

## 論文要旨

様式 4-1

# Simvastatin Decreases IL-6 and IL-8 Production in Epithelial Cells

(シンバスタチンは上皮細胞においてIL-6 およびIL-8 の産生を抑制する)

鹿児島大学大学院歯学研究科

(指導教員 和泉雄一教授)

申請者氏名 迫田賢二

### 【背景と目的】

慢性炎症性疾患である歯周炎は、中高年において高い罹患率を示し、その年齢層においては心臓血管系疾患も一般的なものとなっている。したがって、心臓血管系疾患の発症においては、歯周炎のわずかな影響でさえも身体に十分な影響を及ぼしていると考えられている。

HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチンは、コレステロール合成を抑制する「脂質低下作用」により、血液中のコレステロールを低下させる抗高脂血症薬である。近年、スタチン系薬剤の心臓血管系疾患に対する目覚ましい予後改善効果が明らかにされている。また、「脂質低下作用」以外に「脂質低下によらない作用」が明らかにされ、その中には抗炎症作用、免疫機能改善作用、血管内皮機能改善作用、血小板凝集抑制作用などが報告されている。

本研究では、スタチンの抗炎症作用が歯周組織の炎症抑制にも有効であると予想し、歯周組織での炎症反応に重要な役割を果たしている口腔上皮細胞に焦点を当て、IL-1 $\alpha$ で刺激したヒト口腔上皮様細胞株 (KB) の産生する炎症性サイトカインについての検索を目的とした。

### 【材料と方法】

スタチンはシンバスタチンを用いた。KB をシンバスタチン存在下において IL-1 $\alpha$  で刺激し、そこへ HMG-CoA 還元酵素の中間代謝産物であるメパロン酸、ファルネシルピロリン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を添加した。その培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$ ) の測定はベクトン・ディッキンソン社の Cytometric Bead Array System を用いて行った。次に、NF- $\kappa$ B、AP-1 活性測定のために pNF- $\kappa$ B-Luc と pAP-1-Luc のプラスミドを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、また内部コントロールとして pCMV- $\beta$ gal を用いて標準化を行った。また、低分

子量 G タンパク質 Rho のサブファミリーである RhoA, Rac1, Cdc42 のドミナントネガティブをもちいて NF- $\kappa$ B, AP-1 のレポーターアッセイを行いシグナル伝達経路の検討した。

これらのプラスミドは、リポフェクション法にてトランスフェクションを行い、トランスフェクション後48h培養した後、各条件下で5h処理し、NF- $\kappa$ B, AP-1のプロモーター活性をルシフェラーゼ活性として測定した。

#### 【結果・考察】

- 1, KB において、シンバスタチンは IL-1 $\alpha$ によって惹起された IL-6, IL-8 の産生を濃度依存的 ( $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$ M) に有意に抑制した。(IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ については検出されなかった。)
- 2, その抑制作用はメバロン酸と GGPP の添加によって解除されたが、FPP の添加ではその作用は認められなかった。このことは、メバロン酸代謝経路が炎症性サイトカインの産生に関与していることを示唆している。さらに、FPP は低分子量 G タンパク質 Ras のプレニル化、GGPP は低分子量 G タンパク質 Rho のプレニル化に関与していることから、シンバスタチンの IL-6, IL-8 産生抑制作用は Rho のプレニル化が阻害された結果であることが分かる。
- 3, シンバスタチンは IL-1 $\alpha$ によって活性化された NF- $\kappa$ B, AP-1 の活性を抑制していることが明らかになった。NF- $\kappa$ B, AP-1 は炎症反応を含む様々な免疫応答に関与する遺伝子発現を制御しているため、シンバスタチンは心臓血管系疾患同様、歯周組織をふくめた口腔組織にも有益な効果をもたらす可能性がある。
- 4, IL-1 $\alpha$ 刺激によって惹起される NF- $\kappa$ B 活性には Rac1 と Cdc42 の関与が、AP-1 活性には Rac1 が強く関与していることが示唆された。

近年、全身疾患と歯周病との関連性が明らかになってきている。スタチンによる心臓血管系疾患などの全身の組織反応が改善されることは様々な組織細胞で確認されているが、それはスタチンの直接的作用に加え、スタチンが歯周組織の炎症を抑えることもその一端を担っている可能性は十分に考えられる。本研究が示したように、スタチン自身が直接ヒト口腔上皮様細胞からの炎症性サイトカイン産生を低下させたことに加え、私たちは歯肉線維芽細胞においても同様の結果を得ていることから、スタチンは歯周組織に対しても抗炎症作用を示すことが示唆された。スタチン服用患者の実際の血中濃度は約 $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mといわれている。一般的に歯肉溝滲出液中の薬物濃度は循環血中の10倍以上になることが知られている。本研究で使用したシンバスタチンの濃度は $10^{-6}$ Mで最もサイトカイン産生を抑制したことから、スタチンの臨床的血中濃度は歯周組織に有効である可能性がある。

