

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17065

研究課題名(和文)ドーパミンシグナル着目した好中球性炎症を抑制する歯周病治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of periodontal therapy by inhibiting neurotrophic inflammation via dopamine signaling

研究代表者

磯崎 祐太 (Isozaki, Yuta)

埼玉医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：60828218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GE1細胞は、carrageenan刺激によりCXCL1およびIL-17RAの発現が上昇し、IL-17A刺激によりCXCL1の発現が上昇した。Ropinirole はcarrageenan刺激によるCXCL1とIL-17RAの発現上昇ならびにIL-17A刺激によるCXCL1発現上昇を抑制した。また、carrageenan誘導性歯周病モデルにおいて、HE染色にて炎症性細胞浸潤が認められたがropinirole 処理により炎症性細胞浸潤が抑制された。同モデルにおける μ CT 解析で上顎第二臼歯周囲の歯槽骨吸収が認められたが、ropinirole処理により歯槽骨吸収が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果で得られたD2様受容体アゴニストであるropiniroleがGE1細胞に作用して炎症を抑制するメカニズムは新たな知見であり、今後新たな歯周病治療薬開発の可能性を示している。今後はその他のD2様受容体アゴニストに加え、相反する作用を示すD1様受容体アゴニストやD2様受容体アンタゴニストを使用した研究を行うことでさらに意義のある研究になると考える。また、歯周病患者で局所と全身でTh17細胞の誘導およびdopamine濃度について検討することでD2様受容体アゴニストの局所投与と全身投与の方法に関して知見を得ることができ、新しい歯周病の治療法開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We explored whether the dopamine 2-like receptor agonist, ropinirole, suppresses neutrophilic inflammation and alveolar bone loss. We used a carrageenan-induced rat model of periodontitis with or without ropinirole. GE1 cells, the murine gingival epithelial cell line, were stimulated with carrageenan and IL-17A in the presence or absence of ropinirole. The effect of ropinirole was analyzed using RT-PCR and ELISA. Subsequently, in the carrageenan-induced rat model of periodontitis, alveolar bone resorption was observed in the maxillary second molar by μ CT analysis, and ropinirole suppressed the alveolar bone destruction. The expression levels of CXCL1 and IL-17RA in GE1 cells were increased by carrageenan, and CXCL1 expression in GE1 cells was upregulated under IL-17A stimulation. Moreover, ropinirole inhibited CXCL1 and IL-17RA expression in GE1 cells in the presence of IL-17A and carrageenan. Finally, haloperidol promoted CXCL1 expression in GE1 cells in the presence of carrageenan.

