

## 論 文 要 旨

## Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- $\kappa$ B pathway inhibition

〔エンドカンナビノイドであるアナンダマイドは、歯肉組織中で NF- $\kappa$ B 経路の抑制を介して歯周炎を制御する〕

中 島 結 実 子

### 【序論および目的】

近年、内因性カンナビノイド(endocannabinoids)であるアナンダマイド(anandamide) がそのレセプターである CB1、CB2 経路を介して炎症を制御することが注目されている。すなわち、アナンダマイドはエンドトキシン(lipopolysaccharide, LPS) 刺激によりマクロファージから産生され、少量では炎症性サイトカインの産生促進作用、多量ではこれらの産生抑制作用を発揮すること、グラム陰性菌性敗血症においては早期ショックの原因メディエーターとして働くことなどが明らかにされている。しかしながら口腔領域疾患におけるアナンダマイド-CB1, CB2 受容体経路の発現や役割については、全く知見はない。そこで本研究では、グラム陰性嫌気性細菌が病因的役割を果たす歯周病の発生病理にアナンダマイドと CB1、CB2 がどのように関与しているかについて研究した。

目的と方法：歯周炎の炎症組織局所におけるアナンダマイドと CB1、CB2 の発現を検討し、さらにその発生病理的意義を明らかにする目的で、*in vitro* での再構成系を確立して以下の解析を行った。

1. 歯肉溝滲出液中のアナンダマイドの測定
2. 歯周炎罹患歯肉における CB1、CB2 発現と、臨床サンプル由来培養ヒト歯肉線維芽細胞 (Human Gingival Fibroblast: 以下 HGF) における CB1、CB2 発現の比較検討
3. 培養 HGF における炎症性サイトカイン産生のプロファイルとそれに対するアナンダマイドの効果、およびその細胞内シグナル伝達機構

### 【材料および方法】

1. 慢性歯周炎患者 12 名の歯肉溝滲出液中のアナンダマイド濃度を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。
2. 歯周炎罹患歯肉組織における CB1、CB2 の発現を免疫組織化学的に検討した。
3. 歯周炎の病態と CB1、CB2 の発現頻度の関連を、RT-PCR、ウェスタンブロット法で確認した。
4. 培養 HGF を用いて、アナンダマイドおよび合成の CB1、CB2 のアンタゴニストを用いて CB1、CB2 の発現と IL-6、IL-8、MCP-1 の産生に及ぼす影響を検討した。
5. 培養 HGF を用いて、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化に対するアナンダマイドの影響を検討した。

なお、患者検体の解析は全てインフォームドコンセントを得た上で、鹿児島大学医学部・歯学部附属病臨床研究倫理委員会承認の方法( 受付番号 16-95 )に基づいて行った。

## 【結果】

1. 歯周炎患者 12 名の歯肉溝滲出液中には、平均濃度 4.63  $\mu\text{g/ml}$ 、平均総測定量 16.4ng のアナンダマイドが検出された。
2. 免疫組織化学的検討では、歯周炎罹患歯肉組織中の HGF と血管内皮細胞に CB1、CB2 が陽性であった。
3. 培養 HGF を用いた検討では、健康歯肉由来または歯肉炎由来の HGF に比べ、歯周炎歯肉由来の HGF の方において、CB1、CB2 の発現が増強していた。また、LPS 刺激により、HGF における CB1、CB2 の発現が誘導された。
4. 培養 HGF の LPS 刺激により誘導された IL-6、IL-8、MCP-1 産生は 10  $\mu\text{M}$  のアナンダマイド添加により有意に抑制された。その効果は、CB1、CB2 のアンタゴニストの添加により阻害された。このことより、アナンダマイドの IL-6、IL-8、MCP-1 産生抑制作用は、CB1、CB2 を介したものであることが示唆された。
5. 培養 HGF において LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は、10  $\mu\text{M}$  のアナンダマイドにより強く抑制された。

