

# 論 文 内 容 要 旨

Anti-inflammatory effect of glycyrrhizin with

*Equisetum arvense* extract

(グリチルリチン酸とスギナ抽出物による

抗炎症効果)

Odontology,109(2):464-473,2021,

doi:10.1007/s10266-020-00563-3.

指導教員：宮内 睦美 教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

芝 典江

## 【緒言】

歯周炎は、進行性の骨破壊を伴う感染性／炎症性疾患で、宿主防御反応として産生されるTNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインが発症や進行に重要な役割を担う。したがって、歯周炎発症予防や病態進行の抑制には、炎症性サイトカインを適切に制御する必要がある。

甘草から抽出されるグリチルリチン酸（GL）は、抗炎症作用を有する成分として汎用されており、歯周病原細菌由来のlipopolysaccharide（LPS）によるTNF- $\alpha$ 産生を抑制するが、その添加量には制限がある。そこで本研究では、はじめにGLの抗炎症効果を増強する植物抽出物の探索と、その増強機序の解明を行った。次に、探索研究で見出したスギナ抽出物（EA）の破骨細胞性骨吸収抑制効果を調べた。

## 実験1. GLの抗炎症効果を増強する植物抽出物の探索と増強機序の解明

### (1) THP-1細胞を用いたGLの抗炎症効果を増強する植物抽出物の探索

GLの抗炎症効果を増強する植物抽出物の探索を目的とし、PMA刺激THP-1細胞（マクロファージ）を、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.)-LPS または *Porphyromonas gingivalis* (P.g.)-LPS で刺激し、6時間後の培養上清中に分泌されるTNF- $\alpha$ 量をELISA法にて測定した。なお、GL及び抗炎症効果が示唆されている6種類の植物抽出物はLPS刺激と同時に添加し、TNF- $\alpha$ 分泌抑制効果を比較検討した。GLとスギナエキス（EA）の併用（GL/EA）は、GL単独の抑制効果を相加的に有意に増強した。

### (2) 不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞（RT7細胞）を用いた抗炎症効果の評価

接合上皮（JE）やポケット上皮は歯周病原菌の侵襲に継続的にさらされ、炎症性サイトカインを産生することで第一防衛線として機能している。そこで、RT7細胞を用い、A.a.-LPS刺激によるTNF- $\alpha$ 産生に及ぼすGL/EA投与の影響について調べた。RT7細胞においてもGL/EAは、GL単独の抑制効果を相加的に有意に増強した。また、*Tnf $\alpha$* および*Il-6* mRNAの発現レベルをReal time PCR法により解析したところ、GL/EAではGL、EA単独投与と比較して、*Tnf $\alpha$* および*Il-6* mRNAレベルが低下する傾向を確認した。

### (3) LPS 誘導歯周炎モデルを用いた検証

LPS誘導歯周炎モデルラットを用い、GL/EAの併用効果を*in vivo*で検証した。本モデルでは、好中球浸潤と炎症性サイトカイン発現の経時変化が確立されている。PBSを歯肉溝に滴下したControl群では、投与2日後、JE内にわずかに好中球が観察される程度であったが、*Escherichia coli* (E.coli)-LPSを滴下したLPS群では、JE内の好中球が増加し、LPS/GL群及びLPS/GL/EA群ではLPS群と比較し減少する傾向が見られた。中でもLPS/GL/EAはより効果的に抑制していた。免疫組織化学的にTNF- $\alpha$  は、Control群のJE細胞ではほとんど見られなかったが、LPS群のJE細胞はTNF- $\alpha$ 強陽性を呈した。一方、LPS/GL、LPS/EA、

LPS/GL/EA群では、TNF- $\alpha$ 発現は顕著に減少した。さらに、LPS投与3時間後の歯肉組織における*Tnf- $\alpha$*  mRNA発現量は、LPS群と比較し、LPS/GL、LPS/EA、LPS/GL/EA群で低下し、特にLPS/GL/EA群の発現低下は顕著であった。

#### (4) NF- $\kappa$ B p65およびMAPKのリン酸化抑制作用の検討

NF- $\kappa$ B p65、JNK、p38は、炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たしている。そこで、*A.a.*-LPS 刺激RT7細胞におけるシグナル伝達経路の活性化に対するGLとEAの作用をウエスタンブロット法にて検討した。GLは、*A.a.*-LPSで活性化したNF- $\kappa$ B p65を強く抑制したが、JNKおよびp38は抑制しなかった。一方、EAは、JNKのリン酸化を強く抑制したが、NF- $\kappa$ B p65やp38のリン酸化は抑制しなかった。興味深いことに、GL/EAは、NF- $\kappa$ B p65とJNKだけでなく、p38のリン酸化をも抑制した。

### 実験2. 歯槽骨破壊に対するEAの作用の検討

#### (1) LPS誘導歯周炎モデルを用いた破骨細胞形成に及ぼす影響の検証

LPS誘導歯周炎モデルラットではLPS投与3日目に歯槽骨縁に沿って破骨細胞の有意な増加がみられる。そこで、cathepsin K 陽性破骨細胞数を計測したところ、EA投与によって、破骨細胞数はControl群と同程度まで有意に減少した。LPS群では歯周靭帯のRANKL発現が上昇し、OPG発現が減少した一方、LPS/EA群ではRANKLの発現上昇が抑制され、LPS刺激で低下したOPGの発現は、Control群よりも増強した。EAにはLPS刺激による破骨細胞形成を抑制する効果があることを発見した。

#### (2) 骨芽細胞系細胞による破骨細胞形成関連因子発現に対するEAの影響の検討

LPSによる破骨細胞形成は骨芽細胞系細胞によって制御されている。そこで、*E.coli*-LPS刺激によるマウス骨髄間質細胞（ST2細胞）の破骨細胞形成関連因子発現に対するEAの影響をReal time PCR法で解析した。LPS刺激後、破骨細胞形成促進因子（*Rankl*、*Tnf- $\alpha$* および*Il-6*）の発現は上昇した。一方、LPS/EAでは、それらの上昇が抑制された。LPS刺激による破骨細胞形成抑制因子（*Opg*）の発現低下は、LPS/EAでは回復し、*Opg* はむしろControl群より増強していた。また、培養上清中のOPG産生量はEA投与で増加していた。

#### 【結論】

以上の結果より、GLとEAはそれぞれ、LPSにより誘導されるNF- $\kappa$ B p65およびJNKのリン酸化の抑制を介して、TNF- $\alpha$ 発現を相加的に抑制することが示された。また、EAには、LPS刺激によるRANKLと炎症性サイトカインの発現増加を抑制し、OPGの発現抑制を回復させて、破骨細胞形成を減少させ、歯槽骨破壊を制御する新しい機能があることを発見した。本研究から、GLとEAを併用した新しい歯周炎の予防/治療製品開発の可能性が示唆された。