研究分野：口腔外科学

キーワード：GE1細胞 IL-17 CXCL1 ropinirole D2受容体 carrageenan 歯周病 haloperidol

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原性細菌が引き起こす炎症性疾患である[Hajishengallis G, Trends Immunol 2014]。細菌は歯肉溝に進入してバイオフィルムを形成し、これに抵抗する生体の反応として、歯肉上皮細胞は IL-8 等のケモカインを産生し好中球を引き寄せ、好中球主体の炎症反応を引き起こす。好中球による貪食作用に加えて、樹状細胞の Toll-like 受容体を介した自然免疫が惹起される。続いて樹状細胞が IL-12 や IL-23 を産生することで、Th1 細胞/Th17 細胞を誘導し T 細胞による獲得免疫の応答がなされる。活性化した T 細胞は、破骨細胞誘導因子である RANKL を含むさまざまなサイトカインを産生し、歯槽骨吸収を引き起こす。歯周病の治療は現在、外科治療が主体であり、特殊メンブレンを留置する Guided Tissue Regeneration 法や幼若ブタの歯胚から抽出・精製した enamel matrix derivative (Emdogain®)を用いた方法により、歯根膜や骨を誘導する治療法の開発が進められてきた。最近では FGF-2 の局所注入を外科治療後に併用することで歯周組織の再生を促進させる治療が保険適用となっている。このように喪失した歯根膜・骨に対する再生治療の開発は進んでいるが、炎症自体を軽減させる治療法の開発はほとんど進んでいない。治療法の開発にあたり Yamamoto らは carrageenan を用いた歯周病モデルラットを提案している[Yamamoto H, J Hard Tissue Biol 2011]。carrageenan は齧歯類に投与すると消化管に潰瘍を形成する炎症誘発物質で、消化管上皮細胞において NF- κ B の核内移行を引き起こし、IL-8 産生を促進する[Borthakur A, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007][Santos LA, Int Immunopharmacol 2014]。このモデルは薬剤を浸漬させた絹糸を歯肉溝に入れる簡便な方法であり、有用性が高い歯周病モデルであると考えられる。本学免疫学教室の松下らのグループは、樹状細胞と T 細胞間のコミュニケーションを行う分子としてドーパミンが重要であることを提唱している。Nakano らはドーパミンが樹状細胞から産生され Th17 細胞の分化に関わることを報告した[Nakano K, Biochem Biophys Res Commun 2008][Nakano K, Int Immunol 2009]。ドーパミン受容体は、D1 と D5 を含む D1 様受容体および D2, D3, D4 を含む D2 様受容体の 2 種類に分類される。D1 様受容体アンタゴニストをターゲットとした既存のパーキンソン治療薬が、IL-17 産生を抑制することにより、多発性硬化症・I 型糖尿病・腎毒性血清腎炎における炎症の軽減に寄与することを示した[Nakano K, Biochem Biophys Res Commun 2008][Hashimoto K, Biochem Biophys Res Commun 2009][Okada H, Am J Nephrol 2009]。さらに最近、活性化 Th1/Th17 細胞自体が IL-8 を大量に産生していること、D2 様受容体アゴニストが活性化 Th1/Th17 細胞からの IL-8 産生を抑制することを見出している[Matsuyama T, Clin Exp Neuroimmunol 2018]。これらのことから、D2 様受容体アゴニストは、自然免疫と獲得免疫を介して、すでに成立している好中球性炎症を抑制すると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、D2 様受容体アゴニストであり、すでにパーキンソン病の治療薬として使用されているロピニロールに着目した。歯周病モデルラットにおける好中球性炎症および歯槽骨吸収を抑制する可能性を検討する。また、歯肉上皮細胞を用いて、ロピニロールによる炎症性サイトカイン産生の抑制が起こるかどうか、in vitro 実験で検証する。

3. 研究の方法

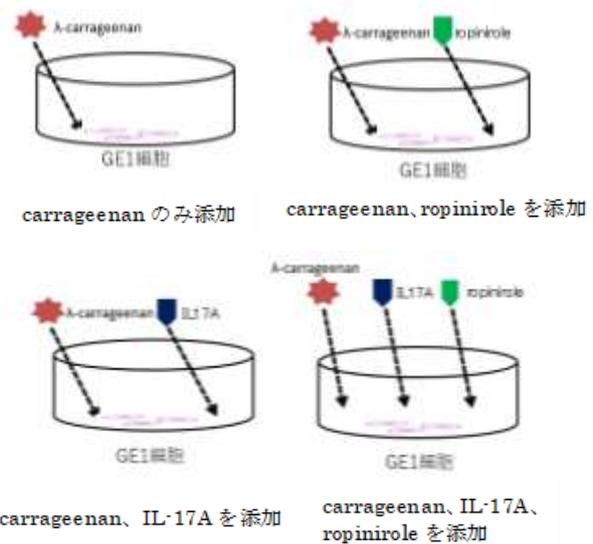
【細胞培養】

マウス由来歯肉上皮細胞株として、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した GE1 細胞を用いた。1% fetal bovine serum、100 U/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin、10 ng/mL epithelial growth factor を添加した培養液 SFM-101 で培養した。すべての細胞培養は

2~3 日毎に培地交換を行い、二酸化炭素濃度 5%, 33 °C の環境下で培養を行った。

【試薬および処理方法】

Carrageenan として λ -carrageenan、D2 様受容体アゴニストとして ropinirole、IL-17 のリコンビナントタンパク質として Carrier free, recombinant mouse IL-17A を使用した。GE1 細胞を 24 well plate に 30×10^4 cell で播種後、0、1、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ropinirole を添加した。1 時間後に 0、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ λ -carrageenan および 0、0.5、2 ng/mL recombinant mouse IL-17A を添加し、24 時間後に培養液および細胞を回収した。



