

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792358

研究課題名(和文) β-クリプトキサンチンを用いた新たな歯周病予防・治療薬の開発

研究課題名(英文) β-Cryptoxanthin regulates bone resorption related cytokine production in human periodontal ligaments cells.

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) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：β-クリプトキサンチン(以下、β-cry)は、温州みかんに豊富に含有されているカロテノイドで、発がん抑制作用や抗酸化作用、糖尿病や骨粗鬆症の予防や体脂肪低減効果について報告されている。β-cryは歯周病原因子により生じる歯周病の骨吸収を予防する可能性が示唆された。さらに、*P. gingivalis*由来LPS刺激前にβ-cryを添加すると炎症性サイトカインの発現が減少した。また、細胞内シグナル伝達に關与するERK・p38の活性阻害する事で、炎症性サイトカインの産生が抑制されたと考えられた。β-cryは歯周病において予防・治療効果を期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：β-cryptoxanthin(β-cry) is a carotenoid that is contained in abundance in mandarin . β-cry not only inhibits carcinogenesis and has an antioxidative effect, it can also prevent osteoporosis and diabetes and can decrease body fat. This study suggest that β-cry may prevent bone resorption in periodontitis. In addition, inflammatory cytokine expression is decreased upon addition of β-cry before stimulation by *P. gingivalis* LPS in gingival fibroblasts. Production of inflammatory cytokines was suppressed by the inhibition of the activity of the ERK and p38 that are involved in intracellular signaling .It has been suggested that, β-cry is a carotenoid that can be expected therapeutic and preventive effect on periodontitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：予防医学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)  $\beta$ -クリプトキサンチン ( $\beta$ -cryptoxanthin 以下、 $\beta$ -cry) は、温州みかんに豊富に含有されているカロテノイドで、日本人における血中濃度が外国人と比較して高いことが知られている (図 1)。近年、数多くの研究から  $\beta$ -cry の健康増進作用は、他のカロテノイドに比べ、勝るとも劣るものでなく、発がん抑制作用や抗酸化作用、糖尿病や骨粗鬆症の予防、体脂肪低減効果や美容効果が明らかになった。これに加え、60-70 歳の西欧人の歯周病罹患率は血清中の  $\beta$ -cry 値が低いと上昇し、 $\beta$ -cry が歯槽骨の吸収を抑制する。このため、これらの健康増進作用のなかでも、特に、生活習慣病である歯周病に対する  $\beta$ -cry の効果が注目されている。

## 2. 研究の目的

$\beta$ -cry を用いて、歯周病原細菌や歯周病のリスクファクターであるメカニカルストレスおよび移植医療の際に使用され歯肉増殖を誘発する免疫抑制剤シクロスポリンに対する歯周組織への効果を組織学・免疫学的に検討することである。これにより、歯周組織の健康保持や歯肉炎・歯周炎・歯肉増殖といった歯周病の予防や治療を目的とした  $\beta$ -クリプトキサンチンの新たな可能性を検討することである。

## 3. 研究方法

(1)  $\beta$ -cry は、Uchiyama らの報告に従い、最終濃度を  $1 \times 10^{-7} \text{mol/l}$  に調整した。h-PDL 細胞は、便宜抜歯により得られた健康に正常に萌出した上顎智歯から採取した。初代培養後に 3 から 4 代継代したものを h-PDL 細胞とした。歯周病原菌は、偏性嫌気性グラム陰性

桿菌 *P.gingivalis* ATCC 33277 を使用し、5%羊血寒天培地(ニッスイ,東京) 上で嫌気培養,  $1 \times 10^7 \text{CFU/ml}$  に調整された。h-PDL 細胞は、静水圧負荷装置内に静置し、MS (1 ないし 6MPa, 60 分間) を負荷 (MS 群), または、*P.gingivalis* 刺激 (細菌群) を行った。 $\beta$ -cry は MS 群, 細菌群ともに添加され, 24 時間培養した。サイトカインの発現と産生量の検討は、インターロイキン (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子), オステオプロテグリン (OPG), NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド (RANKL) に対して RT-PCR 法および ELISA を用いて分析した。また、倒立位相差顕微鏡を用いて、 $\beta$ -cry 添加と  $\beta$ -cry 非添加における MS 群および細菌群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

