

## 論文の内容の要旨

氏名：早 田 真由美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Inhibitory effects of Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. on *Porphyromonas gingivalis*

LPS-induced production of inflammatory cytokines and RANKL-induced osteoclast differentiation  
(*Porphyromonas gingivalis* LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生と RANKL 誘導性破骨細胞分化に対する *Cynara scolymus* L.由来シナロピクリンの抑制効果)

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で、30 歳以上の約 8 割が罹患している。歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく、誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病、および低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることも明らかとなってきた。したがって、歯周病予防は口腔の健康のみならず、全身の健康維持にも重要な考え方である。

歯周病の発症と進展には、バイオフィルムに生息する口腔細菌が複合的に関与しているが、中でもグラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は最も重要な歯周病原菌であり、病原因子として LPS や線毛等を有する。LPS は、主に歯肉線維芽細胞において転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) を活性化し炎症性サイトカインを誘導することにより歯肉破壊に関与する。また、骨芽細胞の receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 発現を介し破骨細胞の分化を促進することにより骨吸収にも深く関与する。

一方、歯周病の予防には、ブラッシングによる機械的なプラーク除去が一般的に広く行われている。しかし、歯周病原菌は歯周ポケットの深部に生息するため、効果は限定的で術者の手技にも左右される。また、要介護高齢者や有病者においては、自身でブラッシングを行うことが困難な場合が多い。したがって、ブラッシングに代わる、あるいはブラッシングを補完するような新しい歯周病予防策が求められている。歯科治療では、テトラサイクリン等の抗菌薬が補助的に用いられるが、抗菌薬の使用は耐性菌の出現や費用の問題が生じる。

近年、抗炎症作用を有する物質として安全かつ安価な植物由来の天然物に対する関心が高まっている。例えば、ウコンに含まれるクルクミンや緑茶のカテキン等のポリフェノールは、種々の炎症性疾患に効果が期待できる天然物として多くの研究が行われている。*Cynara scolymus* L. はキク科に属する多年草で、一般的にはアーティチョークという名で知られている。我が国では観賞用として使用される場合が多いが、欧米では脂肪の消化を助ける野菜として広く食されている。皮膚や胃の細胞を用いた研究から、アーティチョーク葉エキスが抗炎症作用を有すること、その有効成分としてセスキテルペンラクトン類のシナロピクリンが重要であることが報告されている。しかし、歯周病予防を目的とした研究、およびシナロピクリンの抗炎症機序に関する報告はこれまでにない。

そこで本研究では、歯周病患者由来のヒト歯肉線維芽細胞とマウス単球由来 RAW264.7 細胞を用い、シナロピクリンの炎症性サイトカイン産生と破骨細胞分化に対する効果を検討した。

実験は、歯肉線維芽細胞を、アーティチョーク葉エキスもしくはアーティチョーク葉から精製した高純度のシナロピクリンで前処理後、*P. gingivalis* LPS (0.5  $\mu$ g/ml) で刺激した。培養上清と細胞抽出液を回収し、IL-8 と IL-6 の量は ELISA 法にて、遺伝子発現は real-time PCR 法にて定量した。NF- $\kappa$ B の活性化はルシフェラーゼアッセイにより、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解、および NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化は、各々の抗体を用いた Western blotting 法により検討した。細胞増殖はテトラゾリウム塩を使用し、フォルマザン色素量を吸光度計で測定することにより解析した。破骨細胞分化に対する作用は、RAW264.7 細胞を RANKL (100 ng/ml) で 4 日間処理し破骨細胞分化を誘導する系を用い、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行うことにより、破骨細胞様の TRAP 陽性多核巨細胞数を計測した。

はじめに、歯肉線維芽細胞において *P. gingivalis* LPS 誘導性の炎症性サイトカイン発現に対する、アーティチョーク葉エキスの効果を調べた。その結果、アーティチョーク葉エキスにおいて、LPS 誘導

性の IL-8 と IL-6 の遺伝子発現抑制効果が認められた。アーティチョーク葉エキスにはシナロピクリン以外にも様々な物質が含まれているため、次にシナロピクリン単体の効果を検討した。シナロピクリンの量は、アーティチョーク葉エキス中に実際に含まれている量を用いた。実験の結果、シナロピクリンは LPS 誘導性の IL-8 と IL-6 の遺伝子発現、並びに蛋白発現を濃度依存的に強く抑制した。その効果は、アーティチョーク葉エキスと比較して約 3 割ほど高く、低濃度でも十分な抑制効果が認められた。また、用いたシナロピクリンの濃度 (2.5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, および 10  $\mu$ M) においては、歯肉線維芽細胞に対する為害作用は認められなかった。

LPS 誘導性の炎症性サイトカインの発現には NF- $\kappa$ B が深く関与することが知られている。そこで、シナロピクリンの抗炎症作用機序を検討するために、NF- $\kappa$ B 活性化に対するシナロピクリンの効果を検討した。NF- $\kappa$ B p65/p50 は通常、細胞質内で抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  と結合した状態で存在し活性が抑えられている。LPS シグナルが入ると I $\kappa$ B $\alpha$  が分解された後、p65 はリン酸化され p50 と共に核内に移行する。核移行した p65/p50 が遺伝子プロモーターに結合した結果、炎症性サイトカインの発現が誘導される。はじめに、今回用いた歯肉線維芽細胞において実際に NF- $\kappa$ B が LPS 誘導性の炎症性サイトカイン産生に関与しているか否かを、NF- $\kappa$ B 阻害剤:BAY 11-7082 を用いて検討した。その結果、BAY 11-7082 は LPS 誘導性 IL-8 と IL-6 産生を抑制した。次に、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化に対するシナロピクリンの効果を調べた。結果、LPS 刺激 5 分後に認められた I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化は、シナロピクリンの前処理によりその濃度依存的に抑制された。また、シナロピクリンは転写レベルで NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することがルシフェラーゼアッセイの結果から明らかとなった。

次に、破骨細胞分化に対するシナロピクリンの効果を RAW264.7 細胞を用いて検討した。RAW264.7 細胞を RANKL 処理した結果、多数の TRAP 陽性の破骨細胞が形成された。一方、本実験系にシナロピクリンを添加した結果、破骨細胞数が顕著に減少した。また、破骨細胞の大きさもシナロピクリンの濃度依存的に減少した。同様の結果は、アーティチョーク葉エキス処理においても認められた。炎症性サイトカイン産生に対する効果と同様、シナロピクリンの方が低濃度で強い抑制効果を示した。

以上の結果から、シナロピクリンは *P. gingivalis* LPS 誘導性の NF- $\kappa$ B 活性化を阻害することにより IL-8 と IL-6 の産生を抑制することが示唆された。また、シナロピクリンは、RANKL により誘導される破骨細胞分化を阻害することが初めて明らかとなり、骨吸収抑制効果を有することも示唆された。

歯周病の進行に伴い患者の歯周ポケット内には *P. gingivalis* が増加すること、それに伴い IL-8 と IL-6 濃度が上昇することが報告されている。これらの炎症性サイトカインは LPS 同様、RANKL を誘導することにより骨吸収にも深く関与する。本研究からシナロピクリンは、炎症性サイトカイン産生と破骨細胞分化の両方を強く抑制することが明らかとなり、新たな歯周病予防薬の候補となりうる可能性が示唆された。