

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463169

研究課題名(和文) 口腔粘膜炎に対する予防・治療を目指した β -クリプトキサントンの検討研究課題名(英文) Effect of β -cryptoxanthin which aimed at the prevention and treatment for oral mucositis

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞に5FU刺激することにより炎症性サイトカインの発現が増大した。さらに β -cryの添加により5FU刺激による炎症性サイトカイン発現レベルの増大が抑制された。これより β -cryは口腔粘膜上皮細胞に対して抗炎症効果を有しており、粘膜炎に対する治療薬となる可能性が示唆された。5FUで生じる口腔粘膜上皮の炎症に対して、 β -cryは抗炎症作用を有する可能性が判明した。これにより、天然食物に多く含まれる、安全性の高い β -cryはがん化学療法で生じる口腔粘膜炎の新たな治療法となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The expressions of inflammatory cytokines in the cells of oral mucosa stimulated by 5FU were increased. In addition of β -cry, the increase of inflammatory cytokines by the stimulation of 5FU was suppressed. The results shows that β -cry may have anti-inflammatory effects on the oral mucosa, may be usable as therapeutic agent for inflammatory diseases in the oral mucosa. the working mechanism of the increase of inflammatory cytokines was an activation of ERK that participates in signal transduction in the cells stimulated by 5FU. In addition of β -cry, the activation of ERK was suppressed and we think that results in the suppression of inflammatory cytokines. β -cry may have anti-inflammatory effects on the oral mucosa. Thus, β -cry may have anti-inflammatory effects on the oral mucosa. Thus, β -cry derived from natural food may serve as a safe therapeutic agent for inflammatory diseases in the oral mucosa.

研究分野：歯科口腔科学

キーワード：粘膜炎 カルテノイド

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因第1位であるがんをはじめとした疾病に対する周術期の口腔機能管理は、重要であることが知られている。この際、しばしば遭遇し治療に難渋するのが口腔粘膜炎である。薬剤性の口腔粘膜炎は、口腔粘膜に対し化学療法で用いられる抗悪性腫瘍剤によって生じる白血球数の減少が局所感染を引き起こすこと(炎症作用)や活性酸素が酸化ストレスを与えること(酸化作用)で発症する。海外では、薬剤性の口腔粘膜炎の治療に際し、病期間の短縮や重症度を低下させる薬剤や活性酸素による細胞破壊の予防薬が存在する。このような薬剤は、日本では未承認であり、酸化ストレスを除去する含嗽剤や苦みの強い薬剤が存在する。これらは、口腔粘膜炎が発症してからの効果が無く、現状では局所の汚染除去や保湿剤による対処療法が中心となっている。これらは、口腔粘膜炎が発症してからの効果が無く、現状では局所の汚染除去や保湿剤による対処療法が中心となっている。

β -クリプトキサントニン (β -cryptoxanthin 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、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。

これまでに口腔内細菌やメカニカルストレスに対して β -cry が抗炎症効果を有し、口腔内細菌が引き起こす歯肉線維芽細胞の炎症反応は、 β -cry によってコントロール(予防や治療効果)が可能との報告がある。

2. 研究の目的

β -cry を用いて抗悪性腫瘍剤に対する口腔由来細胞の影響を検討することならびに口腔粘膜炎に対する重症化のリスクファクターである口腔内細菌の影響を検討すること、さらには、マウス口腔粘膜炎モデルに対する β -cry の影響を検討することから、 β -cry の薬剤性口腔粘膜炎に対する予防・治療薬としての可能性を検討すること

3. 研究の方法

(1) β -cry は、Uchiyama らの報告に従い、最終濃度を 1×10^{-7} mol/l に調整した。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、 1×10^7 CFU/ml に調整した。

(2) 実験にはヒト口腔粘膜上皮細胞(以下、HO-1-N-1)を用いた。HO-1-N-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、 β -cry は DEMSO(dimethyl sulfoxide)を用いて溶解し 1×10^{-7} M に調整し用いた。

(実験1) *P. gingivalis* 由来 LPS で刺激後に β -cry を添加した群を LPS+ β -cry 群とした。また、HO-1-N-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 β 、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子(以下、TNF)- α について、real time PCR 法を用い遺伝子発現を解析した。HO-1-N-1 の細胞形態は、位相差顕微鏡を用いてコントロール群・ β -cry 群・LPS 群・LPS+ β -cry 群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

