

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10151

研究課題名(和文) 柑橘類果皮含有生理活性物質を歯周炎治療に用いるための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of the bioactive substances of a skin of citrus fruits for periodontal disease treatment

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎は歯周病原性細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、過剰な免疫応答が歯周組織破壊に関与している事が報告されている。ゆえに抗炎症効果がある生理活性物質の候補を増やす事は重要であると考えられる。本研究では柑橘類果皮に含まれる生理活性物質であるノビレチンとスタチチンに着目し、抗炎症効果に対する基礎的研究を行った。その結果、ノビレチンとスタチチンはヒト歯根膜由来細胞が産生するケモカインなどの炎症性メディエーター産生を抑制できる事を明らかとした。ゆえに、ノビレチンやスタチチンを歯周炎病変局所に投与する事により歯周炎の進行を抑えることができ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

歯周炎はその進行により歯を喪失し国民のQOLの低下に関与する慢性炎症性疾患であり、糖尿病や心筋梗塞など他の疾患の病態への関与も報告されている。ゆえに歯周炎の進行や発症を抑える可能性がある抗炎症作用がある生理活性物質の候補を増やす事は重要であると考えられる。本研究では柑橘類果皮に含まれる生理活性物質であるノビレチンとスタチチンが歯周組織構成細胞に対して抗炎症作用がある事を明らかとした。普段廃棄される果皮に含まれる生理活性物質でもありSDGsの観点からも環境に優しい歯周炎に使用できる生理活性物質候補であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by periodontal pathogen, and it is reported that excessive immune response participates in periodontium destruction. Thus, it is thought that it is important to find new candidates of the bioactive substance which have anti-inflammatory effects. I focus on nobiletin and sudachitin which were the bioactive substance included in the skin of citrus fruits in this study and I examined the anti-inflammatory effects of nobiletin and sudachitin in vitro study. As a result, I found that nobiletin and sudachitin inhibited the inflammatory mediator productions such as chemokines in human periodontal ligament cells. Thus, this results suggested that the local application of nobiletin and sudachitin might decrease the inflammatory mediator expression in periodontal lesion.

研究分野：歯周治療学分野

キーワード：歯周炎 柑橘類果皮 生理活性物質 抗炎症作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯周病原性細菌が惹起する慢性炎症性疾患であり病状が進行すると歯を支える歯槽骨の破壊が加速し歯を失ってしまう事もある。また、歯周炎が糖尿病や心筋梗塞などの他の疾患の発症や進行に関わっている事も近年報告されている。歯周炎の進行には歯周炎病変局所において歯周組織構成細胞が様々な炎症性メディエーターを過剰に産生する事が関与していることが明らかとなっており、炎症性メディエーターの過剰な産生を抑制できるような物質を発見することが歯周炎の進行を抑えるうえで重要だと考えられている。

柑橘類果皮は現在ほとんどが廃棄されているが、近年柑橘類果皮に様々な生理活性物質が含まれていることが明らかとなってきている。今回の研究では柑橘類果皮に含まれる生理活性物質の中でも日本でよく利用されている柑橘類果皮に含まれているノビレチンとスダチチンに着目した。ノビレチンはシークワサー、ポンカン、タチバナなどの柑橘類果皮に多く含まれている有機化合物でポリメトキシフラボノイドの一種である。ノビレチンはこれまでに抗炎症作用、抗癌作用、抗菌作用など様々な生理活性作用がある事が報告されている。また、スダチチンはスダチ果皮に多く含まれているポリメトキシフラボノイドでありノビレチンと同様に抗癌作用や抗炎症作用がある事が明らかとなっている。しかしながら、ノビレチンやスダチチンを歯周炎治療に用いようとする試みはなく、歯周組織構成細胞に対する影響を調べた報告は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究ではノビレチンとスダチチンの抗炎症作用を明らかとするために、炎症性サイトカイン刺激が誘導する歯周組織構成細胞の炎症性メディエーター産生を抑制できるか否かを明らかと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 が産生するサイトカイン、ケモカイン、接着分子、matrix metalloproteinase (MMP)などの発現に与えるノビレチンあるいはスダチチンの影響を調べる事とした。さらにノビレチンおよびスダチチンのシグナル伝達経路の活性化に影響を与えるか明らかとするために炎症性サイトカイン刺激により活性化されるシグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK)s, nuclear factor (NF)- κ B, protein kinase B (Akt)経路の活性化に与えるノビレチンあるいはスダチチ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 を含む Dulbecco's modified Eagle medium 培地において 37 °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 のサイトカイン、ケモカイン、MMP 産生の解析:

(1)の条件で培養した HPDLC を interleukin (IL)-1 あるいは tumor necrosis factor (TNF)-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 IL-6, IL-8, C-X-C motif chemokine ligand (CXCL)10, C-C motif chemokine ligand (CCL)2, CCL20, MMP-1, MMP-3 あるいは tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 濃度を解析した。一部の試験においてノビレチン、スダチチンあるいは Akt 阻害剤 (10DEBC hydrochloride) 存在下で、IL-1 あるいは TNF- 刺激を 24 時間行い、培養上清中の IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, CCL20, MMP-1, MMP-3 あるいは TIMP-1 濃度を ELISA 法を用い解析した。

(3) HPDLC の接着分子あるいは COX-2 発現の解析:

(1)の条件で培養した HPDLC をノビレチン存在下あるいは非存在下において IL-1 あるいは TNF- で 24 時間刺激した後、総タンパクを回収した。その後、western blot 法を用い、intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 あるいは cyclooxygenase (COX)-2 の発現を解析した。

(4) HPDLC のシグナル伝達経路活性化の解析:

(1)の条件で培養した HPDLC をノビレチンあるいはスダチチンの存在下あるいは非存在下で IL-1 あるいは TNF- で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激し、総タンパクを回収した。その後 western blot 法を用いて p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), I κ B kinase (IKK)- β , NF- κ B p65, Akt のリン酸化を解析した。

4. 研究成果

(1) ノビレチンが IL-1 β 刺激 HPDLC の炎症性メディエーター産生およびシグナル伝達経路に与える影響:

ノビレチン(12.5, 25, 50, 100 μ M)存在下で IL-1 (1 ng/ml) で HPDLC を 24 時間刺激した後に、IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, CCL20, MMP-1, MMP-3 および TIMP-1 産生を ELISA 法

を用いて確認したところ、IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, CCL20, MMP-1 および MMP-3 産生はノビレチン濃度依存的に有意に抑制された。また、TIMP-1 産生はノビレチン存在下でも影響を受けなかった。また、ノビレチン(25, 50, 100 μ M)存在下でIL-1 (1 ng/ml)でHPDLCを24時間刺激し、細胞内のICAM-1 および VCAM-1 発現を western blot 法を用いて解析した。その結果、ノビレチン存在下においてIL-1 で誘導されたICAM-1 および VCAM-1 発現は減少した。さらにノビレチン(50 あるいは 100 μ M)で1時間HPDLCを前処理した後に、IL-1 (1 ng/ml)でHPDLCを15, 30 あるいは60分刺激を行い、細胞内のMAPKs, Akt およびNF- κ B経路の活性化を western blot 法で解析した。その結果、p38 MAPK, ERK, JNK, Akt, IKK- γ / およびNF- κ B p65 のリン酸化の程度はノビレチン前処理により減少した。

(2) ノビレチンが TNF- α 刺激 HPDLC の炎症性メディエーター産生およびシグナル伝達経路に与える影響:

ノビレチン(12.5, 25, 50, 100 μ M)存在下でTNF- α (10 ng/ml)でHPDLCを24時間刺激した後に、IL-8, CXCL10, CCL2, MMP-1, MMP-3 およびTIMP-1産生をELISA法を用いて確認したところ、IL-8, CXCL10, CCL2, MMP-1 およびMMP-3産生はノビレチン存在下で有意に減少した。また、TIMP-1産生はノビレチンが存在しても影響を受けなかった。また、ノビレチン(25, 50, 100 μ M)存在下でTNF- α (10 ng/ml)でHPDLCを24時間刺激し、細胞内のCOX-2発現を western blot 法を用いて解析した。その結果、ノビレチン存在下においてIL-1で誘導されたCOX-2発現は減少した。さらにノビレチン(50 あるいは 100 μ M)で1時間HPDLCを前処理した後に、TNF- α (10 ng/ml)でHPDLCを15, 30 あるいは60分刺激を行い、細胞内のMAPKs, Akt およびNF- κ B経路の活性化を western blot 法で解析した。その結果、ERK, Akt, IKK- γ / およびNF- κ B p65 のリン酸化の程度はノビレチン前処理により減少したが、p38 MAPK および JNK のリン酸化はノビレチン処理では変化しなかった。

(3) スダチチンが IL-1 β 刺激 HPDLC の炎症性メディエーター産生およびシグナル伝達経路に与える影響:

スダチチン(6.25, 12.5, 25, 50 μ M)存在下でIL-1 (1 ng/ml)でHPDLCを24時間刺激した後に、IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, MMP-1, MMP-3 およびTIMP-1産生をELISA法を用いて確認したところ、IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, MMP-1 およびMMP-3産生はスダチチン処理により有意に減少した。また、TIMP-1産生はスダチチンが存在しても影響を受けなかった。また、スダチチン(25 あるいは 50 μ M)で1時間HPDLCを前処理した後に、IL-1 (1 ng/ml)でHPDLCを15, 30 あるいは60分刺激を行い、細胞内のMAPKs, Akt およびNF- κ B経路の活性化を western blot 法で解析した。その結果、Akt, IKK- γ / およびNF- κ B p65 のリン酸化の程度はスダチチン前処理により減少した。一方、p38 MAPK, ERK および JNK のリン酸化はスダチチン前処理で影響を受けなかった。

