

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10281

研究課題名(和文) カテキン類の生体内代謝産物による歯周炎抑制機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of catechins and metabolites of catechin polyphenols in prevention of periodontal diseases

研究代表者

渡辺 清子 (Watanabe, Kiyoko)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70148021

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)：カテキン類含有ポリフェノールによる歯周炎予防機序について解明する目的で、*P. g* 感染により惹起される実験的歯周炎の抑制作用について検討した。鶏血藤および松樹皮抽出物の経口投与により、歯槽骨吸収量の軽減が認められた。鶏血藤、松樹皮抽出物、および(-)エピガロカテキンの破骨細胞分化抑制効果について検討した結果、いずれにおいても濃度依存的に有意な破骨細胞分化抑制効果が認められた。松樹皮抽出物には、破骨細胞の活性化マーカーであるTRAPおよびMMP9遺伝子の発現を濃度依存的に抑制するとともに、破骨細胞分化のマスター転写因子であるNFATc1の遺伝子発現も濃度依存的に抑制することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民病ともいわれる歯周病は細菌感染に起因する炎症性疾患であり、安全かつ簡便で有効な予防措置の開発が必要とされる。茶カテキンをはじめとする植物ポリフェノール類は、高い抗酸化作用および抗炎症活性を有しており、歯周炎の予防および治療に有効である可能性が高い。松樹皮抽出物は*P. gingivalis*の口腔内定着にかかわる因子を阻害するとともに、本菌により惹起される実験的歯周炎の歯槽骨吸収を抑制し、破骨細胞の活性および分化を誘導する遺伝子発現を抑制することが本研究で明らかとなった。これらの結果から、日常的に摂取する安全性の高い食品類を用いて歯周炎予防が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism of preventive action of catechin-containing polyphenols for periodontal diseases, inhibitory effects of the polyphenols on experimental periodontitis induced by *P. gingivalis* was investigated. Oral administration of Jixueteng and French pine bark extract reduced alveolar bone resorption. Jixueteng, French pine bark extract and (-)-epigallocatechin significantly inhibited osteoclast differentiation in a dose-dependent manner.

To elucidate the mechanism of inhibitory effects of catechin-containing polyphenols on osteoclast differentiation, the expression of osteoclast differentiation-inducing genes was investigated. The expression of TRAP and MMP9 genes, which are activating markers of osteoclasts was downregulated in a dose-dependent manner by adding by French pine bark extract. Furthermore, gene expression of NFATc1, a master transcription factor for osteoclast differentiation, was also suppressed by French pine bark extract.

研究分野：微生物学

キーワード：カテキン類 ポリフェノール 歯周炎発症抑制 破骨細胞分化抑制 病原因子発現抑制

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、歯周組織の破壊と歯槽骨吸収を特徴とする慢性炎症性疾患であり、歯周炎症局所からの細菌の移動やそれに伴う全身的な炎症の拡大が、慢性炎症性疾患である心疾患や糖尿病の発症のリスクファクターとなることが示唆されている。したがって、日常的な口腔ケアに加えて、安全でかつ簡便な歯周炎予防措置を行うことは非常に重要である。

カテキンを代表とするポリフェノール(多価フェノール)とは、分子内のベンゼン環上に水酸基を2個以上持つフェノール化合物の総称であり、多くの植物由来食品や天然ハーブに含まれている。近年、各種のガンや動脈硬化の引き金となる生活習慣病発症と酸化ストレスとの関係が明らかになるにつれ、ポリフェノールの抗酸化作用がこれらの病気の予防に關与し、健康増進に有効であるとして脚光を浴びている。抗酸化作用以外に、ポリフェノールには抗炎症作用、ホルモン様作用、抗菌作用などが報告されているため、歯周病予防や治療薬として有用ではないかと注目されている。しかしながら、歯周病も細菌感染に起因する慢性炎症性疾患であるため、松樹皮抽出物の歯周炎予防効果が単なる抗菌作用によるものか、歯周局所での抗炎症作用および抗酸化作用によるものなのか、その他の因子が關与していたかについて、その抑制機序については不明な点が多い。