【定量 RT-PCR】

回収した細胞を氷冷 PBS で洗浄し QIAzol Lysis Reagent を 1 mL 加えてスクレイパーで回収し、プロトコールに従って全 RNA を抽出し、NanoDrop 2000 Spectrophotometer で濃度を測定した。全 RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription kit により cDNA に変換し、TaqMan Gene Expression Assays を含む反応液 20 μL を用いて TaqMan 法による定量 RT-PCR を行った。StepOnePlus Real-Time PCR System を用いて 95 °C で 20 秒、続いて 95 °C で 1 秒、60 °C で 20 秒の 40 サイクルを行った。定量 RT-PCR の分析に関して、比較 Ct 法を用いて GAPDH を内部標準とした。

【ELISA 法】

回収した培養液中の CXCL1 タンパク質濃度について、mouse CXCL1 ELISA Kit を用いてプロトコールに従い測定した。

【歯周病モデルラット作製】

Wistar ラットを使用し、 λ -carrageenan を用い carrageenan 誘導性歯周病ラット (CIEP ラット) を作製した。対照群は PBS を浸漬した絹糸を用いた群 (PBS 群)、実験群は 1% λ -carrageenan を浸漬した絹糸を用いた群 (CA 群) と、1% λ -carrageenan に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ropinirole を浸漬した絹糸を用いた群 (CA/RP 群) とした。麻酔方法は 0.15 mg/kg medetomidine hydrochloride、2 mg/kg midazolam、2.5 mg/kg butorphanol の 3 種混合麻酔を用いて、腹腔内投与した。麻酔下にてラットの両側上顎第一臼歯~第三臼歯口蓋側歯肉を #12 メスで歯肉溝内切開を行い、剥離子で歯肉を翻転させた。溶液を浸漬した直径 1 mm の絹糸を 2 mm 程度に調整し、両側上顎第二臼歯周囲に挿入した。週に 1 回絹糸を交換し、4 週間後に、200 mg/kg sodium pentobarbital を腹腔内過剰投与し、安楽死させた。

【標本】

安楽死させた歯周病モデルラットにおいて、両側第二臼歯および口蓋側歯肉を含めて採取した上顎骨を 4% paraformaldehyde (PFA) 固定、顎骨を採取したものを 70% ethyl alcohol (EtOH) 固定し標本とした。

【組織学的評価】

4% PFA 固定した標本を 0.5 mol/L EDTA に浸漬して脱灰処理を行った。アルコール脱水後、パラフィン包埋し 4 μm にスライスした。キシレンで脱パラフィン処理し、HE 染色を行った。

【μCT 解析】

70%EtOH 固定した標本について、30 mm×75 mm のサンプルホルダーに入れ、μCT にて歯槽骨吸収の評価を行った。μCT で 3D 画像を作製し、両側上顎第一臼歯および第二臼歯口蓋側中央部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの垂線距離を測定し、歯槽骨の吸収状態を評価した。