## 【結論及び考察】

歯周病は、口腔内疾患の中では、最も罹患率の高い疾患のひとつであり、単に歯の脱落という口腔内局所の問題にとどまらず、動脈硬化や虚血性心疾患など全身性疾患の発症病理にも関与することが判明し、重要な臨床的課題の一つとなっている。この歯周病の発生病理には多くの因子が関与するが、そのうち最も中心的な役割を果たしているのが、歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis* など) の局所持続感染である。しかし歯周病菌感染が、典型的な慢性炎症である歯周病の病態発現にどのように関与しているかについては不明な点が少ない。

一方、近年 LPS 刺激でマクロファージ系の細胞から内因性カンナビノイドであるアナンダマイドが産生放出され感染性炎症に深く関与することが解明しつつある。そこで、本研究では、歯周病局所における上記内因性カンナビノイドとその受容体システムについて検討した。

結果、歯周炎患者の歯肉溝滲出液中には、アナンダマイドが検出され、歯肉線維芽細胞ではその受容体である CB1、CB2 の発現が確認された。またその CB1、CB2 の発現の程度は、歯周病罹患部位において増強していた。さらに、歯肉溝滲出液中に検出した濃度の範囲のアナンダマイド刺激で、HGF の LPS による NF- $\kappa$ B の活性化は抑制された。これらのことから、ヒト歯周病患者においてアナンダマイド-CB1、CB2 経路は、歯周病の発症に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

以上、今回の研究結果は、新規炎症制御メディエーターとして注目されている内因性カンナビノイドであるアナンダマイドとその受容体システムの歯周病の発生病理の関係を初めて明らかにしたものである。

今後、歯周炎罹患部位でアナンダマイドの産生機序やそのダイナミズム、受容体の発現とそれを介したシグナル伝達/細胞応答、そして病態発現などへの関与の様式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の展望が開けてくることが期待される。

(FEBS Letters 2006 ; Vol.580, (2): 613 - 619 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第	2号	学位申請者	中島 結実子
審査委員	主査	鳥居 光男	学位	博士(医学・ <span style="border: 1px solid black;">歯学</span> ・学術)
	副査	小田 紘	副査	杉原 一正
	副査	米澤 傑	副査	松山 孝司

**Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF- $\kappa$ B pathway inhibition**

(エンドカンナビノイドであるアナンダマイドは、歯肉組織中でNF- $\kappa$ B経路の抑制を介して歯周炎を制御する)

(FEBS Letters · 580 · 613-619 · January 2006 掲載)

近年、内因性カンナビノイドであるアナンダマイド(anandamide: AEA)がそのレセプターであるCB1、CB2経路を介して炎症を制御することが注目されている。すなわち、AEAはエンドトキシン(lipopolysaccharide, LPS)刺激によりマクロファージから産生され、少量では炎症性サイトカインの産生促進作用、多量ではこれらの産生抑制作用を発揮すること、グラム陰性菌性敗血症においては早期ショックの原因メディエーターとして働くことなどが明らかにされている。しかし、口腔領域疾患におけるAEA-CB1、CB2受容体経路の発現や役割については、全く明らかにされていない。そこで学位申請者らは、グラム陰性嫌気性細菌が病因的役割を果たす歯周病の発生病理にAEAとCB1、CB2がどのように関与しているかについて、歯肉溝滲出液(GCF)、歯周炎罹患歯肉および培養したヒト歯肉線維芽細胞(human gingival fibroblasts: HGFs)を研究対象として検索した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 歯周炎患者12名の歯肉溝滲出液中には、平均濃度4.63 $\mu$ g/ml、平均総測定量16.4ngのAEAが検出された。
- 2) 免疫組織化学的検討では、歯周炎罹患歯肉組織中のHGFsと血管内皮細胞にCB1、CB2が陽性であった。
- 3) 培養HGFsを用いた検討では、健康歯肉由来または歯肉炎由来のHGFに比べ、歯周炎歯肉由来のHGFsの方において、CB1、CB2の発現が増強していた。また、LPS刺激により、HGFsにおけるCB1、CB2の発現が誘導された。
- 4) 培養HGFsのLPS刺激により誘導されたIL-6、IL-8、MCP-1産生は10 $\mu$ MのAEA添加により有意に抑制された。その効果は、CB1、CB2のアнтаゴニストの添加により阻害された。このことより、AEAのIL-6、IL-8、MCP-1産生抑制作用は、CB1、CB2を介したものであることが示唆された。
- 5) 培養HGFsにおいてLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化は、10 $\mu$ MのAEAにより強く抑制された。