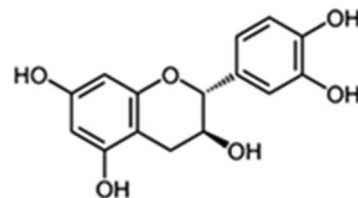


図1 カテキンの構造

2. 研究の目的

本研究ではカテキン類を含む植物由来ポリフェノールの歯周炎予防作用機序について解明する目的で、カテキンおよびカテキン類含有ポリフェノールの破骨細胞分化抑制作用の検討、破骨細胞分化および活性化の抑制機序の解明、ならびに歯周病原細菌である *P. gingivalis* の口腔内定着予防効果・口腔バイオフィーム形成抑制について評価を行った。

3. 研究の方法

(1) カテキン類およびカテキン含有物

本研究では、カテキン類として(-)-エピガロカテキン(EGC)、カテキン含有物として鶏血藤(JIX)および松樹皮抽出物(PYC)を用いた。

(2) 破骨細胞分化抑制作用

マウス破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を RANKL 刺激下で培養し破骨細胞への分化を誘導した。培養系に EGC、JIX および PYC を添加することにより破骨細胞の分化抑制作用について検討した。

(3) 破骨細胞分化抑制機序の検討

マウス破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を RANKL 刺激下で培養し、破骨細胞活性化マーカーである TRAP および MMP9 の遺伝子発現を qRT-PCR 法にて測定した。また、培養系に PYC を添加し、同遺伝子の発現量について GAPDH を基準として測定した。

RAW264.7 細胞を RANKL 存在下で培養し、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の遺伝子発現についても同様に測定した。

(4) *P. gingivalis* の付着・定着因子に対する作用の検討

P. gingivalis の biofilm 形成抑制作用

被験菌は *P. gingivalis*、および *S. mutans* とした。バイオフィーム形成に対する松樹皮抽出物(PYC)の抑制効果の検討は、24穴プレート中で 1×10^7 CFU に調整した各菌液を種々の濃度の PYC 溶液を含む培地中で 24 時間、嫌氣的に培養し、培養終了後、プレートを PBS を用いて洗浄後、バイオフィーム形成細菌の生細菌数を求めることにより評価した。また、カバースリップ上で形成させた各菌のバイオフィームを Molecular Probes 社製の LIVE/DEAD 染色キットを用いて染色し、生菌および死菌の分布について蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、PYC によるバイオフィーム形成抑制作用について検討した。

P. gingivalis のヒト歯肉上皮細胞に対する付着抑制作用

ヒト歯肉上皮細胞は、24穴プレート中でコンフルエントになるまで培養し、 1×10^7 CFU に調整した *P. gingivalis* を接種し細胞付着率を測定した。細胞培養液中に種々の濃度の PYC を添加し、細胞付着性の抑制作用を評価した。

P. gingivalis の他菌種との共凝集活性に対する作用の検討

共凝集のパートナー菌として、*S. mutans*、*S. gordonii*、*S. sanguinus*、*S. mitis* および *A. viscosus* を用い、種々の濃度の PYC で前処理した *P. gingivalis* と 24穴プレート中で混合し、共凝集価は肉眼的に評価した。

付着・定着因子にかかわる遺伝子発現抑制性

種々の濃度の PYC 含有培地で培養した *P. gingivalis* の付着・定着に関する線毛遺伝子 (*fimA*) および赤血球凝集因子 (*hagA* and *hagB*)、歯周組織破壊に関与する 3 種類のトリプシン様酵素遺伝子 (*rgpA*, *rgpB* and *kgp*) の発現に関して、定量的 RT-PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化抑制作用

破骨細胞の分化誘導は、破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を RANKL 刺激下で培養することにより検討した。RAW264.7 細胞は、RANKL 刺激により 252.3 ± 5.6 の破骨細胞を形成し、RANKL 無添加のコントロール (N) では、著しい破骨細胞数の減少が認められた。一方、RANKL 存在下で 100 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ ならびに 1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の EGC、JIX および PYC を添加することにより、非添加の RANKL 群と比較して顕著な TRAP 陽性破骨細胞数の減少が認められた。