β -cry(1×10^{-7} M)を添加した。24 時間後 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (100 $\mu\text{g/ml}$)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- α 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。

(実験2) 5フルオロウラシル(以下、5FU)で刺激後に β -cry を添加した群を 5FU + β -cry 群とした。また、HO-1-N-1 に対して 5FU 刺激のみの群を 5FU 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 β 、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子(以下、TNF)- α について、real time PCR 法を用い遺伝子発現を解析した。HO-1-N-1 の細胞形態は、位相差顕微鏡を用いてコントロール群・ β -cry 群・5FU 群・5FU + β -cry 群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

β -cry(1×10^{-7} M)を添加した。24 時間後 5FU 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- α 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

(実験1)

Real-time RT-PCR において LPS 群が control 群に比べ IL-1 β ・IL-6・TNF- α mRNA 発現が増加した。 β -cry 添加により LPS 群に比べ、IL-1 β ・IL-6・TNF- α mRNA 発現が減少した(図1)。ELISA において LPS 群が control 群に比べ IL-8 の産生量が増加した。 β -cry 添加により LPS 群に比べ、IL-6・IL-8 産生量が減少した(図2)。CBA により、LPS 刺激による細胞内シグナル伝達に参与する MAPK タンパクのリン酸化したタンパクの量を測定しました。LPS 刺激により ERK のリン酸化を促進した。また、 β -cry の添加は LPS 刺激に

よる ERK のリン酸化を抑制した (図 3)。これより β -cry は口腔粘膜上皮細胞に対して抗炎症効果を有しており、粘膜炎に対する治療薬となる可能性が示唆された。

さらに作用機序として、*P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による細胞内シグナル伝達に關与する ERK の活性化により炎症性サイトカインの産生が増強された。加えて、 β -cry の添加により、ERK の活性化を阻害する事で、炎症性サイトカインの産生を抑制したと考えられた。

<real-time RT-PCR>

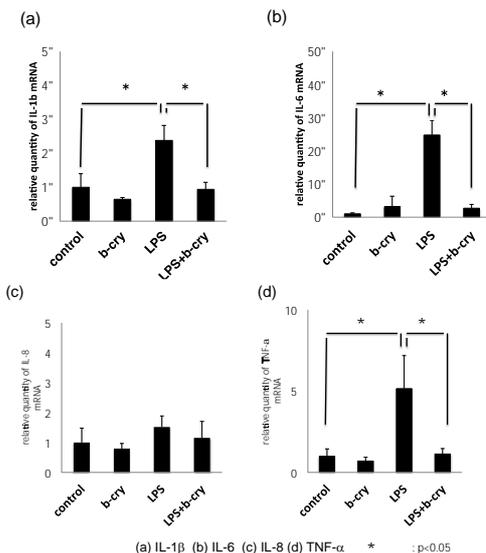


図 1. *P. gingivalis* LPS に対するヒト粘膜上皮細胞の炎症性サイトカイン発現

<ELISA>

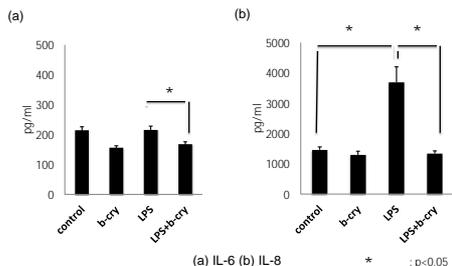


図 2. *P. gingivalis* LPS に対するヒト粘膜上皮細胞の炎症性サイトカインの産生量

<CBA>

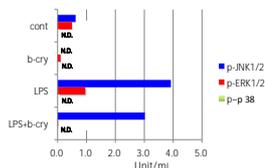


図 3. *P. gingivalis* LPS に対するヒト粘膜上皮細胞の細胞内シグナル伝達

(実験 2)

