

論 文 要 旨

Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing

〔 歯周組織治癒におけるエンドカンナビノイドシステムの関与 〕

小 菌 清 香

【序論および目的】

エンドカンナビノイドシステム (ECS) とは生体内マリファナ様脂質メディエーターである内因性カンナビノイド (現在アナンダマイド及び2-アラキドノイルグリセロールが同定されている) がその特異的レセプターである CB1、CB2 レセプターを介して生体におよぼす作用である。ECS は抗炎症作用や免疫作用など生体防御の調節機能をもつことが知られている。さらに小腸や肝臓、脊髄などにおいて ECS の組織治癒への関与も示唆されている。

歯周病は口腔内細菌により惹起される歯周組織破壊を伴う慢性炎症性疾患であり、近年では心血管障害や糖尿病などの全身性疾患の病態との関連が報告されている。したがって、治療後の歯周組織治癒のメカニズムを理解することは、重要であると思われる。一般的に歯周治療後の組織治癒には様々なサイトカインや成長因子が関与している。ECS に関する歯周組織における生理的役割については NF- κ B の経路阻害を介し歯周組織の炎症を調節していることが示されている。しかし、ECS の歯周組織治癒への関与については明らかにされていない。そこで、歯周組織の治癒における ECS の生理的な役割を解明することを本研究の目的とした。

【材料および方法】

本研究は鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会および鹿児島大学動物実験委員会の倫理審査承認のもと行った。

・歯周組織治癒過程における歯肉溝滲出液 (GCF) 中のカンナビノイド量測定

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院成人系歯科センター歯周病科外来に通院中の患者 (平均60.7歳、男性7名 女性3名 計10名) からGCFを採取した。GCFはペリオペーパーを用いて歯周外科処置前及び処置後3日、1、2週後に採取した。採取後、高速液クロマトグラフィーによりGCF中の2-アラキドノイルグリセロール (2-Ag) およびアナンダマイド (AEA) 量を測定した。

・ラット歯周創傷モデルにおける CB1、CB2 の発現

ラット (Wister 系、雄、12 週齢、n=4) の上顎第一臼歯近心に歯周組織欠損を作製した。術後 2 週目に屠殺し、組織切片を作製後免疫組織化学染色により CB1、CB2 レセプターの発現を調べた。

・ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) の培養

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院成人系歯科センター歯周病科に来院した歯周病患者 (平均61.3歳、女性3名) の歯周外科手術時に健康歯肉組織を採取し、HGFsを培養した。細胞は10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、5%CO₂-95% air中、37℃で培養した。実験には継代培養3~5代の細胞を用いた。

・細胞増殖測定

培養HGFs (6.0×10³ cells/well) を96 well microplate にて10%FBS含有DMEM培地で24時間培養後、0.5%FBS含有DMEMにて24時間starvationした。その後カンナビノイドレセプターアンタゴニスト (AM251;250nM、AM630;250nM) またはMEK、p38MAPK、PI3-Kシグナルインヒビター (U0126;500nM、SB203580;250nM、LY294002;500nM) の存在あるいは非存在下で1時間前処

理後、AEA (500nM)、カンナビノイドレセプターアゴニスト (CP55940; 100nM) で刺激し、24時間刺激後のHGFsの細胞増殖をBrdU ELISAキットを用いて測定した。

・スクラッチテスト

chamber slide上でコンフルエントに達したHGFs monolayerに200 μ lピペットチップの先端で直線的に擦過した。AM251 (250nM)、AM630 (250nM)、U0126 (500nM)、SB203580 (250nM)、LY294002 (500nM) の存在あるいは非存在下で1時間処理後、CP55940 (100nM) で24時間刺激した。擦過直後及びCP55940刺激24時間後に写真撮影し、創の閉鎖の割合を調べた。

・ウェスタンブロット分析

HGFs (0.5 \times 10⁶ cells/well) を径100mm 培養皿にて10%FBS含有DMEM培地で24時間培養後、0.5%FBS含有DMEMにて24時間starvationし、CP55940 (100nM) で7.5、15、30、60分刺激した。CP55940がERK、p38MAPKおよびAktのリン酸化に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて分析した。

