

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase 阻害剤 における 口腔粘膜創傷治癒 への 効果 の検討

The effect of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase inhibitor on wound healing of oral mucosa

日本大学大学院 松戸歯学研究科 歯学専攻

佐久間 圭

(指導： 野本 たかと 教授)

$\gamma$ -glutamyl transpeptidase 阻害剤における口腔粘膜創傷治癒への効果の検討  
The effect of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase inhibitor on wound healing of oral mucosa

佐久間圭<sup>2)</sup> 田中陽子<sup>1)</sup>

- 1) 日本大学大学院松戸歯学研究科
- 2) 日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

日本障害者歯科学会雑誌第 41 巻第 1 号 (2020 年 2 月末発行予定)

Key word : wound healing, gingival fibroblasts, GGT inhibitor, Glutathione

Corresponding : 田中 陽子

日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

Tel & Fax : 047-360-9443

E-mail ; tanaka.yoko@nihon-u.ac.jp

## 和文要旨：

口腔粘膜は皮膚より創傷治癒が早いですが、糖尿病、免疫機能低下や低栄養状態では治癒不全が起きやすく、QOLの維持に関与する。 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) 阻害剤であるGGsTop®が、皮膚線維芽細胞において、コラーゲンやエラスチン産生を上昇させ、口内炎誘発モデルマウスにおいて治癒促進に効果があったとの報告があることから、口腔の創傷治癒促進に対する有用性を検討した。ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 への transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 存在下ないし非存在下での GGsTop®添加による影響を、スクラッチアッセイならびに遺伝子発現解析によって検証した。加えてマウスを用いて口蓋粘膜創傷治癒への GGsTop®塗布の影響を確認した。GGsTop®が添加された HGF-1 は TGF- $\beta$ 1 産生量を増大し、スクラッチアッセイにおいて細胞増殖能を亢進させることが明らかにされた。さらに GGsTop®は、TGF- $\beta$ 1 存在下で matrix metalloproteinase 13 遺伝子発現の上昇を引き起こす可能性も示唆された。一方、TGF- $\beta$ 1 存在下で GGsTop®が添加された HGF-1 における  $\alpha$  平滑筋アクチン遺伝子発現の上昇は認められなかった。またマウスを用いた動物実験において、GGsTop®塗布により口蓋粘膜の創傷の治癒促進が認められた。以上の結果より、GGsTop®の口腔内の創傷治癒促進に対する有用性は高いと思われる。

## 緒言

口腔は生命維持に必要な呼吸やエネルギー摂取の経路であるとともに、細菌やウイルスなど外的因子が最初に侵入する器官であるため、口腔粘膜の創傷は人の生命の営みに大きな影響を及ぼすことになる。そのため、口腔内には様々な防御機能が存在し、創傷治癒は皮膚よりも早いことが知られている<sup>1-3)</sup>。しかしながら、免疫機能の低下、糖尿病や低栄養状態などによって、創傷治癒が遅延することが多い<sup>4-6)</sup>。従って、創傷治癒を促す薬剤の開発は人の生命維持や生活の質 (QOL) の維持・向上において意義のあるものと考えられる。しかし現在のところ、創傷治癒を促進させる画期的な治療薬は開発されていない。Shimamura<sup>7)</sup>が、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) 阻害剤として市販されている GGsTop®に、抗がん剤の使用によって誘発される口腔粘膜炎に対する治療薬としての有用性を報告していることから、口腔粘膜創傷治癒にも効果があることが考えられた。また GGT の阻害によって皮膚線維芽細胞における活性酸素種の産生が抑制され、コラーゲンやエラスチンの産生が誘導されることも報告されている<sup>8)</sup>。GGT は疎水性領域を細胞膜の外側にアンカーする形で発現する膜結合型酵素であり、細胞外のグルタチオン ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly; GSH) を  $\gamma$ -Glu と Cys-Gly の間で分解し、細胞内への GSH 再取り込みを担う唯一の酵素であると言われている<sup>9,10)</sup>。細胞内 GSH は、活性酸素種の除去による抗酸化、外因性求電子化合物や重金属の解毒、そして細胞の恒常性を担う働きを担っているため、その GSH の生合成に関与する GGT は細胞にとって不可欠である。しかしながら、GGT によってグルタミン酸 (Glu) と分離した Cys-Gly 結合は、容易に金属イオンを介して活性酸素種を発生させることが明らかにされている<sup>10,11)</sup>。つまり、GGT は GSH の生合成誘導による抗酸化作用に関与する一方で、GGT 活性の

