



栄養機能食品“プロライン・ウィズ・デンタル”による ヒト骨芽細胞性細胞 (Saos-2) の骨形成能および 抗炎症作用に関する研究

王 宝禮¹⁾ / 牧田佳真²⁾ / 大草亘孝³⁾ / 益野一哉¹⁾ / 今村泰弘⁴⁾

● 要旨

本研究は栄養機能食品“プロライン・ウィズ・デンタル”による細胞増殖能, コラーゲン産生能, アルカリホスファターゼ (ALP) 活性, 炎症性サイトカイン産生を基礎実験系で検討するものである。ヒト骨芽細胞性細胞 (human osteoblastic osteosarcoma cell line ; Saos-2) を用い, 細胞増殖能は MTT アッセイと Brdu Cell Proliferation Assay Kit を用いた。I 型コラーゲン産生能は ELISA 法で解析した。ALP 活性を Lab Assay ALP Kit を用い解析した。Saos-2 に対する歯周病関連細菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide 刺激による炎症性サイトカイン interleukin (IL)-6, IL-8 産生状況を ELISA 法で解析した。

その結果, “プロライン・ウィズ・デンタル” が Saos-2 において骨形成能および抗炎症作用を有する可能性が示唆された。

キーワード: 栄養機能食品 (nutritional functional food), プロライン・ウィズ・デンタル (Proline With Dental), 骨芽細胞性細胞 (osteoblastic cell), 骨形成能 (bone growth ability), 抗炎症作用 (anti-inflammatory effect)

緒 言

歯周病とは, 歯肉辺縁部の歯周組織の病変群に対し与えられた総括的疾患名であり¹⁾, 歯と歯肉の境界に形成される細菌性バイオフィーム (プラーク) が原因となり, 歯を支持している歯周組織 (歯肉上皮, 歯根膜, 歯槽骨) が破壊される慢性炎症を主体とする疾患である。歯周病は歯肉炎から始まり歯周炎にいたる病態であり, 具体的には進行するにつれて骨の吸収が起こり, 最終的には歯を失うこともある。

近年, 栄養素・食品と歯周病との関連性に関する疫学研究が行われ, 多くのエビデンスが蓄積されつつある。一方, 健康の保持増進と疾病予防に関する

エビデンスが示されている機能成分を含む食品である機能性食品の開発が精力的に進められているが, 歯周保健の分野においても, 栄養素・食品による介入研究が活発に行われてきている²⁾。“プロライン・ウィズ・デンタル (Proline With Dental ; PWD)” は歯科用栄養機能食品として開発された。このような背景から, 我々の研究チームは補助療法として PWD の歯周疾患に対する臨床効果を検討した結果, 摂取前後と比較して歯周ポケットや歯肉からの出血状況が改善したことを報告した³⁾。

そこで本研究では, 歯周病の病態理論を想定した基礎実験において, PWD がヒト骨芽細胞性細胞 (human osteoblastic osteosarcoma cell line : Saos-2) の骨形成能および抗炎症作用に及ぼす影響に関する検討を行った。

1) 大阪歯科大学歯学部歯科医学教育開発センター

2) 大阪歯科大学歯学部化学教室

3) 大阪歯科大学歯学部歯科法医学室

4) 松本歯科大学歯科薬理学講座

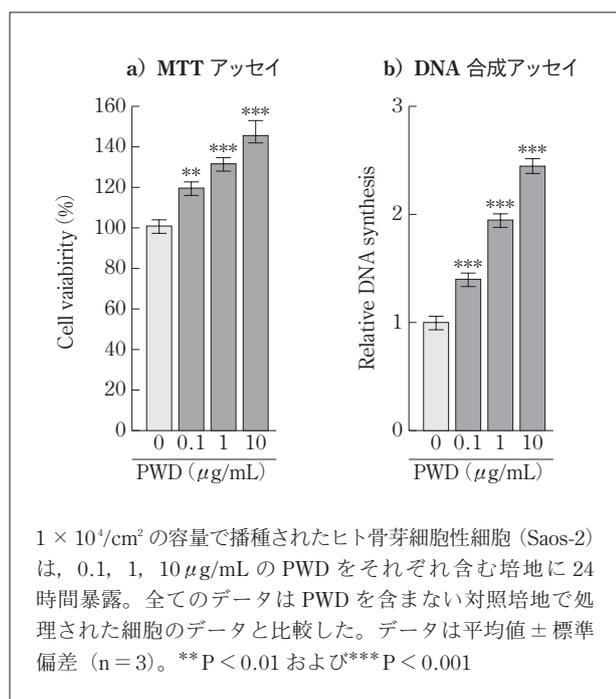


図 1 Saos-2 の増殖に対する PWD の影響

1. 材料と方法

1) 細胞培養

Saos-2 細胞 (RIKEN BRC Cell Bank, 東京, 日本) は、10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 units/mL ペニシリン G, 100 μg/mL ストレプトマイシン含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (日水製薬, 東京, 日本) を用い、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