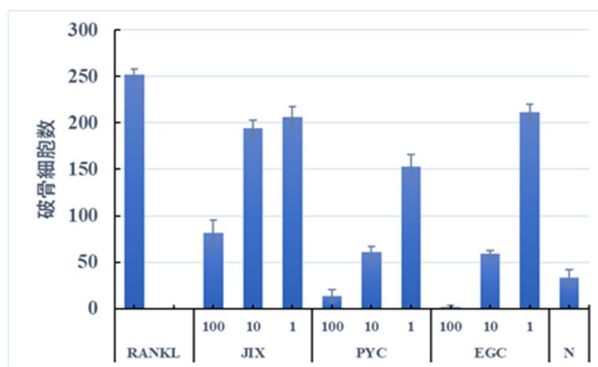


図2 カテキン含有物による破骨細胞分化抑制作用

(2) 破骨細胞分化抑制機序の検討

RANKL 刺激による RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する PYC の抑制機序を解明するために、PYC 添加による破骨細胞分化誘導遺伝子の発現抑制作用について検討した結果、破骨細胞の活性化マーカーである TRAP および MMP9 遺伝子の発現が濃度依存的に抑制された。さらに、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の遺伝子発現も濃度依存的に抑制された。

(3) *P. gingivalis* の付着・定着因子に対する作用の検討

最小発育阻止 (MIC) 濃度の測定

PYC の *P. gingivalis* に対する最小発育阻止濃度を測定するために、BHI broth に Yeast extract、hemin、vitamin K₁ を添加した培地に種々の濃度の PYC を添加し 48 時間培養した結果、MIC は 1250 $\mu\text{g/ml}$ であった。

バイオフィーム形成阻害

P. gingivalis および *S. mutans* 培養液中に PYC を 0 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、あるいは 1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度になるように培養液中に添加すると、濃度依存的に生菌数は減少した。

また、カバースライド上に形成されたバイオフィームの蛍光顕微鏡観察では、*P. gingivalis* は、明らかにカバースリップへの付着が認められ、PYC 添加による殺菌作用が認められた。一方、*S. mutans* は強固にカバースリップに付着していたが、PYC 処理によるガラス面への付着・蓄積の抑制が明らかに認められた。

ヒト歯肉上皮細胞への付着阻害

ヒト歯肉上皮細胞に 100 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ ならびに 1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の PYC を添加し、*P. gingivalis* の細胞付着性について検討した結果、PYC 無添加と比較して、濃度依存的に細胞付着阻害活性が認められた。

共凝集抑制作用

P. gingivalis は供試した菌株との明らかな共凝集活性を有していたが、100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の PYC で 10 分間処理することにより、供試菌株との共凝集活性は失活した。

病原遺伝子発現に対する作用

P. gingivalis の付着因子と考えられている線毛遺伝子 (*fimA*) の発現は、100 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の PYC で培養することにより有意に減少していた。

先行実験の結果から、鶏血藤および松樹皮抽出物が実験的歯周炎における歯槽骨吸収を阻害することが報告されている。本研究では、カテキン類およびカテキン含有物に破骨細胞分化抑制性が認められること、破骨細胞の分化誘導遺伝子および活性化遺伝子の発現を阻害すること、さらに、歯周病原細菌の口腔内への付着・定着を抑制することが示された。PYC の *P. gingivalis* に対する MIC は 1250 $\mu\text{g/ml}$ であることから、これらの歯周炎抑制作用は殺菌作用によるものではない事が示され、日常的に摂取する安全性の高い食品類を用いて歯周炎予防が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Komatsu T, Watanabe K, Hamada N, Helmerhorst E, Oppenheim F, Lee MC.	4. 巻 26
2. 論文標題 Association between Antimicrobial Peptide Histatin 5 Levels and Prevalence of Candida in Saliva of Patients with Down Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 494-504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10050494.	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 該当する
1. 著者名 Koba T, Watanabe K, Goda S, Kitagawa M, Mutoh N, Hamada N, Tani-Ishii N	4. 巻 47
2. 論文標題 The Effect of Transforming Growth Factor Beta 1 on the Mineralization of Human Cementoblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Endodontics	6. 最初と最後の頁 606-611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joen.2020.12.019	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 該当する
1. 著者名 倉橋絢子, 渡辺清子, 佐藤武則, 稲葉啓太郎, 藤岡隼, 半田慶介, 浜田信城	4. 巻 56
2. 論文標題 脂肪酸塩の口腔内細菌に対する殺菌効果とStreptococcus mutansバイオフィルムに対する影響.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神奈川歯学	6. 最初と最後の頁 26-36
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 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 Ozaki Y, Morozumi T, Watanabe K, Toyama T, Sasaki H, Sato T, Yamamoto Y, To M, Inaba K, Tsukinoki K, Hamada N, Minabe M	4. 巻 62
2. 論文標題 Inhibitory effect of omega-3 fatty acids on alveolar bone resorption and osteoclast differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 298-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0267.	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 該当する