増大は Cys-Gly 結合が過剰産生され、結果的に活性酸素種の発生にも繋がる<sup>12)</sup>。そのため、細胞の恒常性維持や活性酸素種の発生抑制には GGT 活性の調節が鍵となると考えられる。

一般的に創傷治癒は、①出血凝固期、②炎症期、③増殖期、④成熟期の過程を経るが、それぞれの時期に様々な因子の反応系が正常に活性されて収束する<sup>13)</sup>。特に炎症期における異常は治癒不全や炎症の慢性化をきたし、増殖期の異常は線維化・癒痕化などを誘発する<sup>14)</sup>。炎症期から増殖期にかけて増殖が促される歯肉線維芽細胞 (GF) は、細胞外マトリックス (ECM) のコラーゲンを主とした構成タンパクの産生・分泌ならびに自身の筋線維芽細胞への分化によって、再上皮化を促すことが知られている<sup>15,16)</sup>。Liu ら<sup>17)</sup>はマウスの皮膚線維芽細胞において、GSH が transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) によるコラーゲン産生を調整していると報告している。

以上のことから、口腔粘膜の創傷治癒への GGsTop® の有用性を確かめるために、上皮細胞の分化誘導を担う線維芽細胞に着目し、ヒト歯肉線維芽細胞 HGF-1 を用いて TGF- $\beta$ 1 と GGsTop® の関係性を含めて検証した。加えて臨床応用に向け、広範囲におよぶ抜歯症例や、転倒や自傷行為などによる広範囲かつ深い粘膜創傷を想定し、マウス口蓋粘膜創傷治癒への影響を実証することでその有用性を確認した。

## 材料および方法

### 1. ヒト歯肉線維芽細胞における GGsTop® による創傷治癒への影響

#### 1) 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞株の HGF-1 (HGF-1: ATCC® CRL-2014™) を 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) および抗菌薬 (50 units/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin ; GIBCO, U.S.A) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM ; Sigma, U.S.A.) にて 37°C, air 95%, CO<sub>2</sub> 5% の条件下で継代培養し、実験に供した。

#### 2) 添加物質

GGsTop® は富士フィルム和光純薬株式会社 (Japan) より購入した。Recombinant human TGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) および basic fibroblasts growth factor (bFGF) は R&D Systems (U.S.A.) より購入し、以下に示す各々の実験に使用した。

#### 3) 細胞生存率

HGF-1 を 6 well 培養プレートに  $2 \times 10^5$  細胞/well になるように播種し、18 時間培養後、FBS および抗菌薬を含まない D-MEM に交換し、0.1~500  $\mu$ g/ml の GGsTop® を添加した。24 時間培養後に細胞を回収し、Invitrogen™ Countess™ (Invitrogen, U.S.A.) にて生細胞数を測定した (n=4)。

#### 4) TGF- $\beta$ 1 産生量の測定

HGF-1 を 24 well 培養プレートに  $5 \times 10^4$  細胞/well になるように播種し、18 時間培養後、新鮮な D-MEM に培地交換し、 $10 \mu\text{g/ml}$  の GGsTop® を添加した。8 時間および 24 時間後の培養上清を試料とし、ELISA Kit (Quantikine® ELISA Human LAP (TGF- $\beta$ 1) ; R&D Systems, U.S.A.) を用い、吸光度 450 nm にて TGF- $\beta$ 1 産生量を測定した。

#### 5) 創傷治癒能の測定 (スクラッチアッセイ)

HGF-1 を 60 mm 培養ディッシュに  $4 \times 10^5$  細胞/ディッシュ細胞になるよう播種し、18 時間培養後に専用のスクラッチスティック (IWAKI, Japan) を用いて単層培養部に直線を引き、傷を模した細胞の掻き取り面 (2 mm 幅) を作成した。その後、新鮮な D-MEM に培地を交換すると同時に、全ての添加物を添加後、細胞間距離を経時的に 60 時間まで観察した。実験群はコントロール群、GGsTop® 単独群、TGF- $\beta$ 1 単独群、TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop® 群に加えて、ポジティブコントロールとして、線維芽細胞成長因子である bFGF 単独群の 5 群を設けた (n=4)。GGsTop® 添加濃度は、基礎実験によって炎症関連物質産生量を抑制し、さらに本実験で細胞生存率にも影響がない  $10 \mu\text{g/ml}$  とした。TGF- $\beta$ 1 添加濃度および bFGF 添加濃度については、過去の論文を参考にし、それぞれ  $5 \text{ ng/ml}^{18}$ 、 $10 \text{ ng/ml}^{19}$  とした。