2) 材料および試薬

プロライン・ウィズ・デンタル (PWD: RAPPORT Co., 土浦, 茨城, 日本), 抗インターロイキン (Interleukin; IL)-6 抗体 (eBioscience, CA, USA), ビオチン化抗 IL-6 抗体 (eBioscience), 抗 IL-8 抗体 (R & D Systems), ビオチン化抗 IL-8 抗体 (R & D Systems, MS, USA), ビオチン化抗コラーゲンタイプ I 抗体 (Rockland, PA, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) (シグマアルドリッチ, 東京, 日本)。また、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *A. a.*) 由来リポポリサッカライド (lipopolysaccharide; LPS) は Dr. H. Senpuku より供与された。

3) DNA 合成解析と MTT アッセイ

DNA 合成解析では、Saos-2 細胞 (1 × 10⁴) を 0.5% FBS 含有 DMEM で 24 時間培養後、プロモデオキシウリジン (BrdU) 存在下 PWD (0.1, 1, 10 μg/mL) を添加し、24 時間培養した。その後、BrdU Cell Proliferation Assay Kit (メルクミルポア, 東京, 日本) を用いて解析した。MTT アッセイでは、Saos-2 細胞 (1 × 10⁴) を 10% FBS 含有 DMEM で 24 時間培養後、5 mg/mL MTT 10 μL を細胞に添加し、4 時間培養した。その後、Imamura ら⁴⁾ の方法により解析した。

4) 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISAs)

ELISA は CytoSet Kits (Biosource, CA, USA) ユーザーマニュアルに記載された方法で行った⁵⁾。サイトカイン産生解析では、Saos-2 細胞 (1 × 10⁴) を *A. a.* LPS (100 ng/mL) と PWD (10 μg/mL) 存在下で 24 時間培養し、培地を回収した。培地中の IL-6 あるいは IL-8 量は、抗 IL-6 抗体 (1 μg/mL) とビオチン化抗 IL-6 抗体 (0.6 μg/mL), あるいは抗 IL-8 抗体 (2.5 μg/mL) とビオチン化抗 IL-8 抗体 (0.2 μg/mL) を用いてそれぞれ測定した。コラーゲン産生解析では、Saos-2 細胞 (1 × 10⁴) をプロライン (10 μg/mL) 存在下で 1% FBS 含有 DMEM にて 24 時間培養し、培地を回収した。培地中のコラーゲン量はビオチン化抗コラーゲンタイプ I 抗体 (0.2 μg/mL) を用いて測定した。また、細胞を 0.5% TritonX-100 で溶解後、BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA) でタンパク質量を測定し、コラーゲン産生量を標準化した。

5) ALP アッセイ

Saos-2 細胞 (1 × 10⁴) を PWD (10 μg/mL) 存在下で 24 時間培養後、細胞を 0.05% TritonX-100 で溶解した。細胞溶解物のアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) 活性は LabAssay ALP Kit (和光純薬, 東京, 日本) で測定した。また、細胞溶解物のタンパク質量を BCA Protein Assay Kit で測定し、ALP 活性を標準化した。

6) 統計解析

得られたデータは StatMate Software (ATMS) を使用し、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) と Tukey's test [DNA 合成解析, MTT アッセイ, ELISAs (IL-6, IL-8)], あるいは Student's t test [ELISA (コラーゲン), ALP アッセイ] で解析し

