

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16982

研究課題名（和文）組織再生能と抗炎症作用を併せもつ天然由来物質を用いた新規歯周治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of a new periodontal treatment medicine using a naturally extracted substance with both tissue regenerative and anti-inflammatory effects.

研究代表者

今井 一貴（IMAI, Kazutaka）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30878624

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）：紫根の有効成分であるShikoninは、古来より抗炎症効果や抗菌作用を有し創傷治癒を促進すると報告され、とくに皮膚や粘膜に有効とされている。Shikoninの歯周組織に対する創傷治癒を評価するために、ヒト歯肉上皮細胞（epi4）に対する細胞増殖、細胞遊走および抗炎症作用について評価を行った。創傷治癒に重要なシグナル経路のERKのリン酸化についてもWesternBlotting法を用いて評価した。Shikoninはepi4の増殖と遊走を有意に促進し、ERKのリン酸化を確認した。IL-1による炎症惹起下においては抗炎症作用を認めた。ヒト歯肉上皮組織の創傷治癒に有用であると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の治療には歯周組織再生治療がある。歯周組織再生治療の成功の可否は術後の治療過程、とくに歯肉上皮の一次治癒が大きく影響するとされている。これまで組織再生と抗炎症作用を併せ持つ歯周組織治療薬は無い。本研究によりShikoninはヒト歯肉上皮細胞において創傷治癒促進作用および抗炎症作用を有することが示された。また、古くより使用されている天然由来成分から抽出されているという点において安全性も担保されている。この結果により歯周組織再生治療の際にShikoninを用いることにより一次治癒を早める、かつ抗炎症作用により歯周組織再生治療を成功に導く確率が増えることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Shikonin, the active ingredient of purple root, has long been reported to have anti-inflammatory and antibacterial effects and to promote wound healing, especially on skin and mucosa. To study the effect of shikonin on wound healing of periodontal tissues, we studied the proliferative, migratory, and anti-inflammatory effects of shikonin on human gingival epithelial cells (epi4). Shikonin promotes epi4 proliferation and migration in vitro, and its phosphorylation of ERK was also evaluated by WesternBlotting assay. Shikonin may be useful for wound healing of human gingival epithelial tissues.

研究分野：歯周治療

キーワード：Wound Healing Shikonin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究開始当初の背景

天然由来物質に含まれる機能性成分 (Phytochemical) には抗炎症作用を有するものが多く存在する。その一つである紫根は日本において江戸時代に『紫雲膏』と呼ばれる火傷に対する軟膏として利用されてきた。紫根の有効成分である Shikonin は新生肉芽組織を誘導し、創傷治癒を促進する働きがあり、さらに抗菌作用と抗炎症作用を有すると数多く報告されている。これらの特徴は歯周治療に用いる薬剤として理想的な具備すべき条件を有している。また、抗炎症作用を有することより歯周外科手術後の疼痛や腫脹を最小限にし再感染などのリスクを可能な限り抑えることができ、歯周治療に最適な成果をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

軟組織の早期における創傷治癒は歯周組織再生治療においては再生するためのスペースを確保するためには必要不可欠なプロセスである。現在、歯周外科処置後の創傷治癒を促進する目的で使用されている薬剤はほとんどない。したがって、歯周組織治癒促進剤を開発することにより歯周外科手術後の治癒が促進され治癒不全のリスクを回避することが可能になると予想している。

3. 研究の方法

細胞と Shikonin の調整

不死化歯肉上皮細胞 Epi4 (大阪大学 村上伸也教授より御供与) を使用。HuMedia-KB2 (表皮角化細胞基礎培地) と増殖添加剤セットを用いて 37 °C, 5 % CO₂ インキュベーターで培養した。Shikonin (Nacalai Tesque 社製) を DMSO (ジメチルスルホキシド Nacalai Tesque 社製) にて溶解したものを 5 種類の濃度 (0.001, 0.01, 0.1, 1 および 10 μM) に調整した。

細胞増殖試験

Epi4 を 2×10⁴ cells/mL で播種し 24 時間後各種濃度の Shikonin を用いて刺激し、3, 48 および 72 時間後に Celltiter-Blue Cell Viability Assay (Promega 社製) にて蛍光強度を 560/590 nm で測定した。

細胞毒性試験

Epi4 を 2×10⁴ cells/mL で播種し 24 時間後各種濃度の Shikonin を用いて刺激し、48 および 72 時間後の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性は、細胞毒性 LDH アッセイキット-WST (Dojindo 社製) を使用し、吸光度は 490 nm で測定した。

スクラッチ試験

Epi4 を 5×10⁵ cell / 70 μL で創傷治癒アッセイインサート (ibidi 社製) に播種し、インサートを除去した後 0 および 24 時間培養した。Image J[®] Ver (Fiji for Mac OS X) を用いて創傷閉鎖面積を算出した。

抗炎症作用

Epi4 を 5×10⁴ cells/mL で播種し 48 時間培養後、各種条件 (Control, 0.01 μM Shikonin, 1 ng/mL IL-1β, 1 ng/mL IL-1β + Shikonin および 1 ng/mL IL-1β + Pretreatment 0.01 μM Shikonin) を用いて刺激し 24, 48 および 72 時間後に ELISA および Realtime-PCR にて検討した。

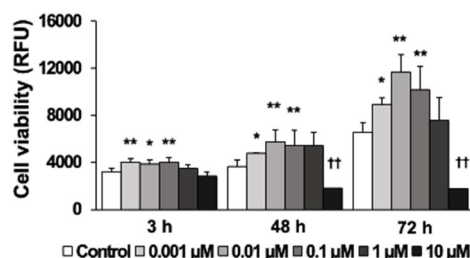
炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 のタンパク質発現は ELISA 法にて、遺伝子発現は Realtime-PCR にて測定した。