培養ディッシュ底にスケールシールを貼り、培養顕微鏡 Eclipse TS100 (Nikon, Japan ; 倍率 4 倍) およびデジタルカメラ (Cannon, Japan) を用いて撮影した。計測のため撮影はスケールシールないし細胞に焦点を合わせた 2 種類を各群で行った (図 1 A, B)。画像は画像編集ソフトウェア Adobe photoshop (Adobe Systems Incorporated, U.S.A.) にてコントラストを調整したのち、画像解析ソフト Image J ver.1.52 (NIH, U.S.A.) を用いてスケールシールでの既知距離を基準線として (図 1 A) 細胞間の最も短い距離を創傷閉鎖距離 (図 1 B) とした。さらに、24, 48 時間後と 0 時間の変化を確認するため、0 時間との差および短縮率を計算した。計算式は次のとおりである。

0 時間との差 = 0 時間細胞間距離 - 24 時間 (48 時間) 細胞間距離

短縮率 =  $\frac{0 \text{ 時間細胞間距離} - 24 \text{ 時間 (48 時間) 細胞間距離}}{0 \text{ 時間細胞間距離}} \times 100$

#### 6) Type I collagen, matrix metalloproteinase13 (MMP13) および筋線維芽細胞 $\alpha$ 平滑筋アクチン ( $\alpha$ SMA) 遺伝子発現解析

HGF-1 を 60 mm 培養ディッシュに  $2 \times 10^5$  細胞/ディッシュになるように播種し、18 時間培養後、FBS および抗菌薬を含まない新鮮な D-MEM に培地交換し、さらに 24 時間培養した。最初に  $10 \mu\text{g/ml}$  の GGsTop® のみを添加し、5 時間後に  $2 \text{ ng/ml}$  の TGF- $\beta$ 1 を作用させ、さらに 5 時間培養した。Recombinant TGF- $\beta$ 1 作用濃度は、過去の論文を参考に決定した<sup>20,21</sup>)。なお、GGsTop® ならびに TGF- $\beta$ 1 とともに添加しない群をコントロール群とした。さらに、創傷治癒過程で産生される TGF- $\beta$ 1 存在下での GGsTop® の働きを明確にするため、TGF- $\beta$ 1 単独添加群も設け、実験群は 4 群とした (n=4)。

Total RNA を RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany) にて抽出し、PrimeScript™ RT reagent kit

(TaKaRa, Japan)を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし, TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, U.S.A.) と TaqMan® Gene Expression Assay (type I collagen : Hs00164004\_m1, MMP13 : Hs00942584\_m1,  $\alpha$ SMA : Hs00426835\_m1, 18S rRNA : 4318839) をプローブとして用いて, TaqMan probe 法による real-time PCR (StepOnePlus™ ; Applied Biosystems, U.S.A.) にて遺伝子発現解析を行った。

## 7) 統計分析

実験結果は, 平均値 $\pm$ 標準偏差 (mean  $\pm$  SD) で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test を用い, その他の比較は二元配置分散分析の結果から Tukey-Kramer test を用いた。SPSS Version 26.0 (IBM, U.S.A.) にて処理した。

## 2. GGsTop®によるマウス口蓋粘膜創傷治癒への影響

### 1) 実験動物

7 週齢の C57BL/6J 雌マウス (三協ラボサービス株式会社) を specific pathogen free (SPF) の条件下 (室温 23 $\pm$ 1°C, 湿度 60 $\pm$ 10%) で 1 週間の予備飼育の後, 体重が一定になったことを確認し, 実験に使用した。飼育中は固形飼料を飲料水と共に自由摂取とした。全ての動物実験は, 日本大学動物実験運営内規に則り, 松戸歯学部動物実験委員会の承認の下で行った (承認番号 : AP19MAS004-1)。

