



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト口腔粘膜上皮細胞のIL-1 α および β -defensin 1の産生に対する半夏瀉心湯とデキサメタゾンの作用比較
Author(s)	羽藤, 裕之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15506号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15506
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93938
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroyuki_Hato.pdf



博士論文

ヒト口腔粘膜上皮細胞の IL-1 α および β -defensin 1 の産生に対する半夏瀉心湯と デキサメタゾンの作用比較

令和 5 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

羽 藤 裕 之

ヒト口腔粘膜上皮細胞の IL-1 α および β -defensin 1 の産生に対する半夏瀉心湯
とデキサメタゾンの作用比較

羽藤裕之、河野 透、金子 篤、前田知歩、坂田健一郎、小野裕介、水上裕輔、
北川善政

**Comparison between Hangeshashinto and dexamethasone on IL-1 α and
 β -defensin 1 production by human oral keratinocytes**

Hiroyuki Hato, Toru Kono, Atsushi Kaneko, Chiho Maeda, Ken-ichiro Sakata,
Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Yoshimasa Kitagawa

和文抄録

口内炎の治療は主にデキサメタゾン (DEX)をはじめとしたステロイドの局所塗布が選択されるが、これらの薬剤の常用は日和見感染の発症を誘発する例が散見される。 β -defensin 1 は、口腔粘膜上皮細胞をはじめとする口腔組織が恒常的に分泌する抗菌ペプチドの一つであり、口腔内の自然免疫の維持に重要な役割を担っている。漢方薬の一つである半夏瀉心湯 (HST)は、これまでも口内炎への有効性が報告されている。本研究はヒト口腔粘膜上皮細胞の IL-1 α および hBD-1 産生系について、DEX と対比することによって、HST 薬剤のプロファイルを明らかにすることを目的とした。Human oral keratinocyte (HOK)を 24 時間 HST または DEX で処理し、さらに炎症惹起剤である Pam3CSK4 または LPS を加え 24 時間培養した。細胞上清と total RNA を回収し、IL-1 α および hBD-1 のタンパク産生や遺伝子発現の変化を ELISA または RT-PCR で評価した。HST は細胞増殖能に影響を与えず、かつ hBD-1 産生レベルを維持する条件下で、Pam3CSK4 および LPS 誘導性の IL-1 α の産生および遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。一方 DEX は同様に HOK の Pam3CSK4 および LPS 誘導性の IL-1 α の産生を抑制したが、濃度依存的に細胞増殖能および hBD-1 の産生を低下させた。HST の含有成分で、Flavonoid である Baicalein および Baicalin に同

様の抗 IL-1 α 産生が認められた。HST は口内炎をはじめとした口腔内の炎症疾患に対する治療薬として有用であることが示唆された。

英文抄録

The treatment of oral stomatitis is mainly topical application of steroids such as dexamethasone (DEX), though regular use of these drugs sometimes induces the development of opportunistic infections. Human β -defensin 1 (hBD-1) is an antimicrobial peptide constitutively expressed by oral tissues such as oral mucosal epithelial cells, and plays an important role in the maintenance of innate immunity in the oral cavity. This study aimed to clarify the profile of HST by contrasting the IL-1 α and hBD-1 production systems of human oral mucosal epithelial cells with those of DEX. Human oral keratinocytes (HOK) were pretreated with HST or DEX and then stimulated with Pam3CSK4 or LPS. Cell supernatants and total RNA were collected, and changes in IL-1 α and hBD-1 protein production and gene expression were evaluated by ELISA or RT-PCR. HST inhibited Pam3CSK4- and LPS-induced IL-1 α production without affecting HOK cell proliferative capacity and hBD-1 production. Although DEX similarly suppressed Pam3CSK4- and LPS-induced IL-1 α production in HOK, DEX decreased cell proliferative capacity and hBD-1 production in a concentration-dependent manner. Similar anti-IL-1 α production was observed for the flavonoid Baicalein and Baicalin with the HST component. The results suggest that

HST is useful as a therapeutic agent for stomatitis and other inflammatory diseases of the oral cavity.

Introduction

口腔粘膜上皮は、常に曝される種々の病原体に対して、物理的な障壁として機能している。さらに Defensin に代表される抗菌ペプチドを産生することにより、口腔内の恒常性の維持に関与している。Defensin は細菌に加え、真菌、ウイルスなど幅広い殺菌作用をもち、静電気的な相互作用を経て、細胞壁や細胞膜に孔を形成し、溶菌・殺菌作用を示す^{1,2)}。ヒトでは α -defensin と β -defensin の発現が認められ、 β -defensin は口腔粘膜をはじめ多くの口腔組織に発現している^{3,4)}。

β -defensin の多くは炎症により誘導される一方、 β -defensin 1 (hBD-1) は恒常発現として知られている。この hBD-1 の恒常性は、上皮の自然免疫の維持に加え、角化層に位置するケラチノサイトのアポトーシスを抑制し、上皮の再構成に貢献しているとされている⁵⁾。また DEFB1 ノックアウトマウスは、野生型に比べて膀胱内の *Staphylococcus aureus* が著しく多いことが報告されている⁶⁾。hBD-1 はそのほかにも白血球走化性因子としての役割、創傷治癒の促進といった多面性が報告されているため、これまでも hBD-1 の発現低下は、多くの疾患や感染症との関連が指摘されている⁷⁻¹¹⁾。また固形食物などの物理的な侵襲、長期的な薬物療法等は、粘膜上皮の hBD-1 低下を伴うバリア機能を低下させる。粘膜上皮バリア機能の低下が起こると、病原性微生物の生体内侵入を許し、炎症性白

血球の集積を伴う炎症が誘発される。この炎症の増強や慢性化は、時に難治性の口内炎となり、疼痛をはじめとする持続的な症状をもたらすため、患者の Quality of life 低下を伴い治療の対象となる。このような口内炎治療においては、デキサメタゾン(DEX)などの局所のステロイド投与が選択されることが多いが、この常用的投薬が真菌の *Candida* 属などによる日和見感染の発症を誘発する例が散見される^{12,13)}。ステロイドが口腔粘膜上皮細胞の生体防御機構に負の影響を与えた結果として臨床ではしばしば問題視されている。

半夏瀉心湯 (HST)は、日本の Traditional Japanese Medicine の一つで、7つの生薬から構成され、本邦では一般用医薬品以外に、医療用医薬品として処方される^{14,15)}。HST は急性または慢性の胃腸炎、急性腸炎、口内炎などの治療によく用いられ、そのメカニズムも部分的に解明されてきた。近年では HST の含嗽により、化学放射線療法中に生じる口内炎の発症・疼痛のコントロールに有効であることが報告され、その効果、機序が注目されている¹⁶⁾。この機序の一部として、HST の含有成分が IL-1 β 誘導性の PGE2 の産生を抑制すること、MAPK と CXCR4 を介して口腔ケラチノサイトの遊走能を向上させることが、これまでに明らかとなっている^{17,18)}。また HST は一部の歯周病原菌に殺菌作用をもたらすことも報告されている¹⁹⁾。HST の作用は多岐にわたるが、漢方薬の多くは、副作用が比較的少なく、高齢者でも比較的安全に投与できるとされている^{20,21)}。

前述のように、口腔粘膜に対する HST の創傷治癒促進効果が報告されているが、口腔粘膜機能に重要な役割を果たす hBD-1 に対する同剤の作用を調べた研究報告はない。本研究では、ヒト口腔粘膜上皮細胞の IL-1 α および hBD-1 産生系について、DEX と対比することによって、HST 薬剤のプロファイルを明らかにした。

Material and methods

被験試料

7 つの生薬 (ハンゲ、オウゴン、オウレン、カンキョウ、カンゾウ、ニンジン、タイソウ)から構成される HST は、株式会社ツムラ(Tokyo, Japan)から譲渡いただいた。DEX、Baicalein (BCN)、Baicalin(BC)、Berberine (BBR)、Glycyrrhizin (GL) はそれぞれ Wako Chemical Industrial (Tokyo, Japan)より購入した。

試薬の調製方法

HST は Dimethyl sulfoxide (DMSO)中濃度 100mg/mL で調製し、10 分間の超音波処理後、培養培地中 1/100 倍に希釈し、0.45 μ m フィルターに通した。最終的には終濃度 12.5、25、50、100 μ g/mL になるように調製し、培養系に添加した。DEX、BCN、BC、BBR、GL は DMSO にて溶解後、培養系に添加した。全試薬は DMSO 濃度が 0.1%以下になるよう調製した。

炎症性サイトカインおよび抗菌ペプチドの産生測定

ヒト口腔ケラチノサイト (HOK)は、ScienCell 社(Carlsbad, USA)から購入し、以下のように調製した培地(全て、ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA)を用いて 5%CO₂ 条件下で培養を行った。500ml 量の Oral keratinocyte medium に