4. 研究成果

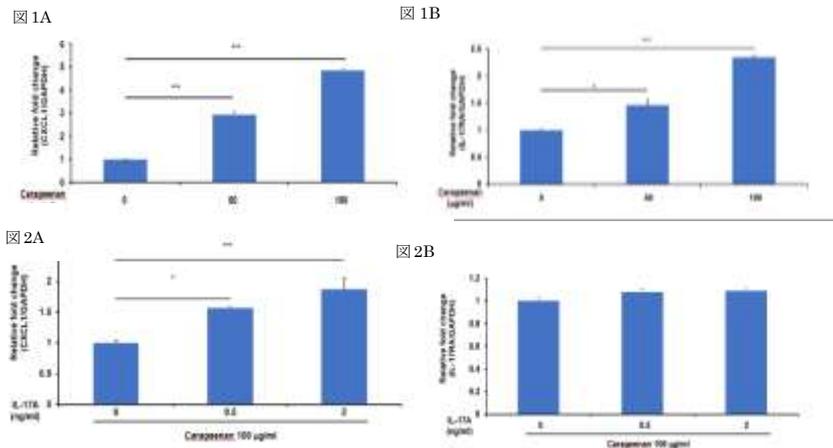
1) GE1 細胞に対する Carrageenan の作用

Carrageenan は上皮系細胞に対して IL-8 産生を促進し炎症を惹起することから、マウス歯肉上皮細胞 GE1 細胞にお

いて carrageenan 刺激を加えることで CXCL1 産生を誘導するかどうかを検討した。定量 RT-PCR において、

carrageenan は濃度依存性に CXCL1 の遺伝子発現を上昇させた ($p < 0.001$ 図 1A)。ま

た、Th17 細胞から産生される IL-17A が GE1 細胞へ作用することで引き起こされる免疫反応を想定し、GE1 細胞における carrageenan 刺激による IL-17RA の発現ならびに IL-17A 刺激による CXCL1 と IL-17RA 発現を調べた。Carrageenan 刺激により IL-17RA 発現は上昇していた ($p < 0.001$ 図 1B)。また、IL-17A 刺激により CXCL1 発現は上昇したが ($p < 0.001$ 図 2A)、IL-17RA 発現に変化は認められなかった ($p = 0.176$ 図 2B)。



2) GE1 細胞に対する Ropinirole の作用

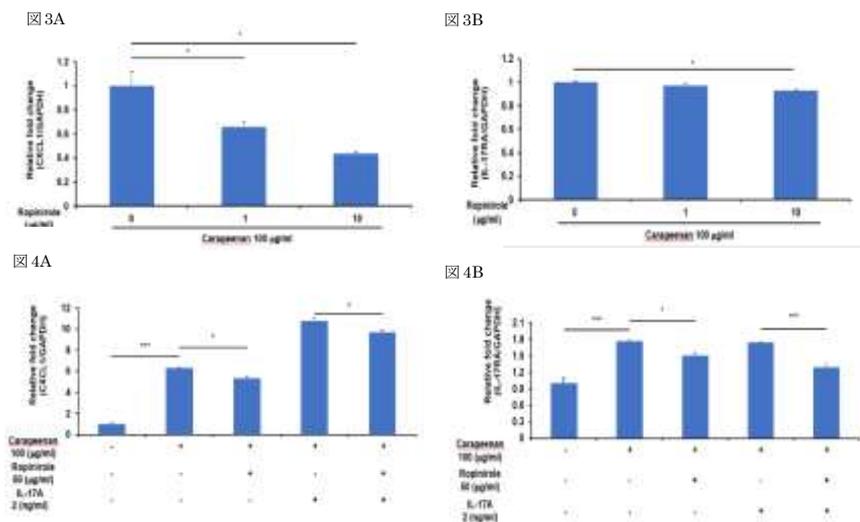
ropinirole が carrageenan 刺激による CXCL1 および IL-17RA の発現上昇を抑制するかどうか検討した。定量 RT-PCR において、ropinirole は

濃度依存性に GE1 細胞の CXCL1 の遺伝子発現を低下させ ($p < 0.05$ 図 3A)、高濃度において

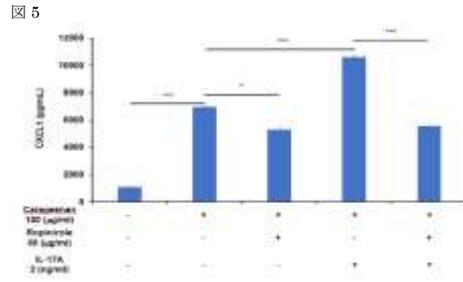
IL-17RA の遺伝子発現を低下させた ($p < 0.05$ 図 3B)。さら

に、ropinirole が IL-17A 存在下における carrageenan 刺激によ

る CXCL1 および IL-17RA の発現上昇を抑制するかどうか検討した。定量 RT-PCR において、ropinirole は IL-17A 共存の有無に関わらず、GE1 細胞の CXCL1 および IL-17RA の遺伝子発現を低下させた ($p < 0.05$ 図 4A, $p < 0.001$ 図 4B)。ELISA 法においても、ropinirole 添加群は非添加