### 2) 添加物質

GGT 阻害剤 GGsTop® (富士フィルム和光純薬株式会社, Japan) を実験に使用した。

### 3) 口蓋粘膜創傷モデルマウスの作製ならびに治癒過程の観察

口蓋粘膜創傷モデルマウスの作製には 8 週齢のマウス 8 頭を用い, コントロール群ならびに GGsTop®塗布群の 2 群を設定し, 各群 n=4 とした。口腔内への創傷付与は, 塩酸メダトミジン (ドミツール : 日本全薬株式会社, Japan) 0.3 mg/kg, ミダゾラム (サンド株式会社, Japan) 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール (ベトルファール : Meiji Seika ファルマ株式会社, Japan) 5 mg/kg の三種混合麻酔薬をマウス体重 10 g 当たり 0.1 ml を腹腔内投与し, 全身麻酔下で行った。実験にあたり, 図 2A に示したように舌圧排用開口保持器, 体幹および頭部固定装置を作成して用いた。実体顕微鏡下にて (OLYMPUS SZ-PT, Olympus Corporation, Japan) 外科用メスを用い, 両側 M1 近心から M2 遠心までの範囲で硬口蓋粘膜を切除し, 創傷部には術後すぐに GGsTop® 5 mg/kg に調整した 4  $\mu$ l ないし精製水 4  $\mu$ l を含浸させた綿球を留置した。創傷部への綿球留置は, 三種混合麻酔薬をマウス体重 10 g 当たり 0.1 ml を腹腔内投与し全身麻酔下にて 1 日 1 回 (朝) の頻度で 40 日間継続して行った。創傷付与直後から 40 日目まで実体顕微鏡および USB カメラシステム (HOZAN, HOZAN TOOL INDUSTRIAL CO.,LTD. Japan) を用いて最終倍率 $\times$ 5 にて創傷部の写真撮影を行った。

撮影にあたり、再現性を高めるため、口蓋粘膜創傷付与時に用いた実験装置（図 2A）を利用した。経時的な創面面積の変化を画像解析ソフト Image J ver.1.52 (NIH, U.S.A.) を用いて図 2B に示したように M1 ないし M2 の近遠心径をスケールとして創面面積を測定した（図 2C）。

## 結 果

### 1. HGF-1 における GGsTop®による創傷治癒への影響

#### 1) HGF-1 における細胞生存率への GGsTop®の影響

HGF-1 に 0.1~500 µg/ml の濃度で GGsTop®を添加した。全ての濃度においてコントロール群と比べて細胞生存率に有意差を認めなかった（図 3）。

#### 2) HGF-1 における TGF-β1 産生量への GGsTop®の影響

培養上清中における TGF-β1 産生量は、コントロール群と比較して GGsTop®添加群で 8 時間、24 時間ともに有意に高かった（図 4,  $p < 0.01$ ）。

#### 3) HGF-1 における創傷治癒能への GGsTop®の影響（スクラッチアッセイ）

各群から典型的なものを図 5 に示した。細胞間距離の計測は  $n=4$  について行い、24 時間ないし 48 時間と 0 時間での細胞間距離差ならびに短縮率について表 1 および 2 に示した。細胞間距離の差は、最も距離が長い 0 時間から 24 時間ないし 48 時間を減算しているため、値が大きいほど細胞間距離が短縮していることを意味している。つまり、細胞増殖能が高いほど短縮率も高くなる。さらに、細胞増殖能を有するポジティブコントロールである bFGF 単独添加群との間に有意差がないことは細胞増殖能が高いことを意味する。

コントロール群、GGsTop®単独群、TGF-β1 単独群、TGF-β1 存在下 GGsTop®群、bFGF 単独群の全てにおいて写真画像から経時的に創傷閉鎖距離の短縮が認められた（図 5）。Image J Ver.1.52 による計測で 24, 48 時間後ともに、コントロール群に比べて他の全ての群における短縮率は有意に高かった（表 1, 2）。24 時間ではコントロール群以外の群間で有意差を認めなかった。48 時間では群間に差が認められ、ポジティブコントロールである bFGF 単独群と GGsTop®単独群ならびに TGF-β1 存在下 GGsTop®群で有意差を認めず、写真画像においても細胞間距離は 3 群間とも短縮していた。TGF-β1 単独群は bFGF 単独群より有意な短縮率の低下を認め、写真画像でも距離の短縮は少なかった。また TGF-β1 単独群は他の全ての群との間に有意差を認めた。また、60 時間ではコントロール群と TGF-β1 単独群以外の細胞間距離はほぼ閉鎖しており細胞間距離の計測は不可能であった（図 5）

#### 4) HGF-1 における type I collagen, MMP13 ならびに αSMA 遺伝子発現への GGsTop®による影響

Type I collagen および MMP13 遺伝子発現は、コントロール群と比較し TGF- $\beta$ 1 単独群および TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop®群において有意に上昇したが、GGsTop®単独群では有意差を認めなかった (図 6A, B,  $p < 0.05$ )。さらに、TGF- $\beta$ 1 単独群と TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop®群の間に有意差を認めなかった。MMP13 遺伝子発現は、GGsTop®単独群は type I collagen 同様コントロール群との間に有意差を認めず、TGF- $\beta$ 1 単独群と TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop®群では有意に上昇した。TGF- $\beta$ 1 単独群と比べて TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop®群の方が有意に高い発現を認めた (図 6B,  $p < 0.05$ )。

