

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11392

研究課題名(和文) 歯周病におけるメラトニンの役割解明および治療への応用

研究課題名(英文) role of melatonin in periodontal disease

研究代表者

細川 育子 (HOSOKAWA, Ikuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教

研究者番号：50707908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で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)を用い、ケモカインおよびMMP産生に及ぼすメラトニンの影響を明らかにすることを目的とし実験を行った。その結果、メラトニンはIL-1 α が誘導したHPDLCのCXCL10およびMMP-1の産生を抑制することが明らかとなった。これらのことから、メラトニンは歯周炎病変局所でケモカインやMMP産生を抑制することにより、歯周炎の炎症を調整している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We examined the effect of melatonin on CXCL10 and MMP-1 productions from IL-1 α -stimulated human periodontal ligament cells (HPDLC) in this study. We found that melatonin could inhibit CXCL10 and MMP-1 productions from IL-1 α -stimulated HPDLC. Therefore, melatonin could the initiation and progression of periodontal disease by controlling chemokine and MMP production in periodontal lesions.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎 メラトニン MMP-1 CXCL10

1. 研究開始当初の背景

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、過剰な免疫反応が歯周組織破壊に関与している事が明らかとなっている。

近年、T 細胞のサブセットの一つである Th1 細胞が歯周炎の病態に関与している事が示唆されている。Th1 細胞は歯周炎症局所において可溶性 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)を産生する事により破骨細胞を活性化し炎症性骨吸収を促す事や、Th1 細胞が産生する炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 が歯周組織破壊をより引き起こす事が報告されている。また、Th1 細胞はケモカインレセプターの一つである CXC chemokine receptor (CXCR)3 を高発現しておりそのリガンドである CXC chemokine ligand (CXCL)9, CXCL10 および CXCL11 が発現している組織に浸潤・集積する事が明らかとなっている。我々はすでに歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯肉線維芽細胞を TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインで刺激をすると CXCL10 産生が誘導される事を報告しており、歯周組織構成細胞が Th1 細胞浸潤に積極的に関与している事を明らかとしている。しかしながら、歯周炎病変局所でどのように CXCR3 リガンド産生が調整されているかは不明な点が多かった。

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) はタンパク分解酵素であり炎症組織において細胞外マトリックス分解を引き起こす事により組織破壊を引き起こす事が明らかとなり、歯周炎においても軟組織破壊の関与が報告されている。MMP-1 は主にコラーゲンを分解する事が知られており、歯周炎組織においてもその発現が報告されている。しかしながら、歯周炎病変局所においてどのように MMP-1 産生が調節されているかは十分に明らかとされていない。

メラトニンは松果体から分泌されるホルモンであり主に睡眠を調節するホルモンとして知られている。近年、歯周組織においてメラトニンの発現が明らかとなっているが、歯周炎の病態におけるメラトニンの役割に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究ではメラトニンが歯周炎組織において炎症を調節していると仮定し、炎症性サイトカインおよび MMP 産生に及ぼす影響を明らかとするために、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 CXCL10 および MMP-1 産生に与えるメラトニンの影響を調べる事とした。さらにメラトニンがどのシグナル伝達経路の活性化に影響を与えるか明

らかとするためにサイトカイン産生や MMP 産生に關与するシグナル伝達経路である mitogen activated protein kinase (MAPK) および nuclear factor (NF)- B の活性化に与えるメラトニ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 $^{\circ}$ 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 10 継代のものを実験に用いた。

(2) HPDLC からの CXCL10 および MMP-1 産生の解析:

(1) の条件で培養した HPDLC を IL-1 β 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 CXCL10 および MMP-1 濃度を解析した。一部の試験においてメラトニンあるいはシグナル伝達阻害物質 [SB203580 (p38 MAPK inhibitor)、SP600125 (c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor)、SC514 (NF- κ B inhibitor)] において 1 時間前処理した後、IL-1 β 刺激を行い、培養上清中の CXCL10 および MMP-1 濃度を ELISA 法を用い解析した。

(3) IL-1 β およびメラトニン刺激により活性化されたシグナル伝達経路の解析:

(1) の条件で培養した HPDLC を IL-1 β 単独刺激、あるいは IL-1 β とメラトニン共刺激で 15 分、30 分あるいは 60 分刺激した後、タンパクを回収した。その後、western blot 法を用い、p38 MAPK, Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK), JNK, および I κ B- α のリン酸化あるいは I κ B- α の分解を解析した。

4. 研究成果

(1) メラトニンが IL-1 β 刺激 HPDLC の CXCL10 および MMP-1 産生に与える影響:

IL-1 β により誘導された HPDLC の CXCL10 および MMP-1 産生はメラトニンの添加により濃度依存的に抑制された。一方、MMP を抑制する Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 産生はメラトニン添加により増強された。

(2) メラトニンが IL-1 刺激により活性化されるシグナル伝達経路に与える影響:

IL-1 β 刺激により p38 MAPK, ERK, JNK および I κ B- α のリン酸化および I κ B- α の分解が誘導された。メラトニンの添加により p38 MAPK, JNK, I κ B- α のリン酸化および I κ B- α の分解が抑制された。

(3) IL-1 が誘導する CXCL10 および

MMP-1 産生に関するシグナル伝達経路の解析：

(2)の解析によりメラトニンが p38 MAPK, JNK および I κ B- α の活性化を抑制する事が明らかとなった。次に抑制したどのシグナル伝達経路が IL-1 β が誘導する CXCL10 および MMP-1 産生に関するシグナル伝達阻害物質を用いて検討した。その結果、CXCL10 産生は p38, JNK および NF- κ B 阻害物質により、MMP-1 産生は JNK および NF- κ B 阻害物質により抑制される事が明らかとなった。TIMP-1 産生はいずれの阻害物質でも抑制されなかった。

これらの結果より歯周炎組織に存在するメラトニンはケモカインや MMP 産生を抑制する事により歯周炎の炎症を調節している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志、テアフラビンが口腔上皮細胞のケモカイン産生に与える影響の解析、日本歯科保存学会雑誌、61 巻、10 - 16 頁(2018 年) 査読有

DOI:10.11471/shikahozon.61.10

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-27 modulates chemokine production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells, Cellular Physiology and Biochemistry, 43 巻、1198-1206 頁(2017 年) 査読有

DOI: 10.1159/000481760

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-29 enhances CXCL10 production in TNF- α -stimulated human oral epithelial cells, Immunological Investigations, 46 巻、615-624 頁(2017 年) 査読有

DOI:10.1080/08820139.2017.1336176.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Gomisin N decreases inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells, Inflammation, 40 巻、360-365 頁(2017 年) 査読有

DOI: 10.1007/s10753-016-0482-4.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Yoshihiro Ohta, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Alkannin

inhibits CCL3 and CCL5 production in human periodontal ligament cells, Cell Biology International, 40 巻、1380-1385 頁(2016 年) 査読有

DOI: 10.1002/cbin.10692.

Ikuko Hosokawa, Yoshitaka Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Melatonin inhibits CXCL10 and MMP-1 production in IL-1-stimulated human periodontal ligament cells, Inflammation, 39 巻、1520-1526 頁(2016 年) 査読有

DOI: 10.1007/s10753-016-0386-3.

Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Shikonin inhibits inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells, Inflammation, 39 巻、1124-1129 頁(2016 年) 査読有

DOI: 10.1007/s10753-016-0344-0.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, IL-4 modulates CCL11 and CCL20 productions from IL-1-stimulated human periodontal ligament cells, Cellular Physiology and Biochemistry, 38 巻、153-159 頁(2016 年) 査読有

DOI: 10.1159/000438617.

Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Satoru Shindo, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo, Calcitriol Suppressed Inflammatory Reactions in IL-1 β -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. Inflammation, 37 巻、2252-2258 頁(2015 年) 査読有

DOI: 10.1007/s10753-015-0209-y.

[学会発表](計 8 件)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：IL-29 は TNF- α が誘導するヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会(2017. 12. 16, 国立京都国際会館、京都府京都市)

細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志：IL-29 はヒト口腔上皮細胞の CXCL10 産生を増強する、第 147 回日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会(2017. 10. 26, 盛岡地域交流センター、岩手県盛岡市)

進藤智、池田敦史、細川義隆、細川育子、尾崎和美、松尾敬志、シトルリン化ビメンチンは破骨細胞分化を促進する、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(2016.10.27, キッセイ文化ホ

ール、長野県松本市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、
松尾敬志：Gomisin N はヒト歯根膜由来
細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制
する、第 145 回日本歯科保存学会 2016
年度秋季学術大会 (2016.10.27, キッセ
イ文化ホール、長野県松本市)

進藤智、池田敦史、細川義隆、細川育子、
尾崎和美、松尾敬志、：シトルリン化ビ
メンチンは破骨細胞活性化とマウス歯
周炎による骨吸収を促進する、第 59 回
日本歯周病学会秋季学術大会(2016.10.7,
朱鷺メッセ、新潟県新潟市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、
松尾敬志：Alkannin はヒト歯根膜由来
細胞の IL-6 および CCL20 産生を抑制す
る、第 59 回春季日本歯周病学会学術大
会(2016.5.20、かごしま県民交流センタ
ー、鹿児島県鹿児島市)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、
松尾敬志：Alkannin はヒト歯根膜由来
細胞の CCR5 リガンド産生を抑制する、
第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会
(2015.11.12, 文京シビックセンター、
東京都文京区)

細川義隆、細川育子、進藤智、尾崎和美、
松尾敬志：IL-4 がヒト歯根膜由来細胞の
CCL11 および CCL20 産生に及ぼす影響、
第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会
(2015.9.12, アクトシティ浜松、静岡県
浜松市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川 育子 (HOSOKAWA, Ikuko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：50707908

(2)研究分担者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：00217770

細川 義隆 (HOSOKAWA, Yoshitaka)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：90346601