対して、5 mL 量の oral keratinocyte growth supplement および 5mL 量の penicillin/streptomycin solution を添加した培地を用いた。培養に用いた dish は、事前に Poly-d-lysine コーティングしたものを使用した。実験は特別なことわりが無い限り、Figure 1 のプロトコールに準じた。12well plate に 1.0×10^5 /well、24well plate に 5.0×10^4 /well で播種し、翌日に HST、DEX、BCN、BC、BBR、GL を加えて培養した。24 時間後、LPS (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) または Pam3CSK4 (Enzo Life Sciences, NY, USA) を加えてさらに 24 時間培養し、細胞上清、total-RNA を回収した。被験試料の評価にあたっては、5-10 継代目の細胞を用いた。

細胞増殖能の測定

細胞増殖能は、XTT assay によって測定した。HOK を 96 ウェルマルチプレートに 1.0×10^4 /well で播種し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。24 時間後、HST 12.5、25、50、100 μ g/mL、DEX 0.01、0.1、1.0、10 μ M を添加した。さらに約 24、48 時間後、XTT 液 (Biological Industries, Israel) を加え 2 時間培養した後、プレートリーダー (Tecan Japan Co., Ltd., Kawasaki, Japan) を用いて、450nm の波長にて吸光度を測定した。

逆転写および定量的リアルタイム polymerase chain reaction (PCR)

RNA 調製にあたっては、RNA Lysis Buffer (Zymo Research, Irvine, CA, USA)にて細胞溶解させた後、Quick-RNA Micro-Prep R1050 (Zymo Research, Irvine, CA, USA)を用い、そのプロトコールに準じて実施した。抽出した RNA には DNase 処理を施した。Total RNA 量は $0.5 \mu\text{g}$ に統一し、逆転写反応を Superscript IV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて行った。得られた cDNA から SYBR Green 法 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)によるリアルタイム PCR を行った。使用したプライマーを Table 1 に示す。

IL-1 α および hBD-1 の遺伝子発現量は、 β -actin を内部標準対照とする相対値 (ppm)を算出して表記した。

ELISA

Human IL-1 α ELISA kit (Proteintech, Tokyo, Japan)、Human BD-1/beta Defensin-1 ELISA Kit (Arigo Biolaboratories Corporation, Hsinchu, Taiwan)、Human IL-8 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, USA)、Human TNF- α ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, USA)を用いて、付属の方法に従い定量した。

Statistical analysis

実験結果は平均値±標準誤差で記載した。有意差検定は Dunnet's test または Student's *t*-test を用いて行い、有意水準を 5%に設定した。すべての統計処理は、JMP (Version 14.0, SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いて行った。また全実験は 3 回以上行い、代表的な 1 例を呈示した。

Results

Cell viability

Figure 2A に示すように、HST は 12.5-100 μ g/mL のどの濃度においても HOK の細胞増殖能に影響を与えなかったが、DEX は濃度依存的に HOK の細胞増殖能を低下した (Figure 2B)。

Protein production

炎症惹起剤を添加しない系における HST は、HOK の IL-1 α の産生に影響を与えなかったが、Pam3CSK4、LPS 添加による誘導性の IL-1 α の産生増強に対して、HST は濃度依存的にかつ有意に抑制した (Figure 3A-C)。Pam3CSK4 および LPS の刺激から 24 時間後における hBD-1 の産生量は未刺激対照と差異がなかった。また HST は、いずれの刺激系においても、hBD-1 量に影響を与えなかった (Figure 4A,B)。一方で、DEX での 24 時間の処理そのものは、10 μ M において HOK の IL-1 α の産生を有意に低下した。(Figure 3D)。HST と同様に、DEX は Pam3CSK4、LPS 誘導性の IL-1 α の産生を濃度依存的に抑制したが、同時に濃度依存的に hBD-1 の産生も抑制した(Figure 3E,F, 4C,D)。

RNA expression

HST の作用点を検討するために、Pam3CSK4、LPS 誘導性の IL-1 α の産生を十分に抑制した 100 μ g/mL 濃度で、Pam3CSK4 添加から 24 時間後の DEFB1、IL-1 α の mRNA の発現を評価した。IL-1 α の mRNA 発現は Pam3CSK4 刺激で約 2 倍に増加した (Figure 5A)。また HST は、Pam3CSK4 刺激対照時に比べて IL-1 α の mRNA 発現を有意に抑制した。一方、DEFB1 の mRNA 発現に対しては、Pam3CSK4 刺激の有無に関わらず影響がなかった (Figure 5B)。

Screening of ingredients of HST that inhibit IL-1 α production

HST の含有成分は、3-dimensional high-performance liquid chromatography (HPLC) によるその内訳がすでに報告されている (Figure 6)²²⁾。HST の抗 IL-1 α 産生が、どの含有成分に依存するかを検討するため、Isoquinoline alkaloid である BBR、Flavonoid である BC とそのアグリコンである BCN、Triterpenoid である GL に着目した。評価濃度は一律の 30 μ M とした。その結果、BCN、BC に有意な IL-1 α 産生抑制が認められた (Figure 7)。

Discussion

本研究は HST の Pam3CSK4、LPS 誘導性の IL-1 α 産生抑制作用と hBD-1 を中心とした抗菌ペプチドの関係を、DEX と比較しつつ評価した初めての報告である。HST は HOK に対して、細胞増殖能や構成的に発現している hBD-1 の恒常性を維持しつつ、十分な炎症惹起剤由来の IL-1 α 産生抑制作用を与えた。一方で DEX は、同様の IL-1 α 産生抑制作用を示すなかで、HOK に細胞増殖能と hBD-1 の低下を濃度依存的に生じた。したがって HST は、DEX と比べ、hBD-1 が担う自然免疫機能に負の影響を与えないレベルで、病原性微生物由来の炎症惹起因子による炎症性サイトカイン産生を、選択的に抑制することが示唆された。

本研究においては、HOK 細胞の多様な抗菌ペプチドの遺伝子発現に対する HST 添加の影響を調べた。この結果、hBD-1, hBD-2, hBD-3, adrenomedullin, S100A7, S100A9 の発現に対して、100 μ g/mL 濃度の HST は影響を示さなかった (supplemental data-1)。一方、Pam3CSK4 あるいは LPS 刺激時の IL-8, TNF- α の産生に対する HST の作用を検討したところ、IL-1 α 同様、炎症誘導性のこれら炎症性サイトカインの誘導は HST 添加によって有意に抑制されることがわかった (supplemental data-2, -3)。これまでも HST は、IL-1 β 誘導性の PGE2 の産生や COX-2 の発現を抑制することも報告されている¹⁷⁾。IL-1 α , TNF- α および IL-8

は創傷治癒を促進する上で重要な役割を担うとされているが、過剰な発現は生体に有害な影響をもたらす²³⁻²⁵⁾。重度な歯周病を罹患する患者の歯肉溝浸出液中には、IL-1 α が過剰に発現していることが知られている^{26,27)}。*Candida albicans*による口腔カンジダ症は、生体の IL-8 の過剰産生がしばしば問題視されるが、これは生体の IL-1 α の産生向上を経由されているとされている²⁸⁾。本研究の結果より、HST が、口腔粘膜組織の生体維持に欠かせない hBD-1 などの抗菌ペプチドの恒常的発現に影響しない一方で、病原性微生物の外的侵襲で惹起される IL-1 α , TNF α および IL-8 の産生誘導を選択的に抑制することから、DEX とは異なる薬剤特性をもった口腔内治療薬である可能性が示唆された。

hBD-1 の作用は、近年、自然免疫としての役割以外にも注目されている⁴⁾。その効果は多岐にわたり、抗腫瘍効果、創傷治癒促進など様々である^{8,9,29,30)}。本研究では、DEX は細胞増殖能を抑制し、さらに抗 IL-1 α 産生を与える一方で hBD-1 の産生も低下させる傾向が認められた。DEX をはじめとしたステロイドの常用は、様々な合併症の発症の要因となることがある^{31,32)}。口腔扁平苔癬の症状緩和目的には、ステロイドの局所塗布が行われるが、これは口腔カンジダ症発症リスクを増大させる³³⁾。口腔カンジダ症による口腔粘膜上皮細胞の hBD-1 の低下は、以前より関連が指摘されている³⁴⁾。本研究の結果は、hBD-1 産生に関して DEX と HST の明解な違いを示した。口腔炎症の臨床治療において、上述のよう

に DEX の処方には十分な注意を要する中、HST は、口腔内の炎症疾患に対する治療薬として有用である可能性が考えられる。

HST を構成する生薬には、Isoquinoline alkaloid、Flavonoid、Phenylpropanoid に分類される多数の成分を含有している。Alkaloid である BBR は、口腔がん細胞の MMP-2 および MMP-7 の活性を抑制し、口腔がん細胞の遊走を抑制する³⁵⁾。Luo らは、Flavonoid である BC が、HOK において NF- κ B、p38 MAPK および JNK のリン酸化を阻害することにより、LPS 誘導性の IL-6 および IL-8 の発現を有意に低下させることを報告している³⁶⁾。また配糖体である BC は β -glucuronidase に暴露することで、アグリコンである BCN に置換される。本研究では、BBR、BC、BCN、GL に着目し、HOK に与える抗 IL-1 α 産生作用について検討した。その結果、HST の抗 IL-1 α 産生作用には、Flavonoid である BCN、BC が関与していることが示唆された。BCN、BC はこれまでも HOK の IL-1 β 誘導性の PGE2 産生や COX-2 の発現を抑制することが指摘されているため、同報告で示された同じシグナル抑制機序をもって、抗 IL-1 α 産生作用に関与している可能性も十分に考えられる¹⁷⁾。