歯周炎患者のGCF中には、AEAが検出され、HGFsではその受容体であるCB1、CB2の発現が確認された。またそのCB1、CB2の発現の程度は、歯周炎罹患部において増強していた。さらに、GCF中に検出した濃度範囲のAEA刺激で、HGFsのLPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化は抑制された。これらのことから、ヒト歯周炎患者においてAEA-CB1、CB2経路は、歯周炎の発症に対して抑制的に働いている可能性が示唆された。

本研究は、新規炎症制御メディエーターとして注目されている内因性カンナビノイドであるAEAとその受容体システムの歯周病の発生病理の関係を初めて明らかにしたものである。歯周炎罹患部でのAEAの産生機序や受容体の発現とそれを介したシグナル伝達/細胞応答、そして病態発現などへの関与をさらに解明することにより、新しい歯周病の予防や治療法の開発の展望が開けてくることが期待される。よって、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 2 号	学位申請者	中島 結実子
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小田 紘	副査 杉原 一正
	副査	米澤 傑	副査 松山 孝司

主査および副査の5名は、平成18年3月28日、学位申請者 中島 結実子 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) 歯周病原性細菌には、グラム陰性菌が多いのか。

(回答) 歯周病原性細菌のほとんどがグラム陰性菌である。歯肉炎から歯周炎への病態の悪化に伴い、細菌叢中のグラム陰性嫌気性細菌の割合が増加する。

質問2) LPS は、申請者らが抽出したのか。

(回答) 当教室 (歯周病態制御学分野) で、wild type *Porphyromonas gingivalis* よりホットフェノールウォーター法にて抽出した。

質問3) アナンダマイドを *in vitro* では、10 $\mu$ M 添加しているが、歯肉溝滲出液中の濃度と比較して高いのか、低いのか。

(回答) アナンダマイドの分子量は347.5であり、10 $\mu$ M のアナンダマイドは3.47 $\mu$ g/ml に相当する。歯肉溝滲出液中の濃度は、平均で4.63 $\mu$ g/ml であり同程度である。

質問4) アナンダマイドは炎症を抑制すると報告しているが、歯周病態の悪化に伴い存在量が増加しているのはなぜか。また、同じ歯周ポケット深さでもアナンダマイド量に違いが出るのはなぜか。

(回答) 文献 (J Clin Invest. 2004 Apr. Federico Massa et al.) によるとアナンダマイドは過剰な炎症を抑制する効果を有すると報告されている。歯周病態の悪化と共に歯肉溝内の細菌数が増加し LPS 濃度が上昇する。そのため、過度な炎症から防御するためにアナンダマイド量が増加していると考えられる。今回は、歯周病の悪化の指標として歯周ポケット深さを用いたが、同じ深さであってもポケット内の炎症の程度は異なるため、それに伴いアナンダマイド量に差が生じていると考えられる。

質問5) 歯周病は急性期と慢性期が繰り返されるが、慢性期ではアナンダマイドが作用していると考えられるのか。アナンダマイドの内因性のインヒビターあるいはレセプターに対する抗体は存在するのか。

(回答) 慢性期ではアナンダマイドの作用により炎症抑制効果が働いているが、急性期ではアナンダマイドの効果の減少により炎症の亢進を呈していることが考えられる。アナンダマイドは、fatty acid amide hydrolase (FAAH) により加水分解される。急性期には、FAAH の活性が亢進し、アナンダマイドの分解が促進していると考えられる。