・統計分析 一元配置分散分析 (One-way ANOVA) にて統計処理を行った。有意差をP<0.05とした。

【結果】

- 1) GCF中のAEA量は、歯周外科処置前66.2ng/site、外科処置3日後178ng/siteで、処置前と比較して処置3日後に有意に増加することが示された。
- 2) ラット創傷部の線維芽細胞、マクロファージ様細胞においてCB1、CB2陽性を認めた。
- 3) AEA刺激によるHGFsの有意な増殖が示され、CB1およびCB2アンタゴニストによりその作用が有意に抑制された。
- 4) CP55940刺激によりHGFsの創の閉鎖が有意に促進され、CB1およびCB2アンタゴニストによりその作用が有意に抑制された。
- 5) CP55940刺激により、ERK1/2、p38MAPK、Aktのリン酸化が誘導された。
- 6) CP55940刺激によるHGFsの増殖、スクラッチテストにおける創の閉鎖がMEK1/2、p38MAPK、PI3-Kのシグナルインヒビターにより抑制された。

【結論及び考察】

本研究では歯周組織創傷部において有意にAEAレベルが増加することを示した。最近の研究において、脊髄の損傷部位では受傷後早期におけるAEAレベル増加が認められ、脊髄損傷の治癒過程におけるAEAの関与が示唆されている。本実験も同様の結果を示していることからAEAが歯周組織の治癒過程に関与している可能性が考えられた。

ラット創傷部の肉芽組織内に限局して線維芽細胞及びマクロファージ様細胞において、CB1およびCB2レセプターの発現が認められた。このことから、カンナビノイドレセプターが結合組織の治癒に関与している可能性が考えられる。歯周病によって破壊された結合組織の再構築には線維芽細胞の増殖が必要不可欠である。このため、AEAがHGFs増殖に及ぼす影響を調べたところ、本研究ではAEAがCB1、CB2を介しHGFsの増殖を促進することが明らかとなった。また今回、創傷治癒の評価法としてスクラッチテストを用いた。CB1/CB2レセプターアゴニストがHGFsの創の閉鎖を促進した。これらのことからECSはHGFsの増殖調節を介して歯周組織治癒に関与する可能性が考えられる。加えて、CB1/CB2レセプターアゴニストによるHGFs増殖、創の閉鎖はERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktのシグナルインヒビターにより有意に抑制されたことにより、増殖のメカニズムとして、ERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktシグナル伝達経路を介している事が考えられる。

以上のことより、ECSはERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktシグナル伝達経路を介し、HGFs増殖を調節することにより歯周組織の治癒において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 394, No. 4, 928-933 2010年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 106 号	学位申請者	小菌 清香
審査委員	主査	鳥居 光男	学位
	副査	米澤 傑	副査
	副査	佐藤 友昭	副査

博士 (医学・歯学・学術)

松口 徹也

町頭 三保

Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing

(歯周組織治癒におけるエンドカンナビノイドシステムの関与)

エンドカンナビノイドシステム (ECS) は、生体内マリファナ様脂質メディエーターである内因性カンナビノイド (アラキドノイルエタノールアミン; アナンダマイド: AEA, 2-アラキドノイルグリセロール: 2-AG) および、その特異的レセプターであるカンナビノイドレセプター (CB1 レセプター, CB2 レセプター) により構成され、炎症反応、細胞増殖の調節作用、骨代謝、損傷組織の修復など様々な作用を有することが報告されている。歯周病は、歯周組織破壊を伴う口腔内の慢性感染症である。歯周病における ECS の作用については、アナンダマイドによる抗炎症作用、また植物由来のカンナビノイドによる骨吸収の抑制作用が報告されている。しかしながら歯周組織の治癒における ECS の役割はいまだ明らかにされていない、そこで学位申請者は ECS の損傷組織の修復作用に着目し、歯周組織治癒における ECS の関与を明らかにするために以下の点について解析した: 1. 歯周外科処置前後における歯肉溝浸出液 (GCF) 中の内因性カンナビノイド量の測定、2. 歯周組織創傷モデルにおける CB1 レセプター、CB2 レセプターの発現、3. AEA、あるいは CB1/CB2 レセプターアゴニスト (CP55940) による培養ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の細胞増殖、HGF monolayer scratch 創の閉鎖におよぼす影響とそのメカニズム。その結果、本研究で以下の知見が明らかになった。