1. 著者名 Hiramine H, Watanabe K, Inaba K, Sasaki H, Hamada N	4. 巻 26
2. 論文標題 Evaluation of Antimicrobial Effects on Dental Impression Materials and Biofilm Removal by Sodium Dichloroisocyanurate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biocontrol Science	6. 最初と最後の頁 17-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4265/bio.26.17.	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 該当する

1. 著者名 小松知子, 渡辺清子, 浜田信城, 片山幸太郎, 森本佳成, 李昌一	4. 巻 39
2. 論文標題 電子スピン共鳴法によるベンゼトニウム塩化物製剤(洗口剤ネオステリングリーンうがい液0.2%)と炭酸水素ナトリウムの抗酸化作用に関連した抗菌作用の基礎的検討.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 歯科薬物療法	6. 最初と最後の頁 113-119
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 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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小松知子, 渡辺清子, 浜田信城, 横山滉介, 安部貴大, 李昌一
2. 発表標題 オーラルフローラを守る口腔ケア を目指した洗口剤の抗菌・抗酸化作用における基礎エビデンスの検証
3. 学会等名 第 18 回日本口腔ケア学会 総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原賀裕, 佐藤武則, 渡辺清子, 半田慶介, 石井信之
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum 感染モデルラットの全身への移行・感染経路の網羅的解析.
3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉橋 絢子, 渡辺清子, 佐藤武則, 稲葉啓太郎, 半田慶介, 浜田信城
2. 発表標題 脂肪酸塩の Streptococcus mutans バイオフィルムに対する影響
3. 学会等名 第 63 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王挺萱, 渡辺清子, 武藤徳子, 浜田信城, 石井信之
2. 発表標題 BONDMER Lightless のヒトセメント芽細胞に 対する細胞障害性について.
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富山 潔, 石澤将人, 渡辺清子, 河田亮, 浜田信城, 向井義晴
2. 発表標題 S-PRG 溶出液の初期形成過程の多菌 種バイオフィルムに対する抗菌効果.
3. 学会等名 第 56 回神奈川歯科大学学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurahashi A, Watanabe K, Sato T, Inaba K, Sasaki H, Hamada N
2. 発表標題 The effects of fatty acid salts against Streptococcus mutans biofilm.
3. 学会等名 Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富山潔, 石澤将人, 渡辺清子, 河田亮, 高橋理, 浜田信城, Exterkate R.A.M, 向井義晴
2. 発表標題 S-PRG溶出液の濃度が多菌種バイオフィルムへの抗菌性に与える影響.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎悠, 両角俊哉, 渡辺清子, 遠山歳三, 佐々木悠, 佐藤武則, 山本裕子, 東雅啓, 稲葉啓太郎, 槻木恵一, 浜田信城, 三邊正人
2. 発表標題 オメガ3脂肪酸の歯槽骨吸収および破骨細胞分化誘導に対する抑制効果の研究.
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾根崇晴, 小牧基浩, 山海直, 平嶺浩子, 渡辺清子, 浜田信城, 児玉利朗
2. 発表標題 カニクイザルにおける歯周病実態調査.
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第55回総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉橋絢子, 渡辺清子, 佐藤武則, 稲葉啓太郎, 佐々木悠, 浜田信城
2. 発表標題 脂肪酸塩の抗菌効果とS. mutansバイオフィルム形成抑制効果に関する研究.
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会第55回総会
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	平嶺 浩子 (Hiramine Hiroko) (30386841)	神奈川歯科大学・歯学部・講師 (32703)	
研究 分担者	佐藤 武則 (Sato Takenori) (40638904)	神奈川歯科大学・歯学部・講師 (32703)	
研究 分担者	高橋 俊介 (Takahashi Shunsuke) (60206810)	神奈川歯科大学・歯学部・教授 (32703)	

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