

論文審査の結果の要旨

氏名：市川 勝一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：A GGT Inhibitor Suppresses IL-6 and IL-8 Expressions Enhanced by LPS in Gingival Fibroblasts
(GGT 阻害剤による LPS 刺激歯肉線維芽細胞における IL-6 および IL-8 発現抑制)

審査委員：(主査) 教授 小方 頼昌
(副査) 教授 野本 たかと
教授 平塚 浩一

歯周病原性細菌によって発症する慢性炎症である歯周病は全身疾患に深く関与している。生体のグルタチオン（以下 GSH）は、抗酸化作用と解毒作用を持ち、抗酸化成分である細胞内のチオール環境を維持する機能を持つと言われており、様々な疾患に関与していることが報告されている。歯科領域においては、重篤な歯周病患者の血清および血漿中や唾液中の GSH は低値であるが、改善されると高値となることが報告されている。GSH はグルタミン酸側鎖を介した特殊な γ -グルタミル結合を有し、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（以下 GGT）によってのみ分解される。GGT は、GSH 代謝と生体異物解毒の初期反応を担う酵素として、抗酸化ストレスにおいて重要な役割を果たす。最近、この GGT を阻害する酵素である GGT 阻害剤（以下 GGSTop[®]）が皮膚線維芽細胞において細胞外マトリックスであるコラーゲン、エラスチンおよびヒアルロン酸の産生を促すことで皮膚上皮組織の形態・機能維持に深く関与することが報告されている。GGSTop[®]が、皮膚同様に歯周病における歯肉線維芽細胞の機能維持に関与する可能性があると考えられる。本研究ではヒト歯肉線維芽細胞（以下 NGF）の炎症応答に対する GGSTop[®]の効果について検証することとした。

GGSTop[®]は口腔内微生物（パラサイト）である *Porphyromonas gingivalis* および *Candida albicans* の増殖能に直接的な影響を及ぼさず、さらに *P. gingivalis* 由来の Lipopolysaccharide（以下 LPS）の Endotoxin unit に対しても影響を及ぼさなかった。同様に宿主（ホスト）側である NGF に対する GGSTop[®]の安全性を確認するために、0.1~500 $\mu\text{g/ml}$ の GGSTop[®]添加 24 時間後の NGF 生細胞数を確認したが、無添加群と有意な差は認められなかった。さらに予備実験から、培地に添加する LPS は 1 $\mu\text{g/ml}$ 、GGSTop[®]は 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。培養液への LPS 添加は、NGF 細胞の実験的炎症モデルとして行った。遺伝子発現解析は real-time PCR 法で、タンパク質発現と NF- κ B 活性は ELISA 法で解析を施した。

LPS/GGSTop[®]添加 8 時間後の NGF 細胞の IL-6 および IL-8 遺伝子発現は、LPS 単独添加群に比べて有意に低下し、さらに 24 時間後の培養上清中の IL-6 および IL-8 タンパク質産生量は、LPS 単独添加群と比較して有意に減少した。このことは、LPS で惹起された細胞の炎症応答が、GGSTop[®]によって抑制される可能性があることが示唆されたと言える。

LPS 刺激によって NGF における IL-6 および IL-8 の遺伝子発現やタンパク質産生量が増大することは、過去の報告と同様に、LPS 受容体である Toll like receptor を介して、炎症の中心的役割を担う NF- κ B の活性上昇によるものが一つの要因であると考えられた。そこで LPS 添加群と LPS/GGSTop[®]添加群との NF- κ B 活性を比較したところ、両者の間に p50/RelA のリン酸化に有意な差が認められなかった。加えて、GGSTop[®]単独刺激においても p50/RelA のリン酸化はコントロール群と比較して有意差を認めないことから、GGSTop[®]による抗炎症作用は NF- κ B を介したサイトカイン産生経路には関与しないものと考えられた。

以上の事から、GGSTop[®]は NGF に対する細胞障害性は低く、*P. gingivalis* 由来の LPS 刺激により増加した炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の発現量を抑制する機能があることが示唆された。GGT 活性の制御は歯周病による炎症応答の制御における鍵となると思われることから、GGT 活性を阻害する GGSTop[®]の有

用性を検討することは臨床応用に向けて意義のあるものと考えられた。

本研究は、歯周病に代表される口腔粘膜における慢性炎症に対する GGT 阻害剤の抑制効果について新たな知見を得たものであり、口腔機能維持に貢献する可能性が高く、今後一層の発展が望めるものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 2 年 2 月 2 0 日