TLR1/2 アゴニストである Pam3CSK4 および TLR4 アゴニストである LPS によって惹起される炎症反応はこれら受容体の下流にある MyD88 のリン酸化および MAPK カスケードを介して NF- κ B などの転写因子を誘導することが知られ

ている。炎症の制御は、MAPK カスケードを中心に行われている。HST は MAPK シグナル経路に働きかけ、抗炎症作用を呈することが知られている。Kono らは、HOK 細胞を IL-1 β で刺激する培養系を用いて、HST 含有成分である flavonoid の Wogonin が p38 および JNK のリン酸化を阻害することにより、IL-1 β 誘導性の PGE2 産生を抑制することを報告した。著者らが見出した BCN、BC の活性も同様の機序を介して、IL-1 α の遺伝子発現誘導を抑制したと推測している。

Conclusion

HST は、HOK 細胞培養系において、細胞増殖能に影響を与えず、かつ hBD-1 産生レベルを維持する条件下で、炎症誘導性の IL-1 α の産生および遺伝子発現を濃度依存的に抑制していた。一方 DEX は同様に IL-1 α 産生抑制を呈するも、濃度依存的に細胞増殖能の低下や hBD-1 の産生を抑制していた。HST の抗 IL-1 α 産生作用には、Flavonoid である BCN、BC が関与していることが示唆された。これらの結果から、HST は口内炎等の口腔内の炎症疾患に対する治療薬として有用であることが示唆された。

Conflict of interest

株式会社ツムラから研究費支援および半夏瀉心湯エキスの供与を受けた。

Acknowledgement

本研究の実施にあたり、実施機会をいただきました元東徳洲会病院医学研究所
所長 河野透 (故人) 先生、また学位論文をまとめるにあたり、ご指導を頂きま
した株式会社ツムラ 金子 篤 先生、旭川医科大学 内科学講座 がんゲノム
医学部門 教授 水上裕輔 先生、東徳洲会病院医学研究所 副研究所長 小野裕介
先生、北海道大学 大学院 歯学院 口腔診断内科学教室 教授 北川 善政 先生に
深く感謝いたします。また常に建設的なご意見をいただきました、東徳洲会病院
医学研究所のメンバーに御礼申し上げます。

Reference

- 1) Williams DM. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. Respir Care. 2018
Jun;63(6):655-670.

- 2) Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis.* 2002 Jan;8(1):23-9.
- 3) Gomes Pde S, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jan;39(1):1-9.
- 4) Niu JY, Yin IX, Mei ML, Wu WKK, Li QL, Chu CH. The multifaceted roles of antimicrobial peptides in oral diseases. *Mol Oral Microbiol.* 2021 Jun;36(3):159-171.
- 5) Bick RJ, Poindexter BJ, Buja LM, Lawyer CH, Milner SM, Bhat S. Nuclear localization of HBD-1 in human keratinocytes. *J Burns Wounds.* 2007 Aug 24;7:e3.
- 6) Zhu BD, Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang BY. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2003 Sep;24(9):907-12.
- 7) Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ. Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des.* 2007;13(30):3131-9.

- 8) Bucekova M, Sojka M, Valachova I, Martinotti S, Ranzato E, Szep Z, Majtan V, Klaudiny J, Majtan J. Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2017 Aug 4;7(1):7340.
- 9) Bolatchiev A, Baturin V, Bazikov I, Maltsev A, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains in vitro and in vivo. *Fundam Clin Pharmacol.* 2020 Feb;34(1):102-108.
- 10) Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med.* 2003 Nov;32(10):586-94.
- 11) Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Saha DR, Mukhopadhyay D, Roychowdhury S, Hamabata T, Takeda Y, Das S. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2008 Dec;10(12):2520-37.
- 12) Nagao Y, Hashimoto K, Sata M. Candidiasis and other oral mucosal lesions during and after interferon therapy for HCV-related chronic liver diseases. *BMC Gastroenterol.* 2012 Nov 2;12:155.

- 13) Muzyka BC, Glick M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. J Am Dent Assoc. 1995 Jan;126(1):63-72.
- 14) Hibi S, Ina K, Furuta R, Kataoka T, Kojima S, Kawai M. [Clinical effects of Hange-shashin-to on combination therapy of S-1/irinotecan against the for patients with metastatic gastric and colorectal cancer]. Gan To Kagaku Ryoho. 2009 Sep;36(9):1485-8.
- 15) Mori K, Kondo T, Kamiyama Y, Kano Y, Tominaga K. Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2003 May;51(5):403-6.
- 16) Kono T, Satomi M, Chisato N, Ebisawa Y, Suno M, Asama T, Karasaki H, Matsubara K, Furukawa H. Topical Application of Hangeshashinto (TJ-14) in the Treatment of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. World J Oncol. 2010 Dec;1(6):232-235.
- 17) Kono T, Kaneko A, Matsumoto C, Miyagi C, Ohbuchi K, Mizuhara Y, Miyano K, Uezono Y. Multitargeted effects of hangeshashinto for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis on inducible prostaglandin E2 production in human oral keratinocytes. Integr Cancer Ther. 2014 Sep;13(5):435-45.

- 18) Miyano K, Eto M, Hitomi S, Matsumoto T, Hasegawa S, Hirano A, Nagabuchi K, Asai N, Uzu M, Nonaka M, Omiya Y, Kaneko A, Ono K, Fujii H, Higami Y, Kono T, Uezono Y. The Japanese herbal medicine Hangeshashinto enhances oral keratinocyte migration to facilitate healing of chemotherapy-induced oral ulcerative mucositis. *Sci Rep.* 2020 Jan 17;10(1):625.
- 19) Fukamachi H, Matsumoto C, Omiya Y, Arimoto T, Morisaki H, Kataoka H, Kadena M, Funatsu T, Fukutake M, Kase Y, Kuwata H. Effects of Hangeshashinto on Growth of Oral Microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:512947.
- 20) Yamakawa J, Motoo Y, Moriya J, Ogawa M, Uenishi H, Akazawa S, Sasagawa T, Nishio M, Kobayashi J. Significance of Kampo, traditional Japanese medicine, in supportive care of cancer patients. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:746486.
- 21) Yutaka Shimada. Adverse Effects of Kampo Medicines, *Internal Medicine*, 2022, 61: p. 29-35
- 22) Yamakawa J, Motoo Y, Moriya J, Ogawa M, Uenishi H, Akazawa S, Sasagawa T, Nishio M, Kobayashi J. Significance of Kampo, traditional Japanese medicine, in

supportive care of cancer patients. Evid Based Complement Alternat Med.

2013;2013:746486.

- 23) Zhang X, Kohli M, Zhou Q, Graves DT, Amar S. Short- and long-term effects of IL-1 and TNF antagonists on periodontal wound healing. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):3514-23.
- 24) Graves DT, Nooh N, Gillen T, Davey M, Patel S, Cottrell D, Amar S. IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. J Immunol. 2001 Nov 1;167(9):5316-20.
- 25) Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol. 1997 Jan;24(1):72-7.
- 26) Dayan S, Stashenko P, Niederman R, Kupper TS. Oral epithelial overexpression of IL-1alpha causes periodontal disease. J Dent Res. 2004 Oct;83(10):786-90.
- 27) Holmlund A, Hånström L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol. 2004 Jun;31(6):475-82.
- 28) Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Candida albicans triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. Microb Pathog. 2003 Apr;34(4):169-77.

- 29) Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8542-9.
- 30) Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Reich R, Martini M, Allam JP, Novak N, Bergé S, Jepsen S, Winter J. Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jul;37(7):660-3.
- 31) Warrington TP, Bostwick JM. Psychiatric adverse effects of corticosteroids. *Mayo Clin Proc.* 2006 Oct;81(10):1361-7.
- 32) Williams DM. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care.* 2018 Jun;63(6):655-670.
- 33) Jainkittivong A, Kuvatanasuchati J, Pipattanagovit P, Sinheng W. Candida in oral lichen planus patients undergoing topical steroid therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Jul;104(1):61-6.
- 34) Lu Q, Jayatilake JA, Samaranayake LP, Jin L. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human beta-defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol.* 2006 Sep;126(9):2049-56.

- 35) Seo YS, Yim MJ, Kim BH, Kang KR, Lee SY, Oh JS, You JS, Kim SG, Yu SJ, Lee GJ, Kim DK, Kim CS, Kim JS, Kim JS. Berberine-induced anticancer activities in FaDu head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015 Dec;34(6):3025-34.
- 36) Luo W, Wang CY, Jin L. Baicalin downregulates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-upregulated IL-6 and IL-8 expression in human oral keratinocytes by negative regulation of TLR signaling. *PLoS One.* 2012;7(12):e51008.