結論として、シンバスタチンは口腔上皮様細胞においても脂質低下によらない作用の一つとして抗炎症作用を有することが示された。そして、IL-1 $\alpha$ によって誘導されるNF- $\kappa$ BとAP-1の活性が少なくともその一部で制御されていることが明らかになった。この作用には低分子量Gタンパク質Rhoの中でも特にRac1が強く関与していることが示唆された。

様式7

報告番号	歯研第133号		氏名	迫田賢二
論文審査担当者	主査	和泉雄一		
	副査	於保孝彦	馬嶋秀行	佐藤友昭

## Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells

(シンバスタチンは上皮細胞においてIL-6およびIL-8の産生を制御する)

抗高脂血症薬であるHMG-CoA還元酵素阻害剤(総称スタチン)には、本来のコレステロール合成抑制作用以外に、抗炎症作用、抗酸化作用、骨塩量増加作用などの多面的効果が報告されている。本論文では、スタチンの抗炎症作用が歯周組織の炎症抑制にも有効であると予想し、歯周組織での炎症反応に重要な役割を担っている口腔上皮細胞に焦点を当て、IL-1 $\alpha$ で刺激したヒト口腔上皮様細胞株(KB)の産生する炎症性サイトカインについての検索を行った。スタチンには、多くの多面的効果が報告されているシンバスタチンを用いた。KBをシンバスタチン存在下にてIL-1 $\alpha$ で刺激し、そこへHMG-CoA還元酵素の代謝産物であるメバロン酸、ファルネシルピロリン酸(FPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)を添加した。その培養上清中の炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、TNF- $\alpha$ )をCytometric Beads Arrayにて測定した。さらに炎症反応に重要な役割を担うNF- $\kappa$ B、AP-1活性測定のためにルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。次に、低分子量G蛋白質Rho(RhoA、Rac1、Cdc42)のドミナントネガティブを用いて情報伝達経路を検討した。

その結果、KBにおいて、シンバスタチンはIL-1 $\alpha$ により惹起されたIL-6、IL-8の産生を濃度依存的(10<sup>-9</sup>~10<sup>-6</sup>M)に有意に抑制し、その抑制作用はメバロン酸とGGPPによって解除され、FPPでは解除されなかった。FPPとGGPPはそれぞれRas、Rhoの活性化に関与しているため、その抑制作用はRhoの活性化が阻害された結果であることが明らかとなった。シンバスタチンはIL-1 $\alpha$ で活性化されたNF- $\kappa$ B、AP-1の活性を抑制していることが示され、NF- $\kappa$ B活性にはRac1とCdc42の関与が、AP-1活性にはRac1が強く関与していることが示された。

近年、全身疾患と歯周病との関連性が注目されている。スタチンによる全身の組織反応の改善は様々な組織細胞で確認されているが、それはスタチンの直接的作用に加え、スタチンが歯周組織の炎症を抑えることもその一端を担っている可能性は十分に考えられる。スタチン服用患者のスタチン血中濃度は約10<sup>-9</sup>~10<sup>-7</sup>Mであり、歯肉溝滲出液中の薬物濃度は循環血中の10倍以上になることが知られている。本研究で使用したシンバスタチンは10<sup>-6</sup>Mで最もIL-6、IL-8産生を抑制したことから、スタチンの臨床的血中濃度は歯周組織に有効であると考えられる。

結論として、シンバスタチンは口腔上皮様細胞において「多面的効果」の一つである抗炎症作用を示した。そして、IL-1 $\alpha$ によって誘導されるNF- $\kappa$ BとAP-1の活性が一部で制御されていることが明らかになった。この作用には低分子量Gタンパク質Rhoの中でも特にRac1が強く関与していることが明らかとなった。

本論文は、高脂血症治療薬であるシンバスタチンのヒト口腔上皮様細胞に対する抗炎症作用を*in vitro*において評価したものであり、シンバスタチンはIL-1 $\alpha$ 刺激によるIL-6とIL-8の産生を抑制することを明らかにした。さらにシンバスタチンは炎症・免疫応答において重要なNF- $\kappa$ BとAP-1の活性を抑制したことから歯周組織においても有益な効果をもたらすことが考えられる。シンバスタチンには骨塩量増加作用も報告されており、歯周組織の保護や、治癒・再生を起こしやすい環境を導く可能性がある。スタチン研究のさらなる解明により、新しい歯周病の予防や治療法の開発が期待される。

よって、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分に価値があるものと判断した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報 告 番 号	歯 研 第 <b>133</b> 号	氏 名	迫 田 賢 二	
論文審査担当者	主 査	和 泉 雄 一		
	副 査	於 保 孝 彦	馬 嶋 秀 行	佐 藤 友 昭

審査委員会は平成18年3月2日（木）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めるとともに、これと関連したスタチンの多面的効果および細胞生物学的諸問題、実験手技や研究結果の解釈および転写因子へのシグナル伝達等に関する事項について試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。

以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつと判断した。