Real-time RT-PCR において 5FU 群が control 群に比べ IL-1 β ・IL-6・TNF- α mRNA 発現が増加した (図 4)。 β -cry 添加により 5FU 群に比べ、IL-1 β ・IL-6・TNF- α mRNA 発現が減少した。ELISA において 5FU 群が control 群に比べ IL-8 の産生量が増加した。 β -cry 添加により LPS 群に比べ、IL-6・IL-8 産生量が減少した (図 5)。CBA により、LPS 刺激による細胞内シグナル伝達に關与する MAPK タンパクのリン酸化したタンパクの量を測定しました。LPS 刺激により ERK のリン酸化を促進した。また、 β -cry の添加は LPS 刺激による ERK のリン酸化を抑制した (図 6)。これより β -cry は口腔粘膜上皮細胞に対して抗炎症効果を有しており、粘膜炎に対する治療薬となる可能性が示唆された。

さらに作用機序として、*P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による細胞内シグナル伝達に關与する ERK の活性化により炎症性サイトカインの産生が増強された。加えて、 β -cry の添加により、ERK の活性化を阻害する事で、炎症性サイトカインの産生を抑制したと考えられた。

5FU で生じる口腔粘膜上皮の炎症に対して、 β -cry は抗炎症作用を有する可能性が判明した。これにより、天然食物に多く含まれる、安全性の高い β -cry はがん化学療法で生じる口腔粘膜炎の新たな治療法となりうる可能性がある。

<real-time RT-PCR>

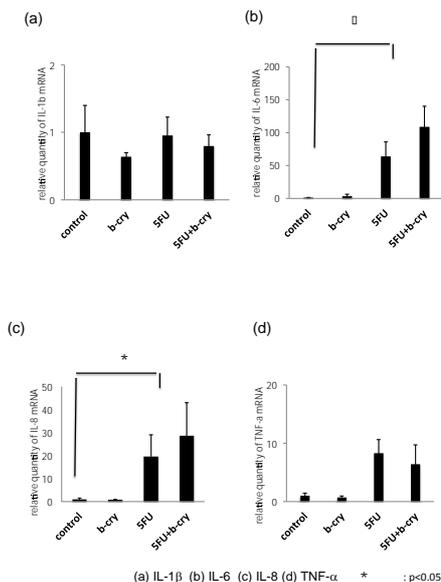


図 4. 5FU に対するヒト粘膜上皮細胞の炎症性サイトカイン発現

<ELISA>

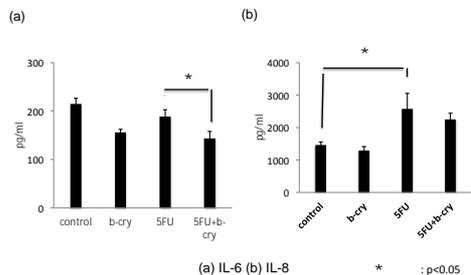


図 5. 5FU に対するヒト粘膜上皮細胞の炎症性サイトカインの産生量

<CBA>

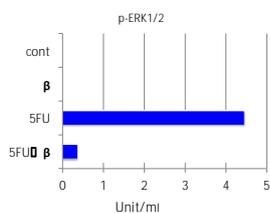


図 6. 5FU に対するヒト粘膜上皮細胞の細胞内シグナル伝達

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)

[学会発表](計 3 件)

5-FU による HO-1-N-1 のサイトカイン産生に対する β-cry の影響. 大迫文重・山本俊郎・西垣勝・雨宮傑・金村成智. 第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 千葉, 幕張メッセ, 2016/11/25

Effects of β-cryptoxanthin on cytokine production by oral mucosal epithelial cells. Fumishige Oseko, Toshiro Yamamoto, Yoshiki Sato, Hiroaki Ichioka, Kenta Yamamoto, Masakazu Kita, Narisato Kanamura. Seoul, June 24, 2016

-クリプトキサンチンが口腔粘膜上皮細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響. 大迫文重・山本俊郎・滝沢茂太・雨宮傑・長谷川彰則・金村成智. 第 25 回(一社)日本有病者歯科医療学会総会・学術大会, 東京, タワーホール船堀, 2016/3/6

6. 研究組織

(1)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: 1 0 3 9 8 4 0 6

(2)研究分担者

山本 俊郎 (YAMAMOTO Toshiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 4 0 3 4 7 4 7 2

喜多 正和 (KITA Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 6 0 1 5 3 0 8 7

金村 成智 (KANAMURA Narisato)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 7 0 2 0 4 5 4 2