Tables

Table.1 Primer sequences used in real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Primer Sequences (5'-3')		
β-actin	Forward	GTCTTCCCCTCCATCGTG
	Reverse	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
β-defensin 1	Forward	GTCTGAGATGGCCTCAGGTG
	Reverse	CACTTGGCCTTCCCTCTGTA
Interleukin-1α	Forward	ACGGGAAGGTTCTGAAGAAGAG
	Reverse	GGAAGCTAAAAGGTGCTGACC

Figure legends

Figure 1. The time course of the experiments in this study.

Human oral keratinocytes (HOK) was seeded at 1.0×10^5 in 12 well-plates or 0.5×10^5 in 24-well plates, and precultured for 24 h. Test sample such as Hangeshashinto (HST), dexamethasone (DEX), or vehicle was added to the culture. After additional 24 h cultivation, inflammatory stimulant (Pam3CSK4 or LPS) was added to the culture. The culture supernatants and total RNAs were collected 24 h later, leading to measurements of protein and mRNA levels of interleukin-1 α (IL-1 α) and human β -defensin 1 (hBD-1).

Figure 2. Cell growth activity.

HOK cells were seeded at 1.0×10^4 /well in 96 multiwell-plates, and cultured 24 or 48 h in presence of the indicated concentrations of HST (A) or DEX (B). Cell growth activity was measured by the XTT method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. *, **: $P < 0.05, 0.01$, followed by the Dunnett's test.

Figure 3. Effect of HST and DEX on IL-1 α production induced by stimulation with Pam3CSK and LPS.

HST (A, B, C) and DEX (D, E, F) were evaluated according to the protocol described previously. Pam3CSK4 (B, E; final concentration: 0.1 μ g/mL), LPS (C, F; final concentration: 1 μ g/mL), or vehicle (A, D) was added the culture. The amount of IL-1 α in the culture fluids was quantified by ELISA method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. *, **: $P < 0.05, 0.01$, followed by the Dunnett's test. † Significant at the Student's t -test ($P < 0.05$).

Figure 4. Effect of HST and DEX on hBD-1 production induced by stimulation with Pam3CSK and LPS.

HST (A, B) and DEX (C, D) were evaluated according to the protocol described previously. Pam3CSK4 (A, C; final concentration: 0.1 μ g/mL), or LPS (B, D; final concentration: 1 μ g/mL) was added the culture. The amount of hBD-1 in the culture fluids was quantified by ELISA method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. *, **: $P < 0.05, 0.01$, followed by the Dunnett's test.

Figure 5. Effect of HST on mRNA expression of IL-1 α and hBD-1.

HST (100 μ g/mL) was evaluated according to the protocol described previously.

Pam3CSK4 (final concentration: 0.1 μ g/mL) was added the culture. The mRNAs of IL-1 α and hBD-1 in the HOK cells were measured by quantitative PCR method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. $\dagger$: $P < 0.05$, followed by the Student *t*-test.

Figure 6. The 3D-HPLC profile of Hangeshashinto (HST).

Yamakawa J., et al. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 746486.

Figure 7. Identification of active ingredient of HST on inhibition of IL-1 α production in stimulated HOK cells.

The representative four ingredients of HST, baicalein, baicalin, glycyrrhizin, or berberine, were evaluated at a concentration of 30 μ M according to the protocol described previously. Pam3CSK4 (final concentration: 0.1 μ g/mL) was added the culture. The amount of IL-1 α in the culture fluids was quantified by ELISA method.

Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. **: $P < 0.01$, followed by the Dunnett's test.

Supplemental data

Supplemental data-1

No effect of HST on mRNA expression of antimicrobial peptides in non-stimulated HOK cells.

HST (100 μ g/mL) was added to the culture of non-stimulated HOK cells. After cultivation for additional 24 h, the mRNAs of hBD-1, hBD-2, hBD-3, adrenomedullin, S100A7, and S100A9 were measured by quantitative PCR method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3.

Supplemental data-2

Effect of HST and DEX on IL-8 production induced by stimulation with Pam3CSK.

HST (A) and DEX (B) were evaluated according to the protocol described previously.

Pam3CSK4 (final concentration: 0.1 μ g/mL), or vehicle was added the culture. The amount of IL-8 in the culture fluids was quantified by ELISA method. Data are shown as mean $\pm$ standard error. N=3. *, **: $P < 0.05, 0.01$, followed by the Dunnett's test.

Supplemental data-3

Effect of HST on TNF- α production induced by stimulation with LPS.

HST(100 μ g/mL) was evaluated according to the protocol described previously. LPS

(final concentration: 1 μ g/mL) was added the culture. The amount of TNF- α in the

culture fluids was quantified by ELISA method. Data are shown as mean $\pm$ standard

error. N=3. †: Significant at the Student's *t*-test ($P < 0.05$).

Figure 1

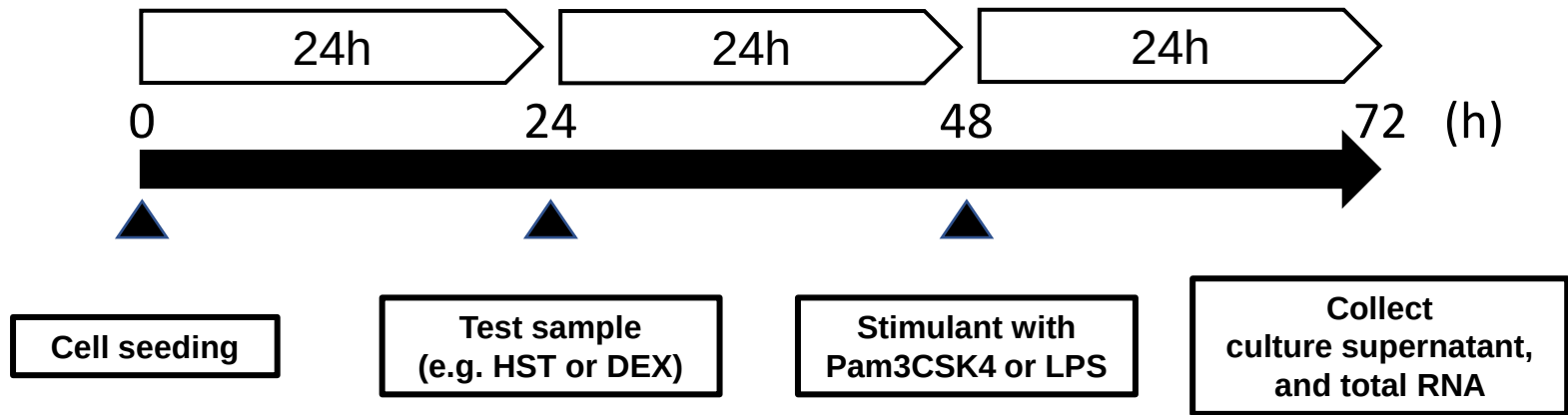
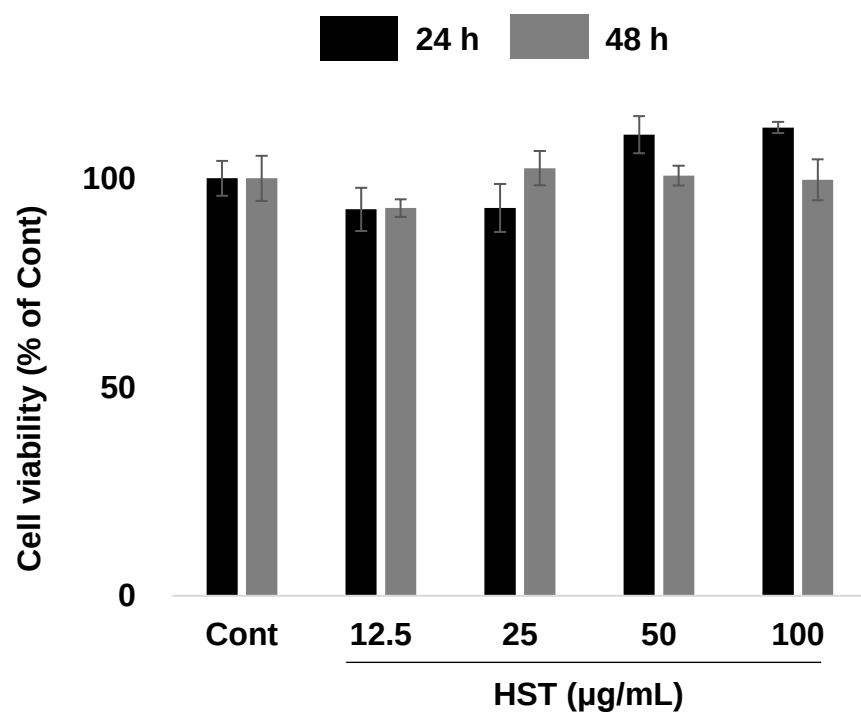


Figure 2

A.



B.