$\alpha$ SMA 遺伝子発現は、いずれの群間にも有意差を認めなかった (図 6C,  $p < 0.05$ )。

## 2. GGsTop®によるマウス口蓋粘膜創傷治癒への影響

口蓋粘膜創傷モデルマウスは毎日体重測定を行った。Day1 で 2-3g 体重減少を認めた後は体重減少を認めず、Day5 には全てのマウスの体重が戻ったことが確認されたため実験を継続した。

各実験群  $n=4$  で行ったが各群内のマウスは全て同様の治癒過程が認められたため、典型的な 1 匹について図 7 に写真画像を示した。なお創面観察は毎日 40 日間行ったが、写真画像でも特徴が明らかに認識できる Day のみを示した。創面面積は Image J にて計測した (表 3)。付与された口蓋粘膜創傷部は、GGsTop®塗布群において、全てのマウスに Day1 で既に左側口蓋を主に全体的に黄色の痂皮の形成が認められたが (図 7 黒色矢印)、創面面積に明らかな変化は認めなかった。Day20, 25 では、両実験群ともに口蓋粘膜創面部後縁 (下端) から突起状に組織の修復が認められていき (黒色点線矢印)、まだ創面部には黄色の痂皮が認められるうえ、上皮形成は不完全であった (黒色点線内)。さらに、創面面積に両群間に差が認められはじめた。Day 30 で GGsTop®塗布群のみ創面は閉鎖し、Day 40 では、両群とも創面は周囲粘膜面までの組織再生の盛り上がりは見られないものの創面は周囲粘膜と同色になり、上皮形成による創面閉鎖が認められた (緑点線内)。Image J Ver.1.52 による創面面積計測値では Day 20 から有意差が認められていた (表 3,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ )

## 考 察

GGT 阻害剤である GGsTop®を 0.1~500  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で HGF-1 に添加した 24 時間後の細胞生存率は、コントロール群と比較して有意な差を認めなかったことから、GGsTop®は HGF-1 に対し細胞死を招くような細胞為害性はないことが示唆された。

湯浅ら<sup>8)</sup>は GGsTop®が添加された皮膚線維芽細胞においてコラーゲンとエラスチン合成の産生誘発、 $\alpha$ SMA の発現上昇、そして TGF- $\beta$ 1 の分泌蓄積がなされたことを報告している。本実験においても、GGsTop®の添加によって HGF-1 における TGF- $\beta$ 1 産生量が時間依存的に増大した。TGF- $\beta$ 1 は、様々な細胞の増殖抑制因子であることが明らかにされていると同時に、細胞分化、アポトーシス、細胞遊走能、ECM タンパク質産生、血管新生、免疫制御、癌化促進など多様な生理活性を有している<sup>22-25)</sup>。線維芽細胞に対しては、細胞の生理活性の