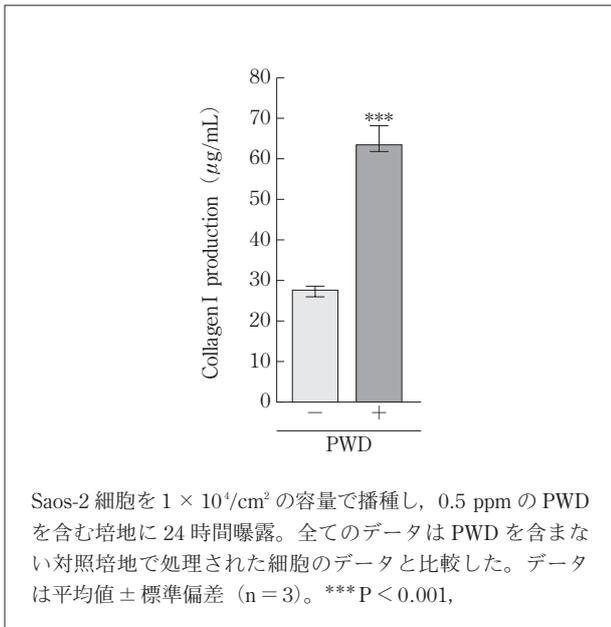


図2 PWD 処理 Saos-2 の I 型コラーゲンの生成

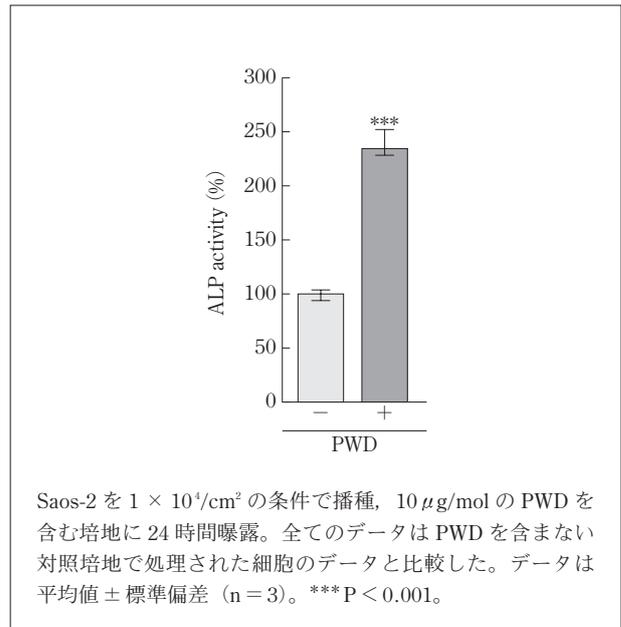


図3 PWD 処理 Saos-2 の ALP 活性

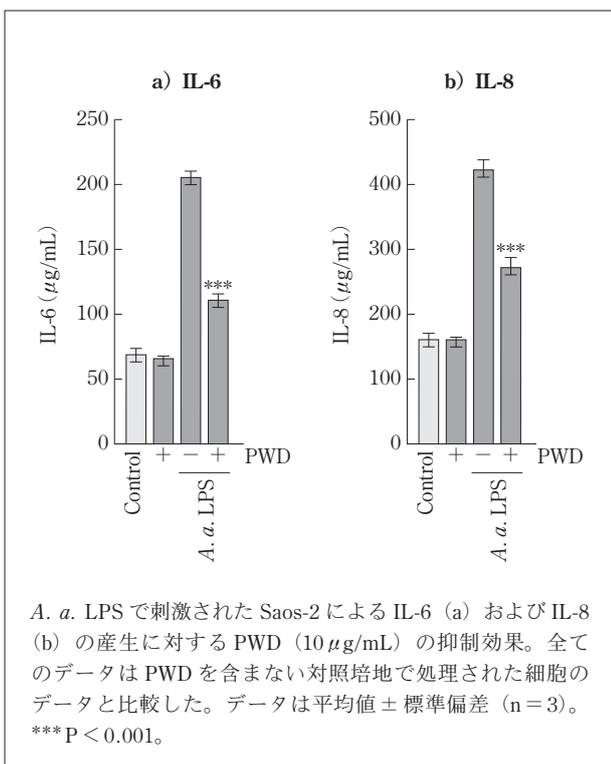


図4 *A. a.* LPS 刺激 Saos-2 への PWD の影響

た。p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

2. 結 果

Saos-2 の細胞生存率に対する PWD の影響を、MTT アッセイと Brdu Cell Proliferation Assay Kit を用いて検討した (図1)。PWD は 0.1, 1, 10 µg/

mL で濃度依存的に Saos-2 に増殖能を示した。なお、本実験系では PWD 10 µg/mL の濃度で実施した。

まず、骨形成能に関与する Saos-2 の I 型コラーゲン産生能力に対する PWD の影響を検討した (図2)。その結果、PWD は Saos-2 の I 型コラーゲンの産生を約 1.6 倍増強した。