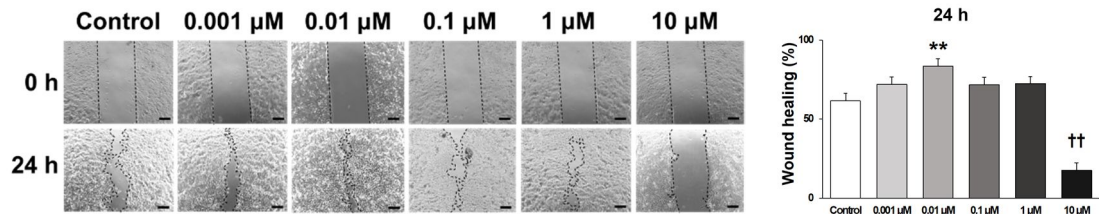
ウェスタンブロットニング

最適濃度の Shikonin を用いウェスタンブロットを行い刺激開始 0, 15 および 30 分の ERK1/2 のリン酸化について検討した

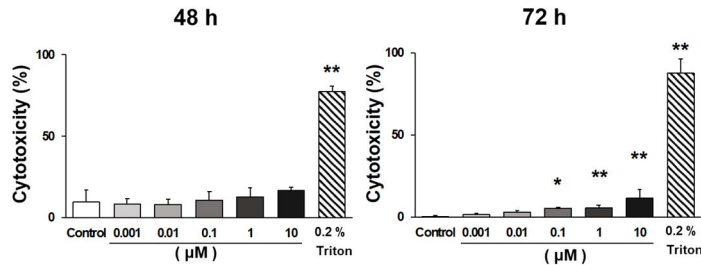
4. 研究成果

Epi4 において 0.01 μM の Shikonin は細胞増殖能を有することが示された。スクラッチ試験においても 24 時間で 0.01 μM の Shikonin で優位に細胞遊走が確認された。

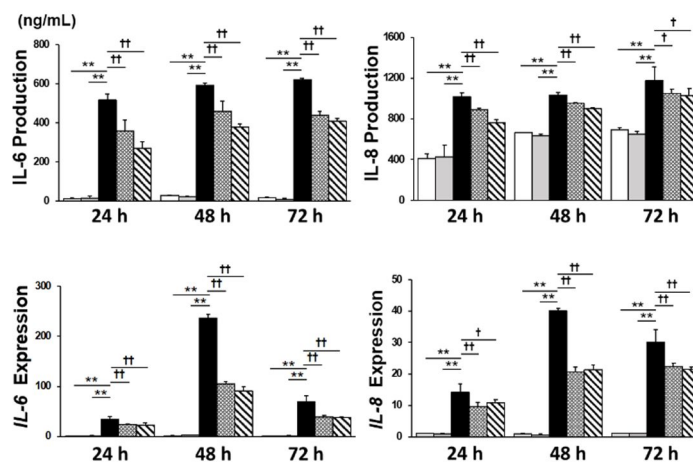




72 時間で Shikonin 0.1μM 以上で Epi4 に対し細胞毒性が認められた。この結果より、Shikonin 0.01μM は細胞毒性がなく最適な濃度であると考えられる。

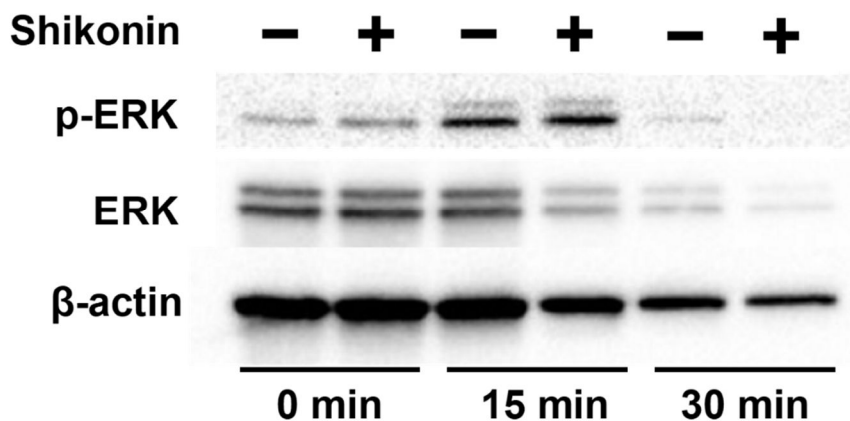


Epi4 を IL-1 による炎症惹起下において Shikonin 0.01μM は IL-6 および IL-8 の産生



を優位に抑制することが認められた。

Shikonin 0.01μM における Epi4 の ERK 経路のリン酸化が認められた。



まとめ

0.01μM の Shikonin は Epi4 において細胞増殖、遊走および ERK1/2 経路の活性化を示し、さらに IL-1 によって惹起された炎症を抑制し抗炎症作用を有することが示された。Shikonin は歯肉の創傷治癒を促進し抗炎症作用も有することから、歯周外科後の治癒に有用であると示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李 潤伯, 嘉藤 弘仁, 田口 洋一郎, 尾松 系樹, 皆川 咲佳, 万代 千晶, 彭 一豪, 今井 一貴, 山内 伸浩, 梅田 誠
2. 発表標題 細胞内グルコース飢餓によるヒト歯肉線維芽細胞の創傷治癒とストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 百合香, 田口 洋一郎, 今井 一貴, 山脇 勲, 彭 一豪, 尾松 系樹, 梅田 誠
2. 発表標題 Shikoninがヒト歯肉上皮細胞の創傷治癒に及ぼす影響
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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