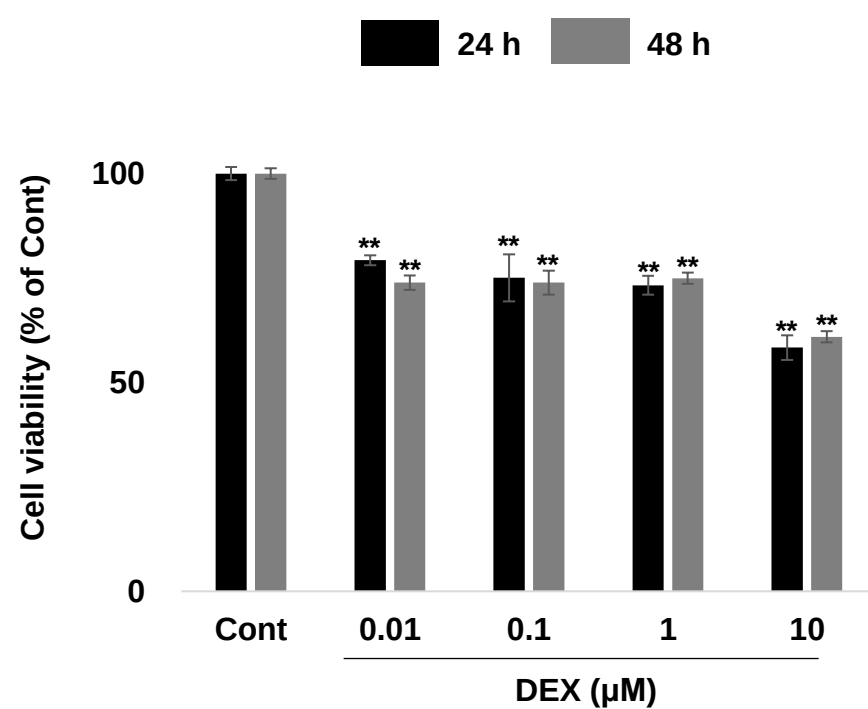
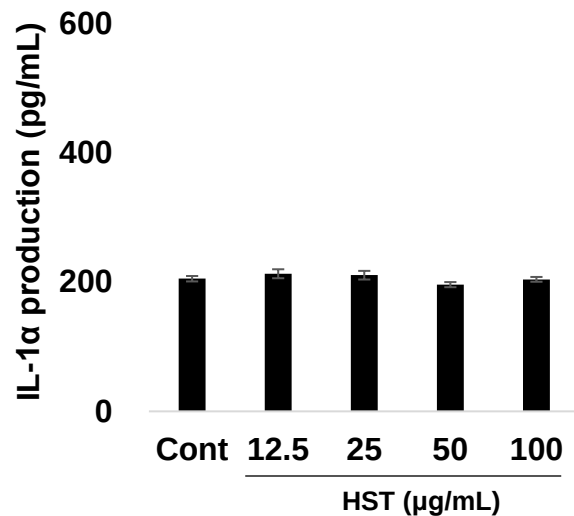
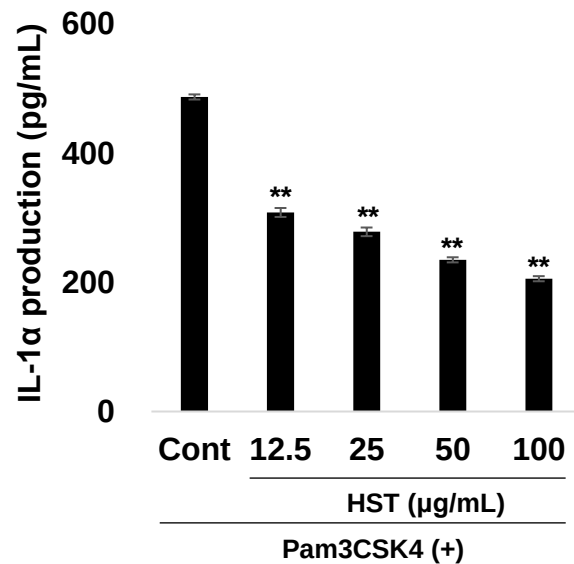


Figure 3

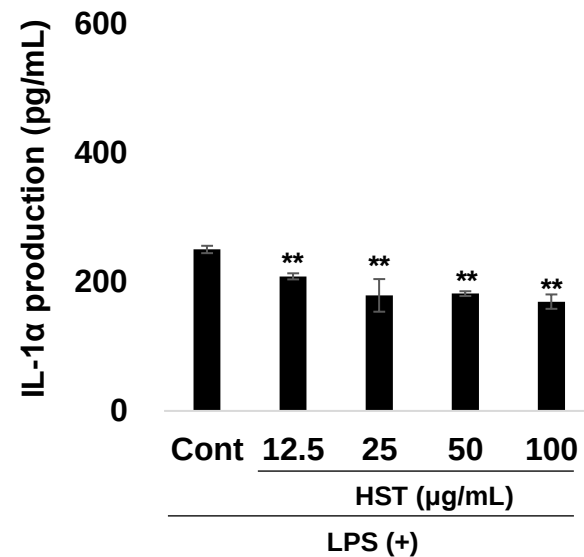
A.



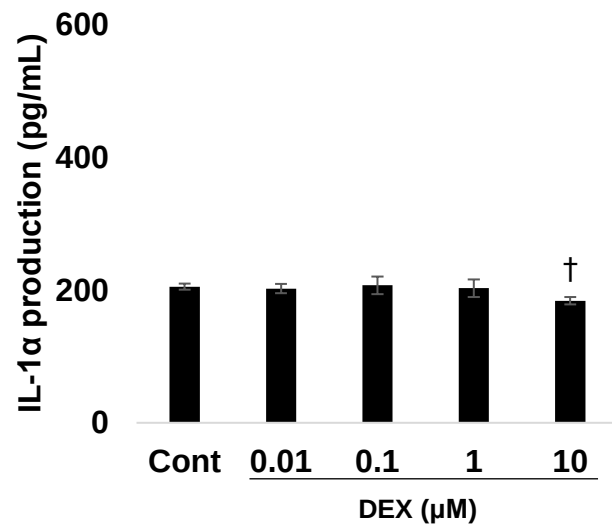
B.



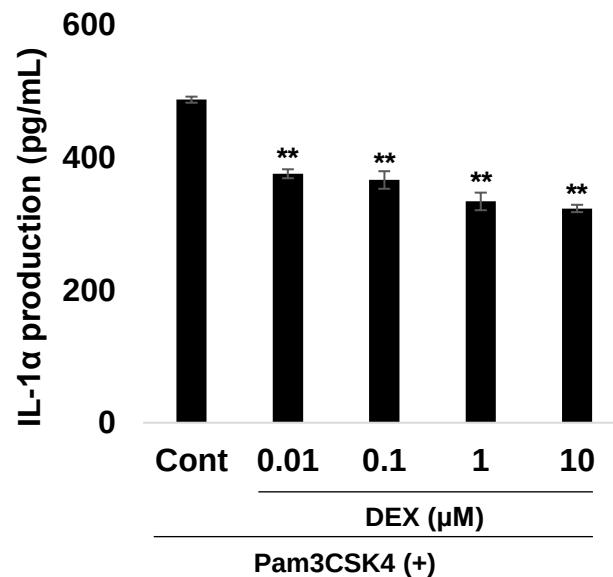
C.



D.



E.



F.

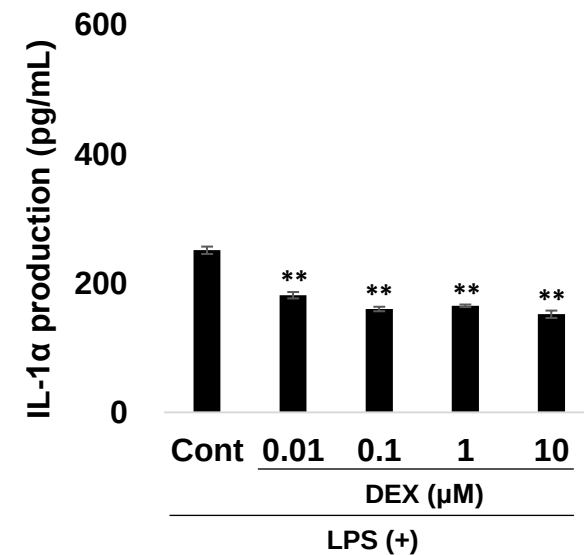
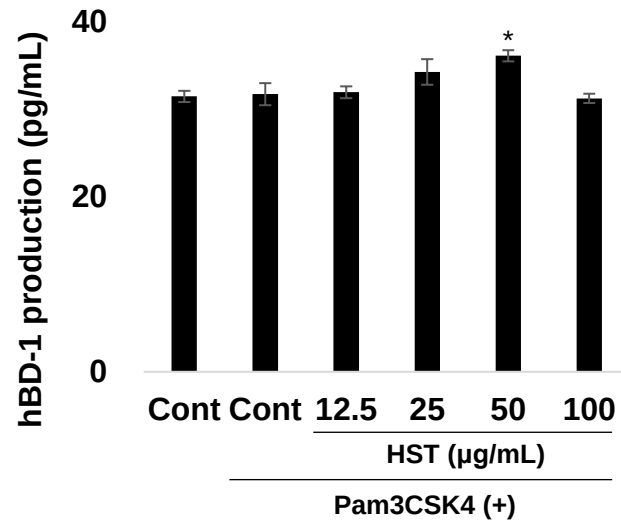
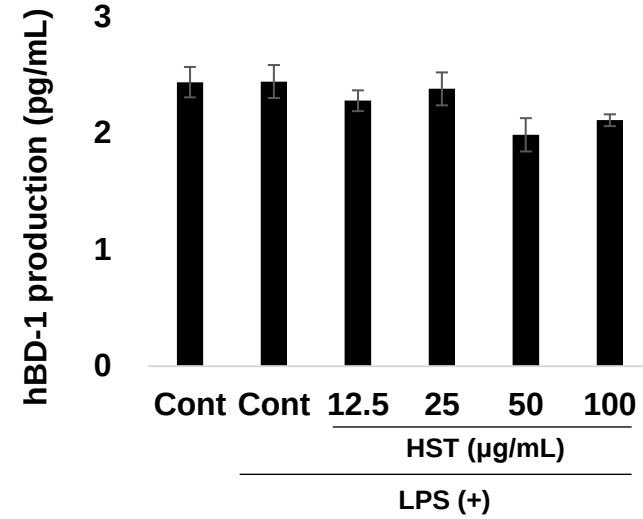


