

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	芝典江
学位授与の条件	学位規則第4条第1・②項該当		
論文題目 Anti-inflammatory effect of glycyrrhizin with <i>Equisetum arvense</i> extract (グリチルリチン酸とスギナ抽出物による抗炎症効果)			
論文審査担当者			
主査	教授 吉子 裕二	印	
審査委員	教授 太田 耕司		
審査委員	教授 水野 智仁		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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-<math>\alpha</math>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。</p> <p>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リポ多糖（LPS）によるTNF-<math>\alpha</math>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。</p> <p>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</p> <p>(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 (Phorbol 12-myristate 13-acetate)刺激THP-1細胞（マクロファージ）を，<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A.a.)-LPS または <i>Porphyromonas gingivalis</i> (P.g.)-LPS で刺激し，培養上清中のTNF-<math>\alpha</math>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-<math>\alpha</math>分泌抑制効果を比較検討した。GLと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。</p> <p>(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-<math>\alpha</math>産生に及ぼすGL/EA投与の影響をELISAにて測定した。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，<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>および<i>Il-6</i> mRNAの発現レベルをリアルタイムRT-PCR法により解析したところ，GL/EAでは各単独投与と比較して，<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>および<i>Il-6</i> mRNAレベルの低下傾向がみられた。</p> <p>(3) LPS 誘導歯周炎モデルラットを用いたGL/EAの併用効果の検証 PBSを歯肉溝に滴下したコントロール群では，投与2日後，JE内に好中球がわずかに観察される程度であった。GLあるいはGL/EA投与は，<i>Escherichia coli</i> (E.coli)-LPSの誘導するJE内の好中球の増加を減少させる傾向を示した。中でもGL/EA投与はより効果的に抑制していた。コントロール群では免疫組織化学的にTNF-<math>\alpha</math>弱陽性のJE細胞が僅かに見</p>			

られたが、LPS群ではTNF- $\alpha$ 強陽性を呈した。一方、LPS/GL, LPS/EA, LPS/GL/EA群では、TNF- $\alpha$ 陽性細胞は顕著に減少した。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の作用をウェ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を特異的に強く抑制したが、EAは、JNKのリン酸化のみを強く抑制した。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誘導歯周炎モデルラットを用いた破骨細胞形成に及ぼす影響の検証

LPS投与群では、投与3日目に歯槽骨縁に沿ってカテプシンK 陽性破骨細胞が有意に増加した。EA投与により、破骨細胞数はコントロール群と同程度まで減少した。また、免疫組織化学的に、LPS群では歯周靭帯のRANKL (Receptor activator of NF- $\kappa$ B)発現が上昇し、OPG (Osteoprotegerin)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、コントロール群よりも増強した。

#### (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の影響をリアルタイムRT-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*Il6*) 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* はむしろコントロール群より増強していた。また、ELISA法で測定した培養上清中のOPG産生量はEA投与で増加していた。

以上より、GLとEAはそれぞれ、LPSにより誘導されるNF- $\kappa$ B p65およびMAPK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。

以上の結果から、本論文は歯周病学をはじめとする歯科医学の発展に寄与するところが大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が芝典江に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。