(2) 実験にはヒト正常歯肉線維芽細胞株 (以下 Gin-1) を用いた。Gin-1 を 10%FBS/DMEM で満たしたプレートに播種し、コンフルエントに達した後に、 $1 \mu\text{g/ml}$  *P.gingivalis* 由来 LPS で刺激した。また、 $\beta$ -cry は DEMSO(dimethyl sulfoxide) を用いて溶解し  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  に調整し用いた。

*P.gingivalis* 由来 LPS 刺激前に  $\beta$ -cry を添加した群を予防群とした。一方、*P.gingivalis* 由来 LPS 刺激後に  $\beta$ -cry を添加した群を治療群とした。また、Gin-1 に対して *P.gingivalis* LPS 刺激のみの群を LPS 刺激群、刺激をしていない群をコントロール群とした。

次に、炎症性サイトカインであるインターロイキン (以下、IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8、腫瘍壊死因子 (以下、TNF)- $\alpha$  について、real time PCR 法を用い遺伝子発現を解析した。Gin-1

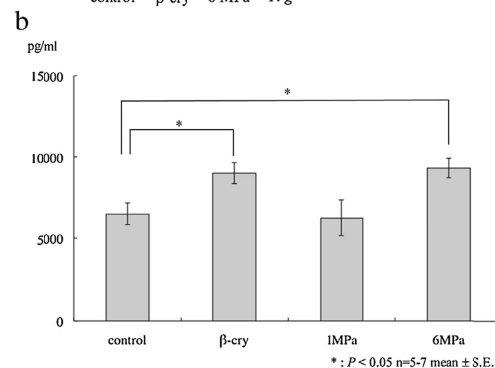
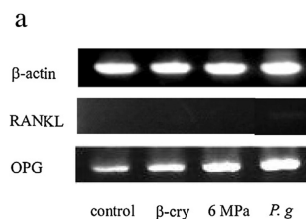
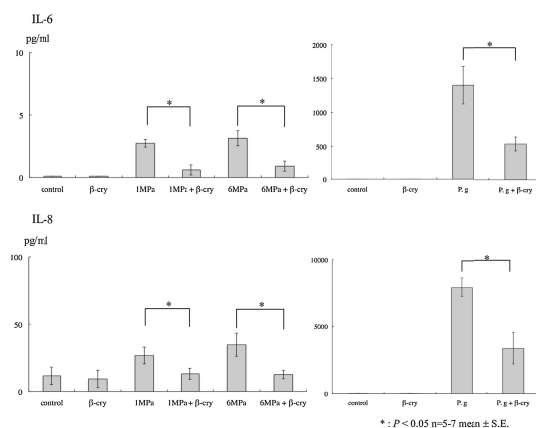
の細胞形態は、位相差顕微鏡を用いてコントロール群・LPS 刺激群・予防群・治療群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

(3) 実験には歯周組織を構成する主要細胞であるヒト正常歯肉線維芽細胞(以下 HGF)を用いた。HGF を  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度でプレートに播種、サブコンフルエントに達した後、 $\beta$ -cry ( $1 \times 10^{-7}$  M) を添加した。24 時間後 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (100  $\mu$ g/ml) で刺激し、さらに 24 時間後培養上清を回収した。細胞は PBS で洗浄後、Lysis Buffer で溶解し、細胞溶解液を抽出した。培養上清中の炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  を CBA システムによりタンパク量を定量した。次に、細胞溶解液中の、リン酸化タンパク (ERK・JNK) の濃度を CBA システムで定量した。これらの解析はフローサイトメトリー Canto を使用した。

#### 4. 研究成果

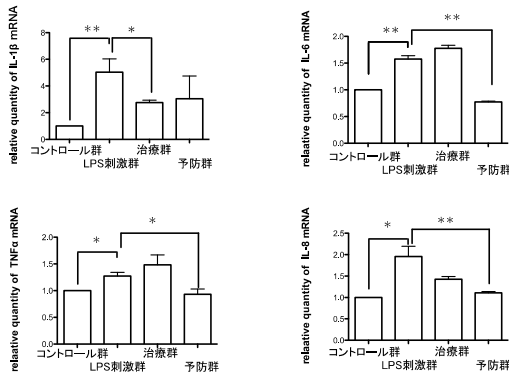
(1) h-PDL 細胞に  $\beta$ -cry 添加後、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、そして TNF- $\alpha$  mRNA の発現は認められなかったが、*P.gingivalis* 刺激後、これらサイトカイン mRNA の発現が認められた。一方で、6MPa の MS 負荷後、IL-6、IL-8 mRNA の発現が認められた。さらに、 $\beta$ -cry 負荷により、*P.gingivalis* に対する h-PDL 細胞の IL-6、IL-8 産生量は有意に減少した。それ以上に、 $\beta$ -cry が MS に対するそれらサイトカインの産生能を有意に減少させた。また、 $\beta$ -cry は、h-PDL 細胞の形態学的な変化、viability に影響を与えなかった。RT-PCR を用いて、h-PDL 細胞に  $\beta$ -cry 添加後、RANKL