(4) スダチチンが TNF- α 刺激 HPDLC の MMP 産生およびシグナル伝達経路に与える影響:

スダチチン(6.25, 12.5, 25, 50 μ M)存在下でTNF- α (10 ng/ml)でHPDLCを24時間刺激した後に、MMP-1, MMP-3 およびTIMP-1産生をELISA法を用いて確認したところ、MMP-1 およびMMP-3産生はノビレチン存在下で有意に減少した。また、TIMP-1産生はスダチチン(50 μ M)存在下で有意に増加した。また、スダチチン(25 あるいは 50 μ M)で1時間HPDLCを前処理した後に、TNF- α (10 ng/ml)でHPDLCを15, 30 あるいは60分刺激を行い、細胞内のMAPKs, Akt およびNF- κ B経路の活性化を western blot 法で解析した。その結果、Aktリン酸化の程度はスダチチン前処理により減少したが、p38 MAPK, ERK, JNK あるいはNF- κ B経路の活性化はスダチチン前処理では変化しなかった。また、Akt阻害剤前処理はTNF- α が誘導したMMP-1 あるいはMMP-3産生を抑制し、TIMP-1産生を増加した。

これらの結果より炎症性サイトカインであるIL-1 やTNF- α は歯周組織構成細胞のHPDLCに多種類の炎症性メディエーター産生を誘導する事により歯周炎の発症および増悪に関与している事が示唆された。また、柑橘類果皮含有生理活性物質であるノビレチンやスダチチンを歯周炎局所に投与する事で炎症性メディエーター産生が抑制され歯周炎の進行が抑えられる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10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 4件）

1. 著者名 Hosokawa Ikuko, Hosokawa Yoshitaka, Ozaki Kazumi, Matsuo Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Carnosic acid inhibits inflammatory cytokines production in human periodontal ligament cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunopharmacology and Immunotoxicology	6. 最初と最後の頁 373 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08923973.2020.1782427	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 Hosokawa Yoshitaka, Hosokawa Ikuko, Ozaki Kazumi, Matsuo Takashi	4. 巻 2021
2. 論文標題 The Polymethoxy Flavonoid Sudachitin Inhibits Interleukin-1 -Induced Inflammatory Mediator Production in Human Periodontal Ligament Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/8826586	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 Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Sudachitin Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Production in Tumor Necrosis Factor- - Stimulated Human Periodontal Ligament Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1456-1462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01007-z.	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 Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Carnosic Acid Inhibits CXCR3 Ligands Production in IL-27-Stimulated Human Oral Epithelial Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 1311-1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-00991-6	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 細川 義隆	4. 巻 62
2. 論文標題 歯周炎病変局所への白血球浸潤メカニズムの解析ならびに歯周炎治療薬の探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 260 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.62.260	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 Hosokawa Yoshitaka, Hosokawa Ikuko, Ozaki Kazumi, Matsuo Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Nobiletin Inhibits Inflammatory Reaction in Interleukin-1 α -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 667 ~ 667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13050667	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 Hosokawa Yoshitaka, Hosokawa Ikuko, Ozaki Kazumi	4. 巻 2021
2. 論文標題 Nobiletin Decreases Inflammatory Mediator Expression in Tumor Necrosis Factor- α -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mediators of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5535844	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 細川育子、細川義隆	4. 巻 5
2. 論文標題 香辛料含有成分を歯周炎治療に用いるための基礎的研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 784 ~ 788
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 無
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 細川育子、細川義隆	4. 巻 47
2. 論文標題 柑橘類果皮含有生理活性物質を歯周炎治療に応用するための基礎的研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 36～37
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 無
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 細川育子、細川義隆	4. 巻 23
2. 論文標題 香辛料含有成分を歯周炎治療に用いるための基礎的研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 75～78
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 無
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 細川義隆、細川育子、尾崎和美
2. 発表標題 Sudachitinはヒト歯根膜由来細胞のIL-1 誘導炎症性メディエーター産生を抑制する
3. 学会等名 2020年度日本歯科保存学会春季学術大会 (第152回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川育子、細川義隆、尾崎和美
2. 発表標題 Carnosic Acidはヒト歯根膜由来細胞のIL-1 誘導炎症性サイトカイン産生を抑制する
3. 学会等名 2020年度日本歯科保存学会春季学術大会 (第152回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志
2. 発表標題 Nobiletinはヒト歯根膜由来細胞のIL-1 誘導炎症性メディエーター産生を抑制する
3. 学会等名 2021年度日本歯科保存学会春季学術大会（第154回）
4. 発表年 2021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	中西 正 (NAKANISHI Tadashi) (00217770)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	細川 育子 (HOSOKAWA Ikuko) (50707908)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

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