調整や創傷治癒初期における細胞分化の促進，上皮細胞の成熟化の促進に関与することが報告されている<sup>26)</sup>。以上のことから，GGsTop®はTGF-β1によるHGF-1の細胞分化能を促進させる可能性があると考えられた。そこで，我々は次にスクラッチアッセイを用いて創傷治癒には欠かせない細胞増殖能へのGGsTop®の影響を調べた。48時間の細胞間距離短縮率において，ポジティブコントロールであるbFGF単独群に比べてTGF-β1単独群は有意に低く，GGsTop®単独群とTGF-β1存在下GGsTop®群は有意差を認めなかった。これは，スクラッチという創傷を受けたHGF-1においてGGsTop®は細胞増殖能を高める作用があることを意味していると思われる。前述のようにTGF-β1自体に線維芽細胞に対して増殖能を高める作用があり，我々の実験ではGGsTop®によってもTGF-β1の産生量が増大したことから，TGF-β1の存在下でより細胞増殖能が上がると思定した。しかしながら，GGsTop®単独群とTGF-β1存在下GGsTop®群との間に有意差は認めなかった。従って，創傷治癒過程におけるTGF-β1とGGsTop®の関係性を明らかにする必要があると思われる。創傷治癒過程において，誘導されたTGF-β1等の炎症性サイトカインが線維芽細胞を筋線維芽細胞へと分化させECMが形成される<sup>27,28)</sup>。形成されたECMは一過性の炎症の場合は，matrix metalloproteinases (MMPs)によって分解される<sup>29)</sup>。慢性炎症や線維性疾患ではMMPsによる分解よりもECM産生能が上回り，線維化，癒痕化へとつながる<sup>30)</sup>。そこで，我々はECMの一つであるtype I collagen，コラゲナーゼであるMMP13ならびに筋線維芽細胞の主要な構成成分であるαSMAの遺伝子発現に対するTGF-β1ならびにGGsTop®の影響を検証した。TGF-β1とGGsTop®の関係性をより明らかにする目的で，HGF-1をGGsTop®で5時間単独培養した後，Recombinant TGF-β1を追加添加する群を設けた。GGsTop®のみの添加では全ての遺伝子発現についてコントロール群との間に有意差を認めなかった。ECMは，前述のようにTGF-β1によって線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化され産生される。本実験では筋線維芽細胞の指標であるαSMAの遺伝子発現がGGsTop®によって誘導されていないことから，GGsTop®単独では細胞増殖能が高められても，筋線維芽細胞への分化まで影響を及ぼすことが出来ず，そのためにGGsTop®単独群のtype I collagenおよびMMP13の遺伝子発現が誘導されなかった可能性があると考えられる。また本実験においてTGF-β1産生量はTGF-β1のN末端部分であるLAP (latency-associated peptide)を測定している。LAPはTGF-β1を潜在型として存在させる役割をもっており<sup>31)</sup>，GGsTop®によって産生量が促されても，活性型に変える何らかの刺激が必要であるのかもしれない。MMP13遺伝子発現はTGF-β1存在下GGsTop®群においてTGF-β1単独群よりも有意に上昇していることから，Recombinant TGF-β1が追加されたことで，GGsTop®が何らかの働きを促している可能性があると考えられる。これは，GGsTop®の本来持つ特徴に起因するものであると思われる。GGT阻害剤として，天然物acivicinが臨床応用されているが，毒性が極めて強く<sup>10)</sup>，さらにGGTを不可逆的に阻害するため，GSH生合成をも完全に阻害する。一方，GGsTop®は，毒性がなく反応機構依存的にGGTを阻害するよう開発され，さらにヒトGGTに対する阻害活性が強いため極めて選択性が高いことが証明されている<sup>10,32,33)</sup>。つまり，GGsTop®は細胞の状態によって，必要な

時に GGT を阻害し、必要のない時には阻害をしないという特徴が、Recombinant TGF- $\beta$ 1 の追加作用によって現れた可能性があると思われる。一方、type I collagen は TGF- $\beta$ 1 が追加作用されても有意に上昇しなかった。これは、コラゲナーゼである MMP13 が TGF- $\beta$ 1 存在下 GGsTop®群で上昇していることから、MMP13 によって抑制された可能性も考えられる。MMP13 ノックアウトマウスにおいて、創傷治癒不全、上皮細胞の遊走抑制、血管新生の抑制がみられるとの報告<sup>34)</sup>があることから、TGF- $\beta$ 1 存在下における GGsTop®添加によって MMP13 遺伝子発現が増大したことは GGsTop®の創傷治癒促進剤としての有用性が高いことを示していると考えられる。 $\alpha$ SMA は、皮膚や腎臓などの線維芽細胞で TGF- $\beta$ 1 によって上昇するとの報告があるものの<sup>35,36)</sup>、本研究においては HGF-1 における  $\alpha$ SMA は TGF- $\beta$ 1 単独群においても遺伝子発現の上昇を認めなかった。Guo ら<sup>37)</sup>は、GF では皮膚線維芽細胞と比較して TGF- $\beta$ に対する反応性が低く  $\alpha$ SMA の上昇が認められず、線維化や炎症などに関与し強力な血管収縮作用を有するペプチドである endothelin-1 や、ECM との細胞接着を媒介するインテグリンや成長因子を調節することで細胞増殖や分化に関与する cezanne / Focal Adhesion Kinase (FAK) シグナル伝達にその原因があると報告している。さらに彼らは、cezanne / FAK シグナル伝達を介して  $\alpha$ SMA の発現を促す TGF- $\beta$ 1 を調整している miR-218 の発現が GF では減弱しており、TGF- $\beta$ 1 に対する応答性の低さにつながっているのではないかとしている。今後このような細胞シグナル伝達系を追求する必要があると考えている。

本動物実験において、口蓋粘膜に付与された創傷は、GGsTop®塗布によって、早期に治癒過程が開始された。Liu ら<sup>17)</sup>はマウス胎児線維芽細胞 (NIH 3T3) において、TGF- $\beta$ 1 が GSH を減少させ、それによってさらに TGF- $\beta$ 1 によるコラーゲン産生が促されると報告している。本実験では GSH に関する実験を行っていないが、GGsTop®は GGT 阻害剤であり、GSH との関係性を明らかにすることは今後必須の課題であると考えている。