Figure 4

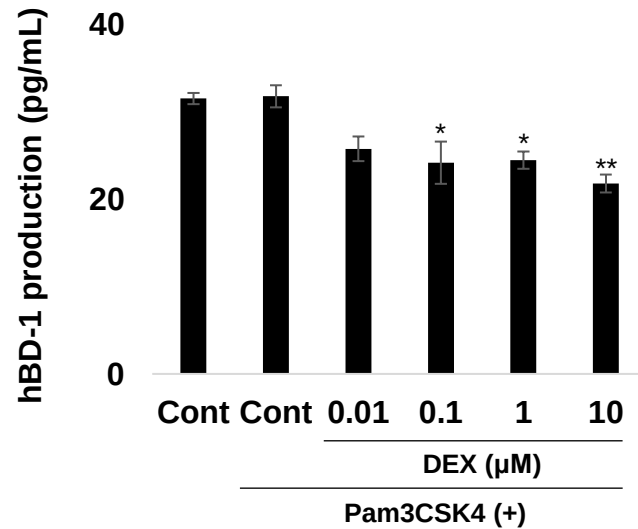
A.



B.



C.



D.

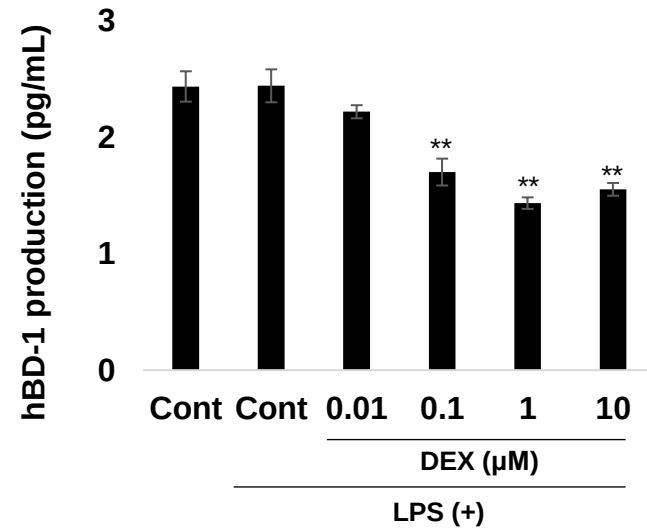
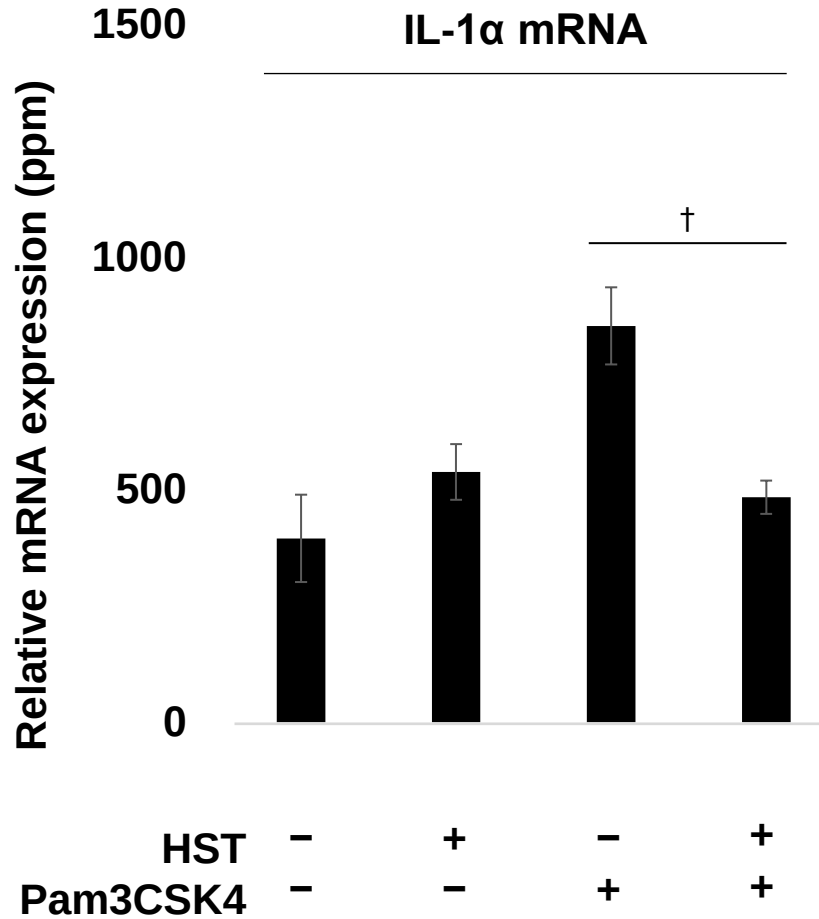


Figure 5

A.



B.

