有意に抑制された。



HE 細胞の増殖能の評価を示す。

右図に示すように OMV(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と培養したものは、細胞増殖が著しく抑制された。一方、クルクミンは濃度依存的に細胞増殖を著しく促進し、OMV に曝露した場合でも、正常レベルに戻るには 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で十分であった。またクルクミンの量が 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると、HGE 細胞増殖のレベルは、未処理の細胞で見られたレベルよりも高くなった。

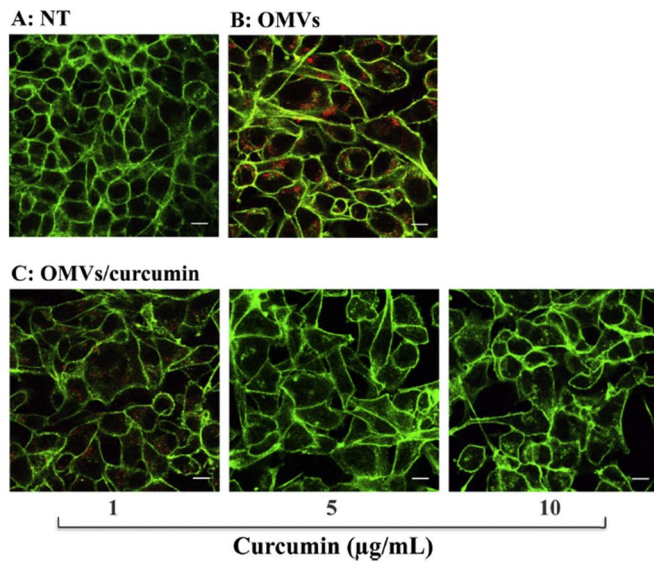


HGE 細胞への OMV 侵入

緑で示されるものが細胞骨格、赤で示されるものが OMV である。

図 A と B から、クルクミン非存在下において、OMV は細胞に付着、侵入し形態的な変化を起こした。

一方図 C で示されるように、クルクミンは OMV の付着と侵入を濃度依存的に阻害し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、OMV の侵入をほぼ完全に阻害した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shusuke Izui, Shinichi Sekine, Hiroki Murai, Hiroki Takeuchi, Atsuo Amano	4. 巻 124
2. 論文標題 Inhibitory effects of curcumin against cytotoxicity of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2021.105058	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泉井秀介
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisを有する歯周病患者に対しクルクミンを用いた初期治療で管理を行った症例
3. 学会等名 第30回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉井秀介、関根伸一、天野敦雄
2. 発表標題 PCR法を用いた新規歯周病菌測定装置の開発
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根伸一、泉井秀介、天野敦雄
2. 発表標題 歯周病細菌に対する5ALAを用いたPDTの効果の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018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
---------	---------