- 1) 歯周外科処置後 3 日目において処置前と比較して AEA の有意な増加が認められ、2-AG では処置の前後で産生量の変動が認められなかった。
- 2) ラット歯周組織創傷モデルにおいて、創傷部治癒過程の肉芽組織中に限局して線維芽細胞およびマクロファージ様細胞に CB1 および CB2 レセプターの発現が認められた。一方、未処置部では両レセプターの発現を確認できなかった。
- 3) AEA 刺激により HGF の増殖が促進し、その増殖は CB1 あるいは CB2 レセプターアンタゴニスト前処理により抑制された。
- 4) CB1/CB2 レセプターアゴニスト刺激により HGF の monolayer scratch 創の閉鎖が促進し、その閉鎖は CB1 あるいは、CB2 レセプターアンタゴニスト前処理により抑制された。
- 5) CB1/CB2 レセプターアゴニスト刺激 HGF では ERK1/2, p38MAPK, Akt それぞれのリン酸化が誘導された。
- 6) CB1/CB2 レセプターアゴニスト刺激による HGF 増殖促進および HGF monolayer scratch 創の閉鎖促進は、MEK1/2, p38MAPK, あるいは PI3-K インヒビターにより抑制された。

歯周組織治癒過程での内因性カンナビノイド量の増加と、創傷部肉芽組織に限局した線維芽細胞、マクロファージ様細胞による CB1、CB2 レセプターの発現亢進が認められたことから、ECS の治癒過程における肉芽組織形成への関与が示唆された。また、治癒過程の増殖期に主要な役割を持つ線維芽細胞において CB1、CB2 両レセプターの活性化は、ERK1/2, p38MAPK, PI3-K/Akt の各シグナル分子のリン酸化を介して、増殖を促進することが明らかになった。

本研究は歯周組織治癒における ECS の役割およびそのメカニズムについて検討したものであり、ECS の歯周組織治癒過程における関与が示唆された。更なる研究の進展により ECS を利用した歯周組織治癒剤としての臨床応用の可能性が期待され、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第106号		学位申請者	小菌 清香
審査委員	主査	鳥居 光男	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	米澤 傑	副査	松口 徹也
	副査	佐藤 友昭	副査	町頭 三保

主査および副査の5名は、平成22年 6月15日、学位申請者 小菌 清香 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) GCF 採取量の均一化はできているのか？

(回答) 乾燥ワッパで採取部を防湿して唾液などが入らないように配慮し、エアーで十分乾燥後、一定時間 (30 秒) GCF を採取した。歯周状態により GCF 量は一定ではないので部位あたりの AEA 量を表示した。

質問2) 動物実験で骨欠損を作製したあと、肉芽組織を調べているのはどうしてか？

(回答) 歯周組織のレセプター発現を確かめるために骨、歯根膜、セメント質、結合組織、上皮に創傷作製を行った結果、治癒過程観察の中で、肉芽組織に局限したレセプター発現が確認されたためである。他の組織についてはレセプターの発現を確認できなかった。

質問3) 食事などで内因性カンナビノイド量は左右されるのか？

(回答) Lichtman らが 2005 年に高脂質の食事によりアナンダマイドの加水分解酵素である FAAH の作用が減少し、アナンダマイドの量が増加するということを報告している。(Lichtman et al. JCI, 2005)

質問4) 内因性カンナビノイドは脂質だがどのようにして検出したのか？

(回答) 採取した GCF をペーパーポイントより生理食塩水中に溶出させ、Polymyxin B を加えた。その後 Polymyxin B に吸着したアナンダマイドおよび 2-AG をエタノールで溶出し、高速液体クロマトグラフィーにより内因性カンナビノイドを検出した。