培養細胞実験ならびに動物実験の結果から、口腔粘膜の創傷治癒促進に GGsTop®は有用性が高いと思われる。免疫機能低下、低栄養状態、さらには糖尿病や臓器移植患者などにおける抜歯後治癒不全や義歯性潰瘍などに対して有用性が高いのではないかと考えられる。今後臨床応用にむけて、TGF- $\beta$ 1 との関係性を明らかにするため、GGsTop®の細胞内シグナル伝達系への影響や細胞内外 GSH や活性酸素種との関係性を含めて、創傷治癒過程における増殖期はもとより炎症期、成熟期における GGsTop®の影響について詳細に検証を進める価値はあると思われる。

## 結 論

GGT 阻害剤である GGsTop®は HGF-1 に対して、細胞生存には影響を与えず、TGF- $\beta$ 1 産生量を増大させる。TGF- $\beta$ 1 存在下において、MMP13 の遺伝子発現を誘導することで、細胞の創傷治癒能を促進させる可能性があると思われた。動物実験においても口蓋粘膜の創傷治癒を促進させたことから、歯肉をはじめとした口腔粘膜における創傷治癒促進剤と

して GGsTop®は有用な働きをされると考えられた。

## COI

本研究内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業として、株式会社ナールスコーポレーションより、過去3年間にわたり、研究代表者田中陽子、研究題目「口腔常在菌による慢性炎症に対するナールスゲンと周辺物質の影響」に6,000,000円の資金提供を受けている。

## 参考文献

- 1) Turabelidze A, Guo S, Chung AY, et al. Intrinsic Differences between Oral and Skin Keratinocytes. PLoS One 2014;9:e101480.
- 2) Kuroki S, Yokoo S, Terashi H, et al. Epithelialization in oral mucous wound healing in terms of energy metabolism. Kobe J Med Sci 2009;55:E5-15.
- 3) desJardins-Park HE, Mascharak S, Chinta MS, et al. The Spectrum of Scarring in Craniofacial Wound Repair. Front Physiol 2019;10:322.
- 4) 金 博和, 岡 俊一, 見崎 徹 抜歯後に全身状態が急激に増悪した高齢患者の一例, 有病者歯科医療 2002;11:7-13.
- 5) 安彦善裕, 斎藤正人, 長澤敏行 他. 糖尿病における口腔粘膜の創傷治癒促進のメカニズムについて 北海道医療大学歯学雑誌 2010;29:25-32.
- 6) 黒田直正, 佐藤広一, 川島 康 抜歯窩治癒不全と著名な歯牙の動揺を呈した小児急性リンパ性白血病の1例 歯科学報, 1992;92:691-706.
- 7) Shimamura Y, Takeuchi I, Terada H, et al. Therapeutic Effect of GGsTop, Selective Gamma-glutamyl Transpeptidase Inhibitor, on a Mouse Model of 5-Fluorouracil-induced Oral Mucositis. Anticancer Res 2019;39:201-6.
- 8) 湯浅 (小島) 明子, 林 綸子, 韓 立友, 他.  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)阻害剤によるコラーゲンおよびエラスチン産生能の亢進効果とそのメカニズム. 日本化粧品学会誌 2012;36:93-100.
- 9) Nakajima M, Watanabe B, Han L, et al. Glutathione-analogous peptidyl phosphorus esters as mechanism-based inhibitors of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase for probing cysteinyl-glycine binding site. Bioorg Med Chem 2014;22:1176-94.
- 10) 渡辺文太, 平竹 潤. グルタチオン代謝とチオールケミストリー. 化学と生物 2015;53:354-61.
- 11) Emdin A, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. Circulation 2005;112:2078-80.
- 12) Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, et al. Gamma-glutamyltransferase-dependent prooxidant

reactions: a factor in multiple processes. *BioFactors* 2003;17:187-98.

