

# 石崎秀隆 論文内容の要旨

主 論 文

## Pre-treatment with tannic acid inhibits the intracellular IL-8 production by chitosan in a human oral epithelial cancer cell line

(タンニン酸前処理は、キトサンによるヒト口腔扁平上皮癌細胞内IL-8産生を抑制する)

Hidetaka Ishizaki, Shizuka Yamada, Kajiro Yanagiguchi,  
Zenya Koyama, Takeshi Ikeda, Yoshihiko Hayashi

石崎 秀隆、山田 志津香、柳口 嘉治郎、  
小山 善哉、池田 毅、林 善彦

Oral Medicine & Pathology Vol.13, No.3, pp135-141, 2009

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：林 善彦教授)

### 緒 言

上皮細胞及び線維芽細胞にキトサンを添加して培養すると炎症性サイトカインである IL-8 を産生する事が、明らかにされている。また、タンニン酸は様々な生物学的活性を有していることが知られている。

本研究は、キトサンによる上皮細胞の細胞内 IL-8 産生状態と、タンニン酸前処理による IL-8 産生の抑制効果を明らかにするために実施した。すなわち、IL-8 について、細胞内の産生量と同時に mRNA の発現状況を計測・分析した。さらに、抑制機構についても検討を加えた。

### 材料と方法

実験には、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 (HSC-2) を用いた。10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM にて上皮細胞を培養した後、通常の継代操作にて  $5 \times 10^5$  個の上皮細胞を 35mm 培養皿に播種した。次に、キトサンポリマー (東京化成社製 分子量 58 万 脱アセチル化度 88.8%) 添加のキトサン添加群 (0.005%~0.20%)、希釈溶媒のものコントロール群に分け、2h~8h の培養後、フローサイトメーターにて IL-8 産生細胞数を測定した。また、2h のタンニン酸 (0.005%~0.02%) による前処理を行い、キトサン添加 (0.025%) 後 4h 培養し、IL-8 産生細胞数の変化を測定した。

60mm 培養皿に  $5 \times 10^5$  個の上皮細胞を播種した。RT-PCR 解析のために、キトサン処理群 (0.025%)、コントロール群、2h のタンニン酸 (0.001%) 前処理群を作製し、2、4h 培養を行なった。通法に従って、cDNA を作製したのち、IL-8 mRNA の発現状況を解析した。次に、IL-8 産生機構が MAPKs を介していることを検討するために、上皮

細胞を ERK1/2 阻害剤 (PD98059)、p38MAPK 阻害剤 (SB203580) で 2h 前処理し、その後 0.025%キトサンにて処理を行い IL-8 mRNA の発現を測定した。

さらに、キトサン処理によって上皮細胞の MAPKs のリン酸化の亢進が認められるか否かを調べるため、上皮細胞は 100mm 培養皿に  $5 \times 10^5$  個播種された。細胞はコントロール群、キトサン処理群、2 時間のタンニン酸前処理群+キトサン処理群に分けて培養を行なった。10 日間培養後、human MAPK array kit (R&D) を使って様々な MAPKs のリン酸化状態を解析した。

## 結果

フローサイトメーターで IL-8 産生細胞数を測定したところ、HSC-2 細胞をキトサンで処理するとコントロール群に比較して有意に高い陽性細胞の出現が観察された。キトサン濃度 0.025%、4 時間培養において最も高い IL-8 産生細胞を確認した。タンニン酸による前処理によって、その陽性細胞の割合は減少した。

RT-PCR 分析から、キトサン処理群においてコントロール群に比較して 2h、4h 培養共に IL-8 m-RNA 発現の増強が認められ、タンニン酸による前処理によって IL-8 m-RNA 発現の抑制が認められた。また、特異的阻害剤 PD98059、SB203580 でキトサン添加群を前処理することによって、IL-8 mRNA の発現が抑制された。

HSC-2 細胞の MAPKs のリン酸化抗体反応試験において、キトサン処理群はコントロール群に比較して、15 の MAPKs で 1.2 倍以上の亢進が認められ、タンニン酸による前処理群ではキトサンのみ処理群に比較して、12 の MAPKs において 0.8 倍以下の抑制が認められた。

## 考 察

今回の実験から、HSC-2 細胞をキトサンポリマーで処理することで IL-8 の産生亢進と、IL-8 m-RNA 発現の増強が確認された。また、タンニン酸前処理によって IL-8 の産生は抑制された。

また、HSC-2 細胞を PD98059、SB203580 で前処理することによって、IL-8 mRNA の発現は減弱した。このことから、HSC-2 細胞においてキトサンによる IL-8 産生は MAPKs を介している事が強く示唆された。

本研究は、キトサンポリマーによる IL-8 産生はタンニン酸によって抑制されることを初めて証明している。このことは、キトサンによる初期炎症は、ある程度タンニン酸によって軽減される可能性を示している。したがって、タンニン酸とキトサンの併用療法は、臨床における口腔粘膜の炎症の処置へ有益であると考えられる。