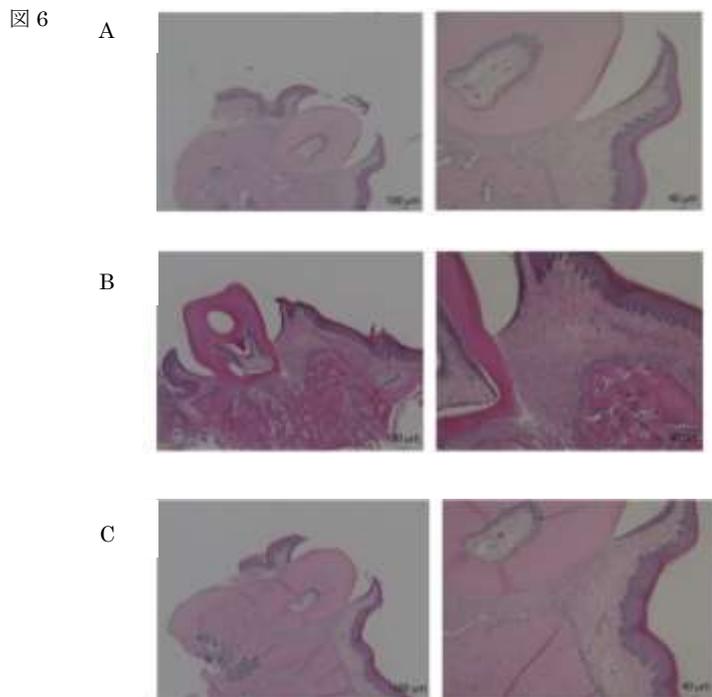


群と比較して、IL-17A 共存の有無に関わらず GE1 細胞の CXCL1 発現を低下させた (p<0.001 図 5)。



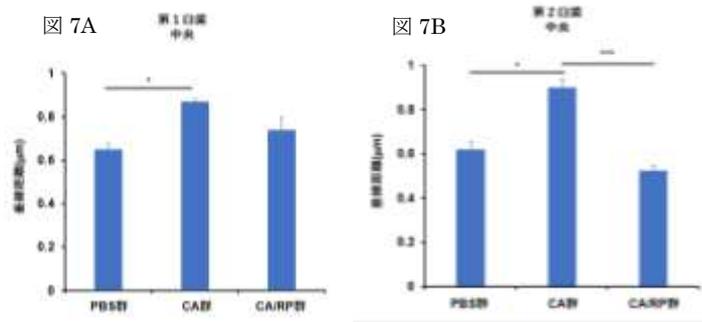
3) Carrageenan 誘導性歯周病ラットにおける ropinirole の歯肉組織への作用

*In vitro*での結果を踏まえて、*in vivo*での実験を行った。CIEP ラットを作製し ropinirole の作用を調べた。まず、歯肉組織の炎症性細胞浸潤の評価のために HE 染色を行った。PBS 群と比較して CA 群で歯肉組織におけるリンパ球、好中球の浸潤が顕著であり、少量の好酸球も認められた (図 6B)、CA/RP 群においては、これら炎症性細胞浸潤の抑制が認められた (図 6C)。



4) Carrageenan 誘導性歯周病ラットにおける ropinirole の歯槽骨への作用

次に μ CT を用いて、上顎第一臼歯および第二臼歯口蓋側中央部のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの垂線距離を測定した。CA 群では PBS 群と比較して垂線距離が長く (p<0.05 図 7A、図 7C)、CA/RP



群では CA 群と比較して短くなっていた (p<0.001 図 7B、図 7C)。本実験より、ropinirole が *in vivo*において炎症および骨吸収を抑制することが示唆された。

【統計解析】

統計的有意差は、ANOVA を行い、F 値を求め統計的に有意であることを確かめた後、Turkey 法にて検討し、p<0.05 で有意差ありとした。

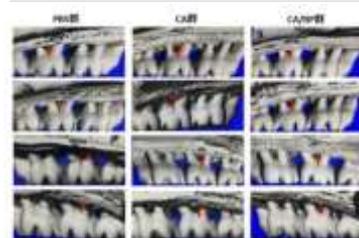


図 7C

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 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Isozaki Yuta, Sato Tsuyoshi, Takagi Rie, Ito Ko, Usui Michihiko, Kawano Masaaki, Matsushita Sho | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Ropinirole inhibits inflammatory cytokine production in gingival epithelial cells and suppresses alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine | 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） 10.3892/etm.2022.11777 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|