次に、骨形成活性を反映する ALP 活性を計測した (図3)。その結果、PWD は Saos-2 の ALP 活性率を約 2.4 倍増強した。

さらに、Saos-2 における *A. a.* LPS 刺激による炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の産生は、PWD 添加によって抑制された (図4)。

3. 考 察

PWD は歯科用栄養機能食品として開発された。既に我々の研究グループは臨床研究において PWD の効果を検討している。その結果、歯周病患者 6 例 (男性 4 例、女性 2 例、39 ~ 64 歳) に対して歯周基本治療を併用して PWD を投与し、PWD 摂取 26 ~ 41 日後において、歯周ポケット (PD : pocket depth) の平均値は全例で減少し摂取開始時 3.4 ~ 4.8 mm から摂取後 2.3 ~ 4.1 mm となり、PD 4 mm 以上の比率も 35.1 ~ 80.8% から 8.6 ~ 59.2% に低下した。出血状況は 82.1 ~ 100% から 20.7 ~ 100% と改善した³⁾。この臨床研究から、PWD の歯

表1 “プロライン・ウィズ・デンタル (PWD)” の原材料

ボスウェリアセラータエキス末	ブドウ種子エキス末	酵母 (モリブデン含有)
明日葉末	ビタミンC	ナイアシン
ケール末	α -リポ酸	ビタミンB2
緑茶エキス末	酵母 (亜鉛含有)	ビタミンB6
		ビタミンB12

周病への抗炎症作用の可能性が示唆されたが、本研究は歯周病の病態理論を想定して基礎実験でPWDによるSaos-2の骨形成能および抗炎症作用に関する検討を目的としたものである。

その結果、PWDは濃度依存的にSaos-2の増殖能を示し、Saos-2のI型コラーゲンの産生を増強した。骨形成活性を反映するALP活性についても、Saos-2のALP活性率を約2.4倍増強した。さらに、Saos-2に対する*A. a.* LPS刺激による炎症性サイトカインIL-6およびIL-8の産生が抑制された。

骨組織においては、骨芽細胞ならびに破骨細胞がそれぞれ骨形成、骨吸収を担い、絶えず代謝が行われている。間葉系細胞に由来する骨芽細胞は骨形成に際して、骨基質蛋白合成と基質小胞を介した石灰化を誘導する。骨芽細胞の成熟過程においては、最初に細胞が増殖し、コラーゲンなどの石灰化基質を合成した後に細胞外に分泌して、形成された基質にカルシウムやリンが蓄積して石灰化が生じる。その過程において、早期にはI型コラーゲン、ALP、オステオポンチン、後期にはオステオカルシン等のマーカー遺伝子の発現が上昇することが知られている⁶⁾。本研究では、PWDが細胞増殖能、コラーゲンおよびALPの上昇を確認したことから、PWDの骨形成能を有する可能性が示唆された。

PWDの原材料には、様々な栄養成分が含まれている(表1)。PWDに含まれる緑茶エキス末のカテキン類の中で、ガレート基を持つエピガロカテキンガレート(EGCG)は、強い生理活性を持つことが知られている。近年、これらカテキンに破骨細胞の分化抑制作用があることが報告されている⁷⁾。さらに、*in vivo*実験における歯周疾患のモデルマウスにおいては、歯周疾患原因子であるリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)の投与により誘導される歯槽骨吸収において、EGCGの投与によってその歯槽骨吸収が改善した⁸⁾。以上の報告から、本研究結果の骨形成能はPWDに含まれる緑茶エキス末

のカテキン類である可能性が考えられる。

抗炎症作用の基本的な概念はアラキドン酸カスケードである⁹⁾。細胞膜リン脂質から合成されたアラキドン酸は、主に3つの経路で代謝される。第1の経路はシクロオキシゲナーゼ(COX)によりプロスタグランジンやトロンボキサンなどを合成するCOX経路、第2はリポキシゲナーゼによりロイコトリエンやリポキサンなどを合成するリポキシゲナーゼ(LipoX)経路、第3はチトクロームP450(CYP)によりエポキシエイコサトリエン酸などを合成するCYP経路である。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのサブタイプがある。COX-1は血小板、消化管、腎臓などに常時発現しており、臓器の恒常性維持に必要である。COX-2は炎症などで誘導され、血管拡張作用などを有し炎症を促進するプロスタグランジンE2(PGE2)などを合成する。炎症はLipoX, PGE2, IL-6, IL-8などの炎症ケミカルメディエーターで展開される⁹⁾。