質問5) 患者さんから正常歯肉はどのように採取したのか？

(回答) インプラント手術の2次オペの時、もしくは通常の歯肉剥離搔爬術で拡大切除を要した健常歯肉より採取した。

質問6) CB1 アンタゴニスト、CB2 アンタゴニストはパーシャルアゴニストか？

(回答) 今回用いたアンタゴニストは CB1、CB2 共にインバースアゴニストである。

質問7) 今回 CB1、CB2 それぞれに specific なものを使わなかったのはなぜか？

(回答) 内因性カンナビノイドは、CB1、CB2 両レセプターに作用するので、両レセプターに作用する CB1/CB2 レセプターアゴニストを用いた。

質問8) スクラッチテストは歯周組織の治癒に関する実験として一般的に用いられているのか？

(回答) 歯周組織の治癒に関する実験だけでなく、創傷治癒に関する研究全般において細胞の増殖および遊走をみるための実験として用いられている。

質問9) スクラッチテストで細胞間の距離はどのようにして測定したのか？

(回答) 固定した6か所の部分において細胞間の距離を測り、その平均をとった。

最終試験の結果の要旨

質問 10) 外科処置部分より GCF を採取しているが、外科処置前の炎症の影響はどう考えるか？

(回答) GCF を採取した部位は拡大切開部の術前歯肉溝 2~3mm の健全な部位から採取しているので、外科処置以外の要因はないと想定して採取した。

質問 11) 術後 3 日後に AEA が上がっているがこれは治癒の過程でどの時期にあたると思うか？

(回答) 炎症期から増殖期に移っていく時期と考えている。

質問 12) 同じシステムでアナンダマイドだけ増加したのはなぜか？

(回答) 今回調べた術後 3、7、14 日後においては 2-AG の産生増加は確認できなかった。しかし、脊髄の損傷部における内因性カンナビノイド量を測った論文では損傷後早期にはアナンダマイドの産生増加がみられ、損傷後 14、28 日という遅い時期に 2-AG の産生増加がみられており、治癒時期でそれぞれの役割をもつことを示唆していた。今回の実験において 2-AG は 14 日以降に増加していた可能性は考えられる。

質問 13) 術後の内因性カンナビノイドの変動は同じ傾向で推移していくのか？

(回答) 必ずしも同じ傾向で推移していない。増加している被験者が多いが、減少傾向にある人もみられた。

質問 14) 骨欠損がなくとも炎症があれば CB1、CB2 は発現するのか？

(回答) 炎症部位で発現すると考えられる。炎症部位では CB2 の発現が強いとの報告がある。

質問 15) 大麻を吸引または大麻の摂取を行っている人は歯周病になりにくいのか？

(回答) 大麻と歯周病の関連を調べた報告では、逆に大麻を吸う頻度が高い人ほど歯周炎が悪化しているという結果がでている。(Thomason et al. JAMA, 2008) しかし、その報告では社会的地位が低く、歯科メンテナンスに行く頻度が低いほど大麻を吸う頻度が高いという結果になっており、大麻以外の歯周炎悪化の要因が考察されている。したがって、大麻吸引と歯周病罹患との相関関係を評価するのは難しく、大麻を吸引または大麻の摂取を行っている人は歯周病になりにくいとはいえない。

質問 16) 細胞の種類による CB1、CB2 の発現の違いはみられたか？

(回答) 今回の実験では細胞による CB1、CB2 の発現の違いは認められなかった。

質問 17) カンナビノイドは NF- κ B の活性を制御するということが他の細胞でも同様か？

(回答) カンナビノイドは濃度により作用が異なり、他の細胞でも高濃度では NF- κ B の活性を抑制し、低濃度では NF- κ B の活性を促進することが明らかにされている。本研究では、低濃度の 100~500nM で刺激した。

質問 18) CB1、CB2 レセプターは Gi/Go レセプターか？また、レセプターの活性化からリン酸化にいたる過程はどのようなものか？

(回答) カンナビノイド受容体に共役している G 蛋白質は Go または Gi である。レセプター活性に伴い G 蛋白が活性化されることにより PI3-K、TA01/2/3、Ras の活性が誘導され、PI3-K による Akt のリン酸化、TA01/2/3 による下流の p38MAPK のリン酸化、Ras により活性化された Raf による下流の ERK1/2 のリン酸化がおこると考えられる。

質問 19) 後半の実験でアナンダマイドを使わなかった理由は何か？

(回答) 前半でアナンダマイドが CB1、CB2 両レセプターを介して HGF に作用している結果を得たので、後半は CB1/CB2 レセプターアゴニストを用いた。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。