

論文内容要旨

Anti-Inflammatory Effects of Geniposidic Acid on *Porphyromonas gingivalis*-Induced Periodontitis in Mice

(*Porphyromonas gingivalis* 誘導歯周炎モデルマウス対する

ゲニポシド酸の抗炎症効果についての研究)

Biomedicines, 10(12), 3096, 2022.

主指導教員：水野 智仁教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：米田 真康教授

(医系科学研究科 糖尿病・生活習慣病予防医学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(医系科学研究科 歯髓生物学)

田村 哲也

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

歯周炎は慢性感染症である。原因菌の1つとして *Porphyromonas gingivalis* (以下 P.g) が知られており、莖膜、線毛、リポポリサッカライド (LPS)、ジンジパインといった病原因子を有する。歯肉上皮細胞は歯周病原細菌の侵襲に対して炎症性サイトカインを産生し、第一の防衛ラインとして機能する。炎症に伴い破骨細胞が活性化し、骨吸収が認められ、最終的に歯牙喪失、咀嚼障害となる。近年、P.g 感染が、非アルコール性肝炎、関節リウマチ、早産、アルツハイマー型認知症などの全身疾患に影響することが報告されている。全身疾患を持つ高齢者にはセルフケアが困難な場合があり、歯周炎の簡便な予防方法が必要である。

植物由来成分は副作用が少なく高い安全性を持ちながら、抗炎症効果を示すものがある。杜仲に含まれる天然成分のゲニポシド酸 (GPA) は古くから薬剤として使用されていた。これまでの研究により、GPA には抗炎症作用、抗動脈硬化作用、抗神経変性作用など様々な薬理作用があることが明らかにされている。GPA は口腔から摂取されるが、口腔粘膜への作用は報告されていない。そこで、ヒト歯肉上皮細胞もしくは P.g 感染歯周炎モデルマウスに GPA を作用させ、抗炎症効果について検討することを目的として研究を行った。

【材料と方法】

1.細胞培養と P.g によるヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の刺激

HGEC を P.g (10% formalin-fixed, strain 33277) (10^7 CFU/mL) で 12 時間刺激し mRNA の発現を検討した。陰性対照として HGEC を細菌刺激せずに培養した。骨髄由来単核細胞 (BMMCs) は、C57BL/6J Jcl マウスの大腿骨および脛骨から Histopaque-1083 を用いた比重遠心法で採取した。

2.RNA 発現と解析

HGEC または BMMCs を刺激後、RNA を精製し、real-time PCR にて IL-6、TLR2、OSCAR、NFATc1、c-Fos、cathepsin K、MMP-9、DC-STAMP の mRNA 発現量を β -actin を内因性コントロールとして検討した。

3.リン酸化タンパク質の検出

HGEC におけるリン酸化タンパク質測定を ELISA 法で行った。リン酸化タンパク質量を各サンプルについて無刺激群に対する比率で検討した。

4.P.g 誘導歯周炎モデルマウスの作製

C57BL/6J Jcl マウス (8 週齢) を、4 群 (1 群 6 匹、 $n=6$ 、非刺激群: カルボキシメチルセルロース (CMC) 経口投与、GPA 群: GPA 経口投与、P.g 群: P.g 感染、P.g/GPA 群: GPA 経口投与および P.g 感染)。P.g は、2% CMC 溶液に 10^8 菌/50 μ L を週 2 回、6 週間接種した。同量の CMC 溶液をネガティブコントロールとした。また、GPA (2% CMC 中 50mg/50 μ L) の経口投与は P.g または CMC 投与の 30 分前に行った。

5. マウスにおける歯槽骨量の評価

上顎骨を採取し、メチレンブルー染色後、顕微鏡下で露出根面の長さを測定した。CMC 群の面積に対する各群の歯槽骨吸収面積の比を Kawai' s method で算出した。

6. 歯周組織の評価

マウスの上顎組織を採取し 4%パラホルムアルデヒドで 48 時間保持し、10%エチレンジアミン四酢酸溶液で 14 日間脱灰後、パラフィンに包埋した。組織切片 (7 μ m 厚) をヘマトキシリン・エオジン染色、各群の組織像から炎症スコアを算出した。

7. HGECs 上清、マウス血清中および歯周組織中の IL-6 の検出

非刺激群、GPA 群、P.g 群および P.g/GPA 群の HGEC 培養液上清を回収し、IL-6 含有量を ELISA 法で測定した。また、マウス上顎組織ホモジネートおよび血清中の IL-6 のレベルを ELISA 法で測定した。

8. ウェスタンブロッティング解析

HGEC またはマウス上顎歯肉における TLR2 の産生を抗 TLR2 モノクローナル IgG または抗 TLR2 ポリクローナル IgG で検出した。

9. 破骨細胞分化解析

BMMCs を 2×10^5 cells/well で 96-well プレートに播種した。BMMCs をマウス RANKL およびマウスマクロファージコロニー刺激因子とともに GPA 存在下で 7 日間培養して、破骨細胞分化への影響を TRAP 染色で評価した。

【結果と考察】

P. g 刺激により、HGEC において IL-6 の mRNA 発現の誘導とタンパクレベルでの産生増加が認められた。一方、GPA 添加により IL-6 産生は抑制された。また、P. g 刺激で HGEC の TLR2 産生が上昇したが、この上昇は GPA 添加により抑制された。P. g 刺激で p38、JNK、ERK リン酸化タンパク質が増加したが、GPA 添加により抑制された。これらの結果から GPA が mitogen-activated protein kinase リン酸化の低下を介して TLR2 を抑制し、IL-6 産生の抑制に影響していることが示唆された。

P.g 感染マウス歯周炎モデルにおける、歯槽骨吸収は、P.g 群では非刺激群に比べ増加したが、P.g/GPA 群ではその増加が抑制された。組織学的観察でも同様の傾向がみられた。歯周組織および血清中の IL-6 濃度は、P.g 群では非刺激群に比べ上昇した。この上昇は、P.g/GPA 群では抑制された。歯肉組織における TLR2 のウェスタンブロッティングにて検討すると、P.g/GPA 群では、P.g 群における TLR2 量の増加が抑制された。

GPA 添加したマウス BMMCs の破骨細胞数は、非添加に比べて減少した。BMMCs の破骨細胞分化関連遺伝子 (OSCAR、NFATc1、c-Fos、カテプシン K、MMP-9、DC-STAMP) の mRNA 発現は GPA 濃度依存的に抑制された。

以上のことから、GPA は歯肉組織における TLR2 を介した IL-6 産生を抑制すること、破骨細胞分化を抑制することで歯周炎抑制効果を示すことが示唆された。