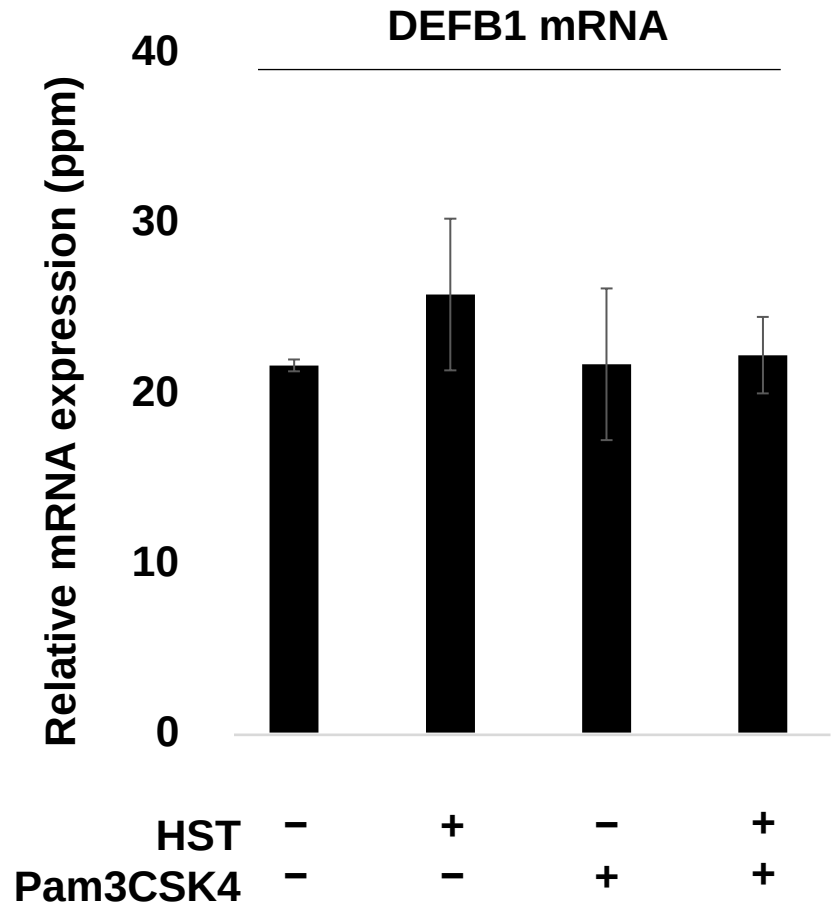


Figure 6

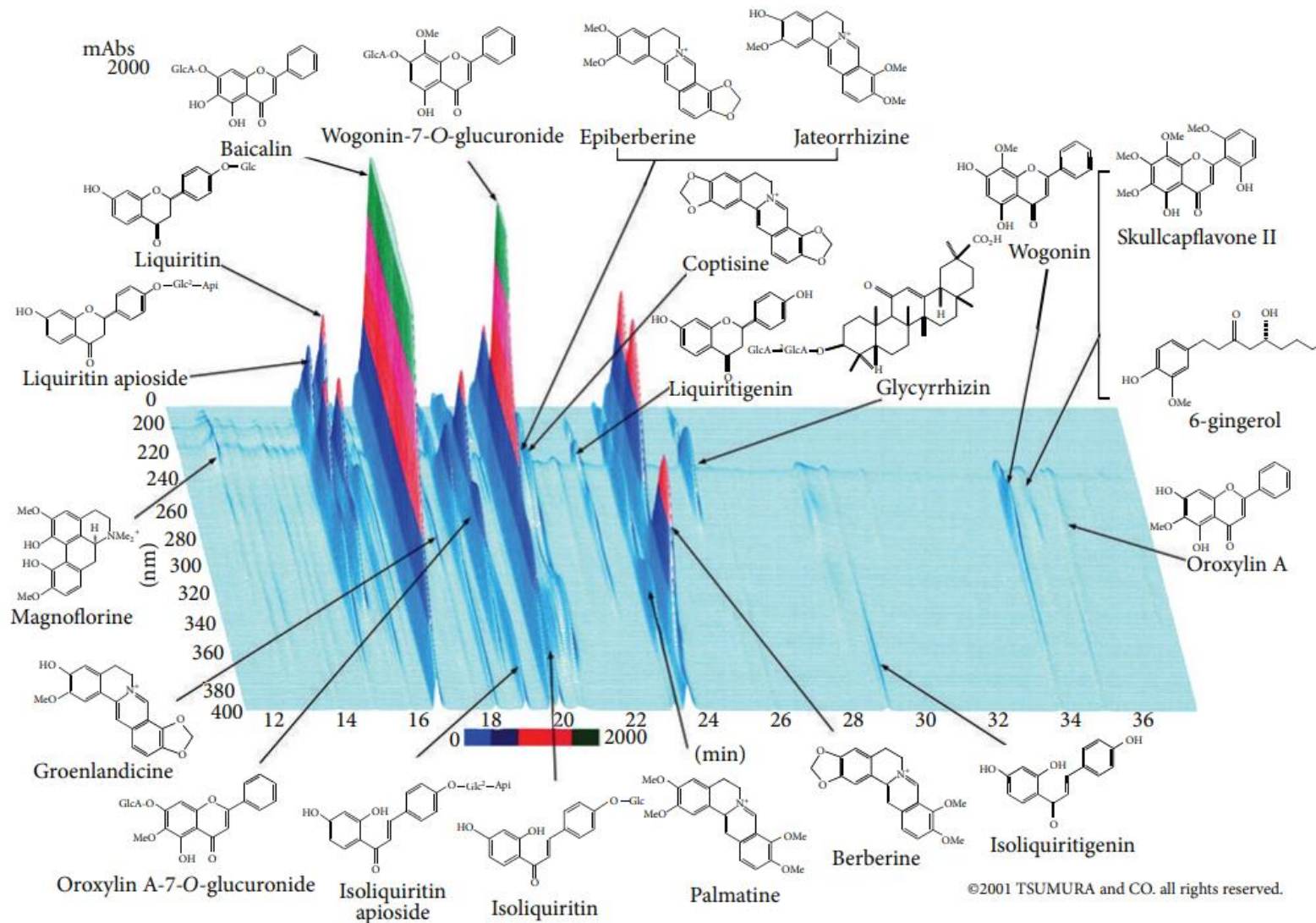
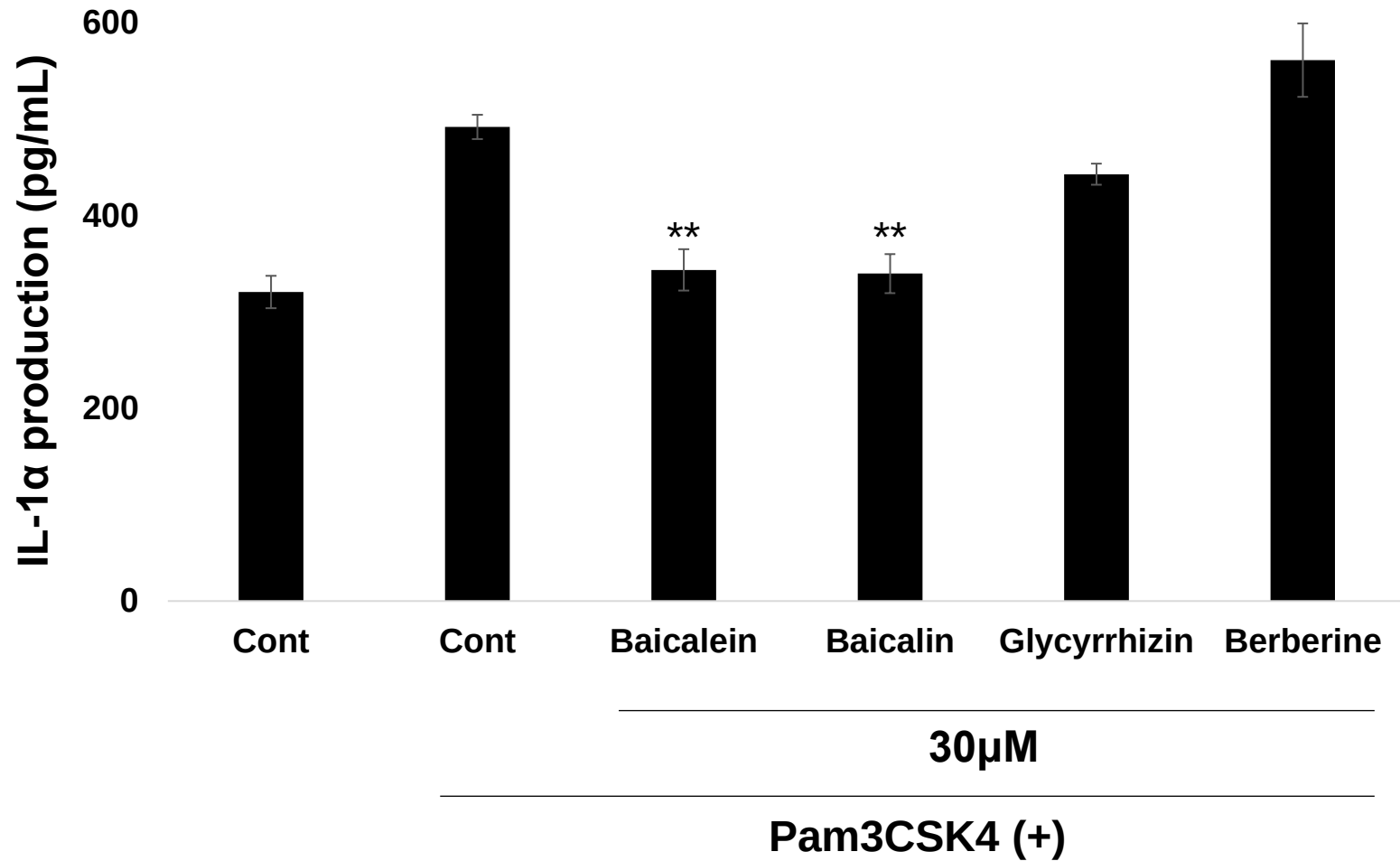
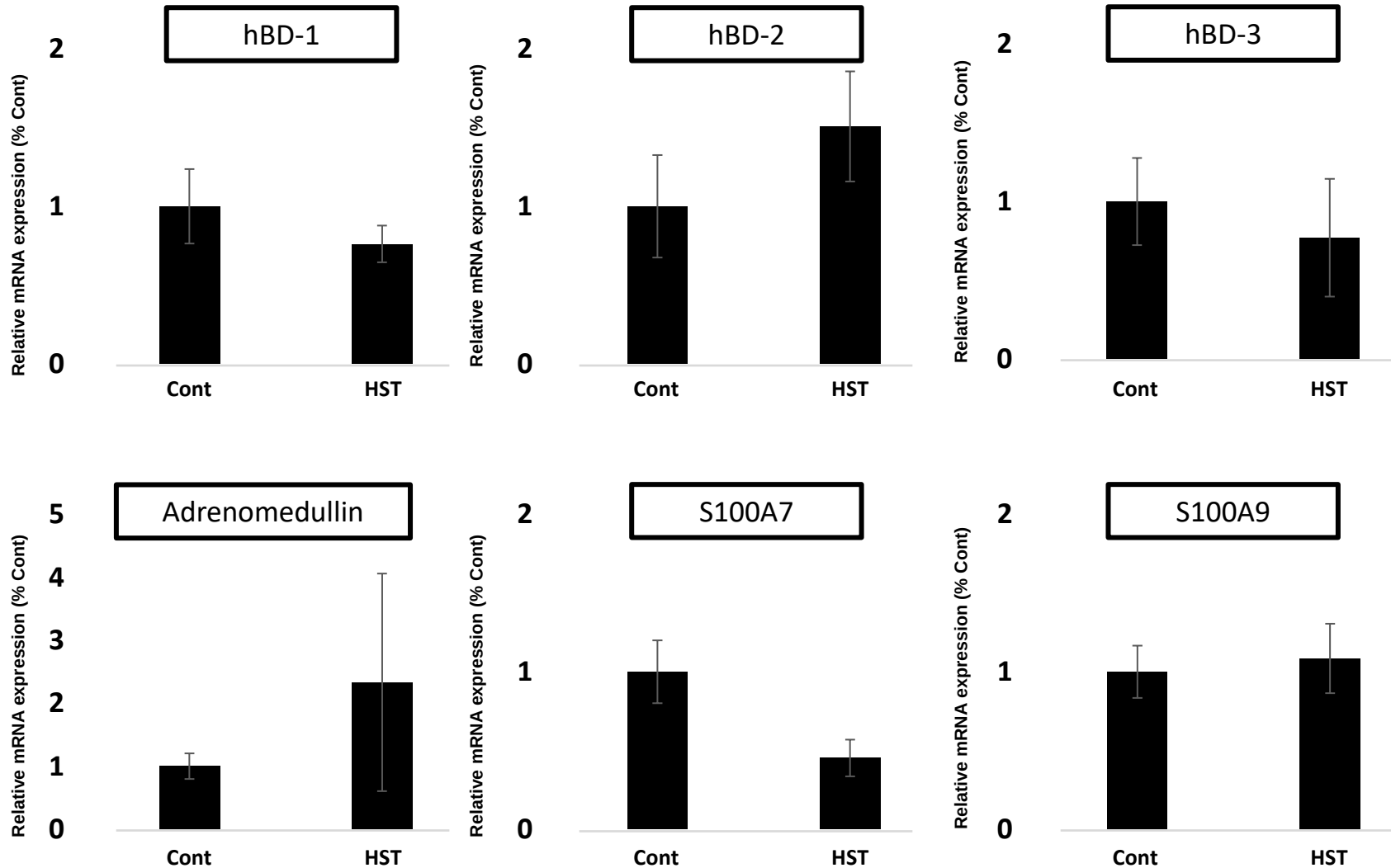


