

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09600

研究課題名(和文) 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-ローズマリーに着目して-

研究課題名(英文) Basic research for using spice-containing ingredients in the treatment of periodontitis-Focusing on rosemary-

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(歯学域)・助教

研究者番号：50707908

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)：本研究では、ヒト口腔上皮細胞(TR146細胞)やヒト歯根膜由来細胞(HPDLC)を用い、炎症性サイトカインおよびケモカインに及ぼすCarnosic acid(CA)の影響を明らかとすることを目的に実験を行った。その結果、CAはIL-27が誘導したTR146細胞のCXCL9, CXCL10およびCXCL11の産生を抑制すること、また、IL-1 が誘導したHPDLCのIL-6, CXCL10およびCCL20の産生を抑制することが明らかとなった。これらのことより、CAは歯周炎病変局所にてケモカインや炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、歯周炎の炎症を調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎において過度の炎症性細胞浸潤が歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊に関与していることが明らかとなっている。今回の結果より、ローズマリー含有成分であるCarnosic acidに抗炎症作用、特に白血球浸潤や集積に関与するケモカインを抑制する可能性が明らかとなった。本研究で得られた成果は、Carnosic acidの持つ働き の 解明 と 炎症 を 制御 する という 歯周炎 の 新規 治療薬 の 開発 に 繋がる もの と 期待 できると 考えられる。

研究成果の概要(英文)： We examined the effect of carnosic acid (CA) on CXCL9, CXCL10 and CXCL11 productions in IL-27-stimulated human oral epithelial cells (TR146 cells). Moreover, we investigated the effect of IL-6, CXCL10 and CCL20 productions in IL-1 -stimulated human periodontal ligament cells (HPDLC) in this study. We found that CA could inhibit CXCL9, CXCL10 and CXCL11 productions in IL-27-stimulated TR146 cells and IL-6, CXCL10 and CCL20 productions in IL-1 -stimulated HPDLC. Therefore, CA could inhibit the initiation and progression of periodontal disease by modulating inflammatory cytokines and chemokines productions.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎 Carnosic acid サイトカイン ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎はデンタルプラークを構成する歯周病原性細菌によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、宿主の免疫応答が関与していることが明らかとなっている。特に、歯周炎病変局所で産生される過剰な炎症性サイトカインが歯周組織破壊の中心的な役割を果たしていることが明らかとされている。

炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 は破骨細胞を活性化し骨吸収を惹起することが報告されている。また、免疫担当細胞の中でもヘルパーT細胞である Th1 細胞や Th17 細胞も歯周炎の歯槽骨吸収に関与していることが示唆されている。さらに、我々はこれまでに Th1 細胞の遊走に関与している CXC chemokine ligand (CXCL)9, CXCL10, CXCL11 あるいは Th17 細胞の集積に関与している CC chemokine ligand (CCL)20 といったケモカインが、歯周組織構成細胞によって産生されることを報告している。IL-27 は IL-12 family に属するサイトカインであり、我々は IL-27 がヒト口腔上皮細胞からの CXCL9, CXCL10, および CXCL11 産生を誘導することを報告している。

Carnosic acid は香辛料の一つであるローズマリーに含まれている生理活性物質で、抗癌作用や抗酸化作用があることが知られている。しかしながら、歯周炎の病態における Carnosic acid の役割に関しては不明な点が多く、歯周組織構成細胞に対する影響に関する報告は今のところない。

2. 研究の目的

本研究では、Carnosic acid が歯周病病変局所において炎症反応を制御できると仮定し、歯周組織構成細胞であるヒト口腔上皮細胞およびヒト歯根膜由来細胞における炎症性サイトカインおよびケモカイン産生に及ぼす影響を明らかにするために、Carnosic acid がヒト口腔上皮細胞の IL-27 が誘導する Th1 細胞浸潤に関与するケモカインである CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生に与える影響および Carnosic acid がヒト歯根膜由来細胞の IL-1 β が誘導する炎症性サイトカインやケモカインである IL-6, CXCL10 および Th17 細胞浸潤に関与する CCL20 産生に与える影響をシグナル伝達機構も含めて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織構成細胞の培養

ヒト口腔上皮細胞の培養

ヒト口腔上皮細胞株として TR146 細胞を用いた。TR146 細胞は Mark Herzberg 博士 (ミネソタ大学) より供与して頂いたものを使用し、10%FBS を含む Ham's F12 培地において 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 存在下のインキュベーター内で培養し実験に用いた。

ヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) の培養

HPDLC は Lonza 社より購入し、10%FBS を含む DMEM 培地において 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 存在下のインキュベーター内で培養し実験に用いた。

(2) 歯周組織構成細胞の炎症性サイトカインおよびケモカイン産生の解析

TR146 細胞の CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生の解析

(1) 条件で培養した TR146 細胞を IL-27 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 CXCL9, CXCL10 および CXCL11 の濃度を解析した。一部の試験では、Carnosic acid あるいはシグナル伝達阻害物質 [fludarabine (STAT1 inhibitor), WP1066 (STAT3 inhibitor), 10DEBC hydrochloride (Akt inhibitor)] において 1 時間前処理した後、IL-27 刺激を行い、培養上清中の CXCL9, CXCL10 および CXCL11 の濃度を ELISA 法にて解析を行った。