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)はアラキドン酸カスケードのCOXを阻害することで、PG類の合成を抑制する。PGEの中でも、特にPGE2は起炎物質・発痛増強物質である。NSAIDsは主にPGE2の合成抑制によって鎮痛・解熱・抗炎症作用を発揮する。本実験に用いたPWDの成分であるボスウェリアセラータエキスに含まれるボスウェリン酸^{10) 11)}は炎症性ケミカルメディエーターLipoXを抑制する。緑茶エキスに含まれるエピガロカテキンガレート^{12) 13)}、アシタバ(明日葉)に含まれるカルコン¹⁴⁾、ケールに含まれるメラトニン¹⁵⁾は炎症性ケミカルメディエーターPG類COX-2を阻害する。さらにブドウ種子エキスに含まれるプロアントシアニジン^{16) 17)}はCOX-2と、炎症性サイトカインIL-6, IL-8を阻害する。以上の報告からPWDに含まれる栄養成分が骨形成能や抗炎症作用をもたらした可能性がある。

近年、歯周組織の健康の保持増進に関する栄養素・食品による介入研究が活発に行われるようになってきている。既に「歯科口腔保健の推進に関する法律」が施行されているが、これは国民が健康で質の高い生活を営む上で、口腔の健康は基礎的かつ重要な役割を果たしているという認識に立脚している。口腔の健康の維持のために食品の果たす役割が大きいと考える³⁾。

結 論

本実験結果を、PWDの有効成分を単一または数種の物質に特定することはできない。現在、薬理作用のメカニズムは解明中であるが、PWDがSaos-2の細胞内の情報伝達を通じて、細胞増殖能向上、コラーゲン産生能向上、ALP活性能向上炎症性サイトカインの抑制をもたらしたと考えることができる。

本論文に関連し、開示すべき利益相反(COI)はない。

参 考 文 献

- 1) 鴨井久一, 山田 了, 伊藤公一, 編: 標準歯周病学第4版, 医学書院, 東京, 2005.
- 2) 雫石 聡, 田中宗雄, 永田英樹: 最近の歯周保健のための機能性食品に関するエビデンス. 口腔衛生会誌 2011; **61**: 190-202.
- 3) 雨宮 淳, 王 宝禮: 栄養機能食品「プロライン ウィズ デンタル」の歯周疾患に対する臨床効果. 日本歯科東洋医学会誌 2013; **32**: 14-16.
- 4) Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, et al: Cooperation of salivary protein histatin 3 with heat shock cognate protein 70 relative to the G1/S transition in human gingival fibroblasts. J Biol Chem 2009; **284**: 14316-25.
- 5) Imamura Y, Wang PL: Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts. J Inflamm (Lond) 2014; **11**:4.
- 6) Stein GS, Lian JB: Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts. Noda M, Cellular and Molecular Biology of Bone, Academic Press, Tokyo. pp. 47-95, 1993.
- 7) Tominari T, Matsumoto C, Watanabe K, et al: Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory bone resorption, and protects against alveolar bone loss in mice. FEBS Open Bio 2015; **5**: 522-7.
- 8) Tominari T, Ichimaru R, Yoshinouchi S, et al: Effects of O-methylated (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on LPS-induced osteoclastogenesis, bone resorption, and alveolar bone loss in mice. FEBS Open Bio 2017; **7**: 1972-81.
- 9) 丸山一男: 痛みの考え方—しくみ・何を・どう効かす—, 南江堂, 2014.
- 10) Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, et al: Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. J Pharmacol Exp Ther 1992; **261**: 1143-6.
- 11) Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP: Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. Mol Pharmacol 1995; **47**: 1212-6.
- 12) Peng G, Dixon DA, Muga SJ, et al: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. Mol Carcinog 2006; **45**: 309-19.
- 13) Shimizu M, Deguchi A, Joe AK, et al: EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. J Exp Ther Oncol 2005; **5**: 69-78.
- 14) Zarghi A, Zebardast T, Hakimion F, et al: Synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenylprop-2-en-1-ones possessing a methanesulfonamido or an azido pharmacophore as cyclooxygenase-1/-2 inhibitors. Bioorg Med Chem 2006; **14**: 7044-50.
- 15) Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, et al: Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. J Neuroimmunol 2005; **165**: 139-49.
- 16) Bodet C, Chandad F, Grenier D: Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci 2007; **115**: 64-70.
- 17) Hou DX, Fujii M, Terahara N, et al: Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. J Biomed Biotechnol 2004; **2004**: 321-325.