Figure 7

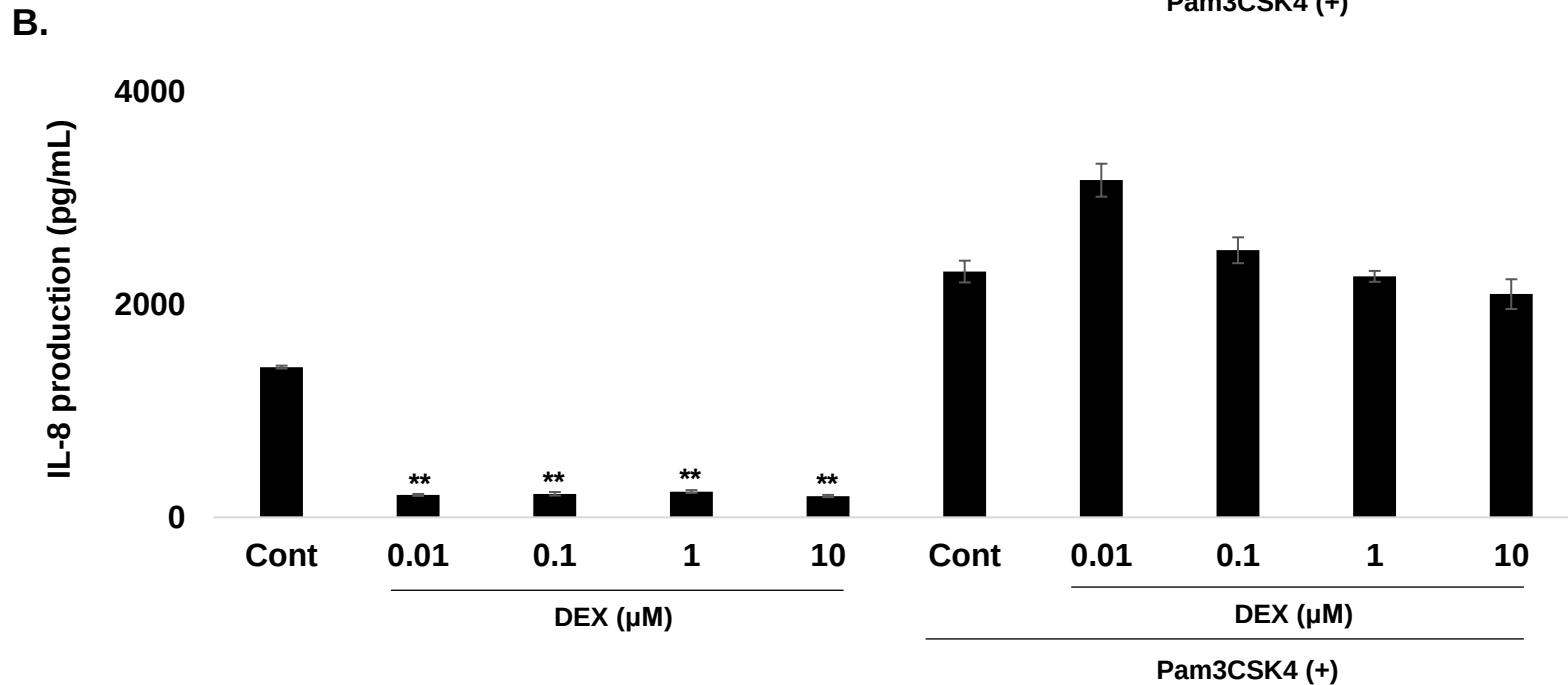
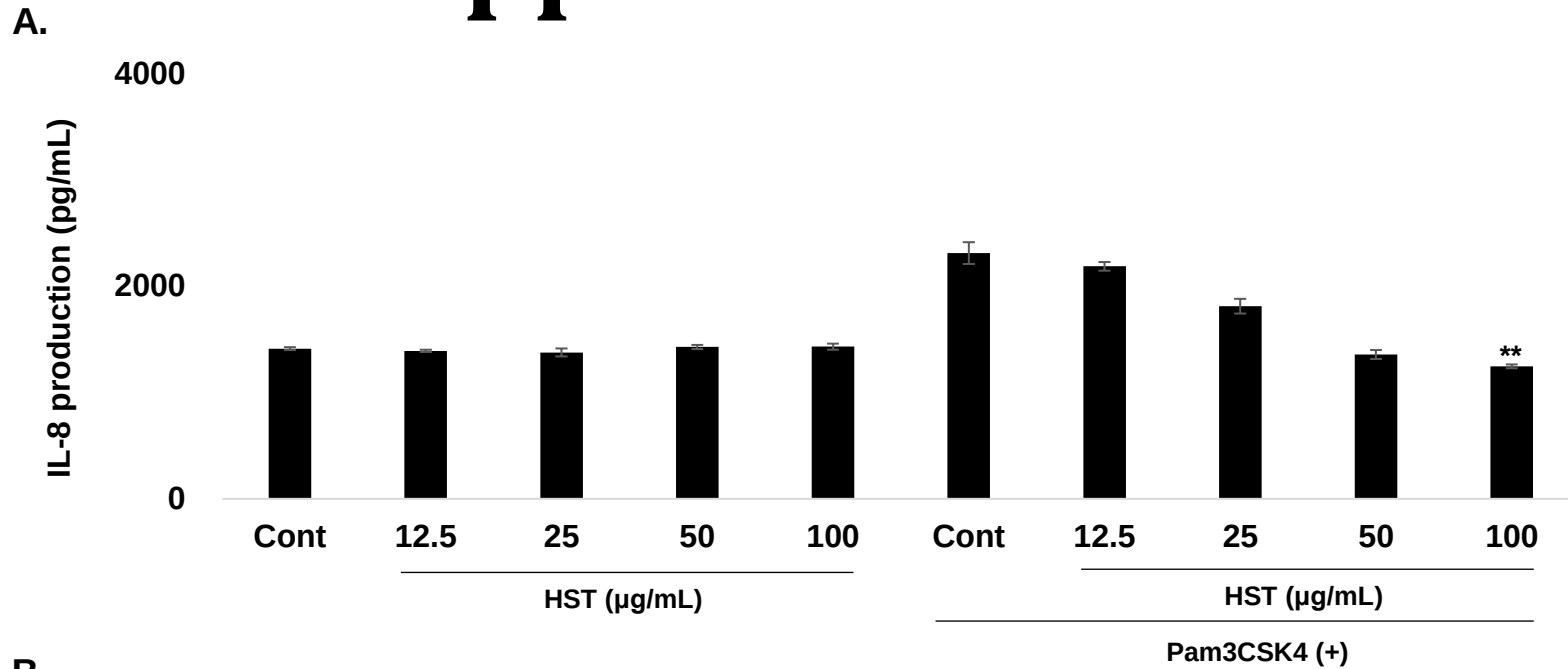


Supplemental data

Supplemental data 1



Supplemental data 2



Supplemental data 3