HPDLC の IL-6, CXCL10 および CCL20 産生の解析

(1) 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 IL-6, CXCL10 および CCL20 の濃度を解析した。一部の試験では、Carnosic acid あるいはシグナル伝達阻害物質 [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 IL-6, CXCL10 および CCL20 の濃度を ELISA 法にて解析を行った。

(3) IL-27, IL-1 β 刺激により活性化されたシグナル伝達経路への Carnosic acid の影響の解析

(1) 条件で培養した TR146 細胞を IL-27 単独刺激、あるいは IL-27 と Carnosic acid 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、STAT1, STAT3 および Akt のリン酸化を解析した。

(1) 条件で培養した HPDLC を IL-1 β 単独刺激、あるいは IL-1 β と Carnosic acid 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、NF- κ B のシグナル伝達経路である IKK- α/β , NF- κ B p65 および I κ B- α のリン酸化を解析した。

4. 研究成果

(1) Carnosic acid が IL-27 刺激 TR146 細胞の CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生に与える影響:

IL-27 により誘導された TR146 細胞の CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生は Carnosic acid の添加により濃度依存的に抑制された。

(2) Carnosic acid が TR146 細胞における IL-27 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-27 刺激により STAT1, STAT3 および Akt のリン酸化が誘導された。Carnosic acid の添加により STAT1, STAT3 および Akt のリン酸化が抑制された。

(3) IL-27 が誘導する TR146 細胞の CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生に関するシグナル伝達経路の解析：

(2) の解析より Carnosic acid が STAT1, STAT3 および Akt の活性化を抑制することが明らかとなった。次に抑制したどのシグナル伝達経路が IL-27 により誘導される TR146 細胞からの CXCL9, CXCL10 および CXCL11 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、CXCL9, CXCL10 および CXCL11 産生は、STAT1, STAT3 および Akt の阻害物質により抑制されることが明らかとなった。

(4) Carnosic acid が IL-1 β 刺激 HPDLC の IL-6, CXCL10 および CCL20 産生に与える影響：

IL-1 β により誘導された HPDLC の IL-6, CXCL10 および CCL20 産生は Carnosic acid の添加により濃度依存的に抑制された。

(5) Carnosic acid が HPDLC における IL-1 β 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 IKK- α/β , NF- κ B p65 および I κ B- α のリン酸化が誘導された。Carnosic acid の添加により IKK- α/β , NF- κ B p65 および I κ B- α のリン酸化が抑制された。

(6) IL-1 β が誘導する HPDLC の IL-6, CXCL10 および CCL20 産生に関するシグナル伝達経路の解析：

(5) の解析より Carnosic acid が IKK- α/β , NF- κ B p65 および I κ B- α の活性化を抑制することが明らかとなった。次に抑制した NF- κ B のシグナル伝達経路が IL-1 β により誘導される HPDLC の IL-6, CXCL10 および CCL20 産生に関するかどうかシグナル伝達阻害物質を用いて検討した。その結果、IL-6, CXCL10 および CCL20 産生は、NF- κ B の阻害物質により抑制されることが明らかとなった。

これらの結果は、Carnosic acid を歯周炎病変局所に投与することにより、歯周組織構成細胞における炎症性サイトカインの産生および、Th1 あるいは Th17 細胞浸潤や集積を減少させることにより、歯周炎病変局所での過剰な炎症反応を抑制できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 0件）

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- α -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 Hosokawa, 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 Satoru Shindo, Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Hideki Shiba	4. 巻 42
2. 論文標題 Interleukin (IL)-35 Suppresses IL-6 and IL-8 Production in IL-17A-Stimulated Human Periodontal Ligament Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 835-840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-018-0938-9.	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 Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Honokiol and Magnolol Inhibit CXCL10 and CXCL11 Production in IL-27-Stimulated Human Oral Epithelial Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 2110-2115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10753-018-0854-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 Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Transforming growth factor- 1 increases C-C chemokine ligand 11 production in interleukin 4-stimulated human periodontal ligament cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1395-1400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11030.	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 Yoshitaka Hosokawa, Ikuko Hosokawa, Kazumi Ozaki, Takashi Matsuo	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 Hosokawa, Takashi Matsuo	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細川育子、細川義隆、尾崎和美、松尾敬志
2. 発表標題 Carnosic acidはヒト口腔上皮細胞のIL-27誘導CXCR3リガンド産生を抑制する
3. 学会等名 第149回秋季日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2018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 IL-27はヒト口腔上皮細胞のCXCR3リガンドを産生する
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018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 第152回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2020年

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を抑制する
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2020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	細川 義隆 (HOSOKAWA Yoshi taka) (90346601)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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)	

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