質問6) 論文中には、カンナビノイドは少量で炎症性サイトカインの産生促進作用、多量ではこれらの産生抑制作用を発揮すること記載されているが、歯周ポケット内の濃度は、少量か多量か。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) アナンダマイドは、nM レベルではサイトカイン産生の促進、 $\mu\text{M}$  レベルでは産生抑制作用を有する。歯周ポケット内の濃度は  $10\mu\text{M}$  以上であり、多量と考えた。

質問 7) 歯肉上皮の CB1、CB2 の発現を免疫組織化学的に検討したか。

(回答) 歯周病局所歯肉上皮は CB1、CB2 に対し免疫組織化学的に強い陽性所見を認めた。

質問 8) 歯肉上皮組織や培養上皮細胞でも、歯周病態の悪化に伴い CB1、CB2 の発現の変化は免疫組織化学的あるいは、RT-PCR や Western blot にて検討できるのか。

(回答) 今回、健康歯肉を切片作成必要量切除することは、倫理的に難しく免疫組織化学的に評価することはできなかった。また、臨床サンプル由来歯肉上皮細胞の継代培養は困難で、継代培養細胞数も限られるため、RT-PCR や Western blot での評価を行っていない。

質問 9) CB1、CB2 の染色所見では、血管内皮細胞のみでなく血管壁まで陽性所見が認められるが、これは non-specific な染色ではないか。また、CB1、CB2 の二重染色について検討したか。

(回答) non-specific な所見については、一次抗体濃度の希釈や非特異的タンパク質の除去方法等を改善して再検討したい。また、二重染色についても今後検討したい。

質問 10) アナンダマイドは、免疫組織化学的には染色できないのか。

(回答) アナンダマイドは脂質メディエーターであり、抗体を作製することができないため免疫組織化学的検討は行っていない。

質問 11) CB1、CB2 は他の細菌由来の LPS や LPS 以外の刺激によっても発現が増加するのか。

(回答) 大腸菌由来の LPS により CB1、CB2 の発現が増加することが報告されている。LPS 以外では、ウィルス、リポプロテイン、熱刺激等様々な刺激により発現が増加すると報告されている。

質問 12) CB1 と CB2 で作用の違いはあるのか。

(回答) 精神神経機能・免疫応答に関しては、細胞の種類により CB1、CB2 のどちらが有意に発現しているかは異なるが、作用に違いはない。しかし骨代謝に関しては CB1 が骨吸収促進作用、CB2 が骨吸収抑制作用を呈し、拮抗的な作用を持つことが報告されている。

質問 13) 炎症性メディエーターとして TNF- $\alpha$  の産生量は検討しなかったのか。

(回答) 今回実験に利用した歯肉線維芽細胞からは、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  の産生は検出できなかった。従って、本研究では、TNF- $\alpha$  の産生について検討していない。

質問 14) MCP-1 の産生を検討した理由は何か。

(回答) 文献 (Nature, 2005 Apr. Sabine Steffens et al.) によると、カンナビノイドはケモカインの産生を抑制し、炎症細胞の遊走を抑制していることが示されている。この報告において測定されていた MCP-1 を本研究においても検討した。

質問 15) 治療に応用する場合どのように利用すべきか。

(回答) 急性期において短期間に歯周ポケット内へ局所投与することが妥当と考えられる。

質問 16) 論文の考察に今後の検討課題として痛みとの関連が上げられているが、どういうことか。

(回答) マリファナや内因性カンナビノイドは疼痛抑制作用を示すことが報告されている。歯周病の特徴の一つに疼痛など自覚症状がなく進行していくことがあげられる。アナンダマイドが歯周組織中の神経細胞にも作用し、痛みに対する閾値の低下を起こしていることが考えられる。今後、歯周組織に分布する神経細胞における CB1、CB2 の発現も検討する予定である。

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。