と OPG mRNA 発現を調査し、 $\beta$ -cry が骨吸収に与える影響に検討を加えた。その結果、RANKL mRNA 発現は認められなかったが、OPG mRNA 発現は認められた。また、ELISA を用いて、蛋白レベルで OPG 産生量を分析した。OPG の蛋白レベルは、6MPa の MS と同様に  $\beta$ -cry により有意に増強された。 $\beta$ -cry が RANKL ではなく OPG 産生を増強することを実証した。これらの結果より、 $\beta$ -cry による歯周病における骨吸収予防が示唆された。



(2) real time PCR において予防群が LPS 刺激群に比べ、IL-1 $\beta$ ・IL-6・IL-8 mRNA 発現が

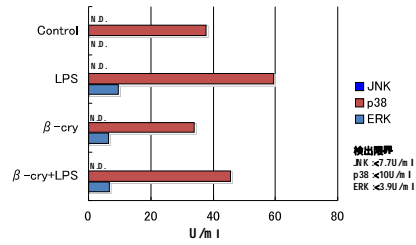
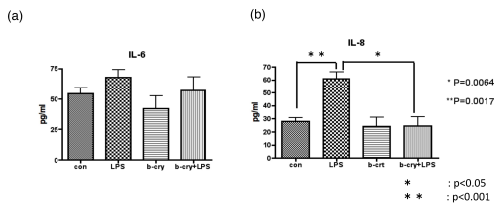
減少した。一方、治療群はLPS 刺激群に比べ、IL-1 $\beta$  mRNA で発現が減少した。また、コントロール群・LPS 刺激群・予防群・治療群において Gin-1 の形態学的変化はなかった。 $\beta$ -cry は歯周病において治療効果より予防効果を期待できる可能性が示唆された。



(3) HGF において  $\beta$ -cry は IL-8 の産生を有意に抑制し、IL-6 においても抑制傾向を示した。また  $\beta$ -cry は LPS 刺激による ERK の活性化を阻害した。

$\beta$ -cry は HGF において LPS 誘導性の IL-8 の産生を抑制したことから、抗炎症作用を有する事が示唆された。さらに作用機序として、LPS 刺激による細胞内シグナル伝達に与する ERK の活性化を阻害する事で、IL-8 の産生が抑制されたと考えられる。歯周病による炎症症状の改善に有用である可能性が示唆された。

<Cytometric Bead Array>



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)

Nishigaki M, Yamamoto T, Ichioka H, Honjyo K, Yamamoto K, Oseko F, Kita M, Mazda O, Kanamura N.  $\beta$ -cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligament cells. Archives of Oral Biology 査読有 58, 2013, 880-886

(学会発表)

大迫文重, 山本俊郎, 赤松佑紀, 西垣 勝, 雨宮 傑, 坂下敦宏, 中村 亨, 喜多正和, 金村成智. クリプトキサンチンが LPS 刺激に対する歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生. 第 137 回日本歯科保存学会 2012 年度秋季大会, 2012.

Oseko F, Yamamoto T, Amemiya T, Nishigaki M, Yamamoto K, Ichioka H, Honjyo K, Kita M, Kanamura N.

$\beta$ -cryptoxanthin influences cytokine production of human gingival fibroblasts. 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region IADR-APR 21-23 August 2013

Bangkok, Thailand.

大迫文重, 山本俊郎, 本城賢一, 市岡宏  
顕, 山本健太, 足立徹也, 赤松佑紀, 西  
垣勝, 雨宮傑, 金村成智. クリプトキ  
サンチンが歯肉線維芽細胞のサイトカ  
イン産生におよぼす影響. 第 67 回口腔  
科学会総会, 2013.