- 13) Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37:1528-42.
- 14) Mutsaers SE, Bishop JE, McGruther G, et al. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:5-17.
- 15) 野村 正. 口腔内の創傷治癒と瘢痕. *Jpn. Soc. Laser Dent* 2016;27:21-6.
- 16) Fang Y, Svoboda KKH. Nicotine inhibits myofibroblast differentiation in human gingival fibroblasts. *J Cell Biochem* 2005;95:1108-19.
- 17) Liu RM, Liu Y, Forman HJ, et al. Glutathione regulates transforming growth factor-beta-stimulated collagen production in fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:121-8.
- 18) Sufaru IG, Beikircher G, Weinhaeusel A, et al. Inhibitors of DNA methylation support TGF- $\beta$ 1-induced IL11 expression in gingival fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci* 2017;47:66-76.
- 19) Padial-Molina M, Volk SL, Rios HF. Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor- $\alpha$  and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides *J Periodont Res* 2014;49:405-14.
- 20) Chung Y, Fu E. Crosstalk between Shh and TGF- $\beta$  Signaling in Cyclosporine-Enhanced Cell Proliferation in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One* 2013;8:e70128.
- 21) Arancibia R, Oyarzún A, Silva D, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits transforming growth factor- $\beta$ -stimulated myofibroblastic differentiation and extracellular matrix production in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2013;84:683-93.
- 22) Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol* 2015;47:54-65.
- 23) 駒井俊彦, 岡村僚久, 山本一彦, 他. TGF- $\beta$ による免疫応答制御. *J. Clin. Immunol* 2016;39:51-8.
- 24) Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- $\beta$  family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:pri:a022145.
- 25) Liu RM, Desai L. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol* 2015;6:565-77.
- 26) Penn JW, Grobelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma* 2012;2:18-28.
- 27) Darby IA, Laverdet B, Bonté F, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014;7:301-11.
- 28) Ivey MJ, Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. *Circ J.* 2016;80:2269-76.
- 29) Giannandrea M and Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech* 2014;7:193-203.

- 30) Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:786–801.
- 31) 宮園浩平 TGF- $\beta$  ファミリーからみた内科学. *日本内科学会雑誌* 2016;105:1558-64.
- 32) Kamiyama A, Nakajima M, Han L, et al. Phosphonate-based irreversible inhibitors of human  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT). GGsTop is a non-toxic and highly selective inhibitor with critical electrostatic interaction with an active-site residue Lys562 for enhanced inhibitory activity. *Bioorg Med Chem* 2016;24:5340-52.
- 33) Han L, Hiratake J, Kamiyama A, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of  $\gamma$ -Phosphono Diester Analogues of Glutamate as Highly Potent Inhibitors and Active Site Probes of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. *Biochemistry* 2007;46:1432-47.
- 34) Hattori N, Mochizuki S, Kishi K, et al. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis, and contraction in mouse skin wound healing. *Am J Pathol* 2009;175:533-46.
- 35) Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, et al. Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum* 2004;50:1305-18.
- 36) Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, et al. Significance of  $\alpha$ -SMA in myofibroblasts emerging in renal tubulointerstitial fibrosis. *Histol Histopathol* 2011;26:855-66.
- Guo F, Carter DE, Leask A. miR-218 regulates focal adhesion kinase-dependent TGF $\beta$  signaling in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2014;25:1151-8.

## 表タイトル

表 1 0 時間との閉鎖距離差および短縮率

表 2 閉鎖距離および短縮率における統計処理結果

\* : p<0.05

表 3 マウス口蓋粘創面面積

各群 n=4 で行い, それぞれの創面面積を Image J Ver.1.52 で測定した平均値と標準誤差を示す。\* : p<0.05, \*\* : p<0.01

## 図説明

図 1 スクラッチアッセイにおける細胞間距離測定方法

スクラッチアッセイの細胞間距離は, 培養ディッシュ底にスケールシールを貼り, スケールシールないし細胞に焦点を合わせて各群, 各時間 2 枚ずつ撮影した。スケールシールの既知距離 (1 辺=1 mm) を基準線とした (A)。Image J Ver.1.52 を用いて細胞間距離を計測した (B)。

## 図2 マウス口蓋粘膜創傷方法ならびに創面面積計測方法

コントロール群および GGsTop®塗布群ともに、n=4 ずつとし、口蓋粘膜への創傷付与は、創面部の大きさをそろえるため、マウス体幹および頭部固定、術野の確保用開口保持器/舌圧排装置を作成し使用した (A)。創面面積の撮影においても撮影環境を整え再現性を確保するために同装置を用いた (A)。創面面積の計測のために金属メッシュの長さを計測した後、マウス口腔内に挿入し、全てのマウスの M1 および M2 の近遠心径を Image J Ver.1.52 を用いて行った (B)。撮影時に明瞭な M1 ないし M2 を選択し、近遠心径を既知基準として Image J Ver.1.52 にて創面面積を計測した (C)。

## 図3 GGsTop®による Cell viability への影響

HGF-1 を 6 well 培養プレートに播種し、GGsTop®を 0.1~500 µg/ml の濃度で添加 24 時間後に、Invitrogen™ Countess™ (Invitrogen, U.S.A.)にて生細胞数を測定した。全ての濃度において細胞生存率に有意差を認めなかった (n=4)。

## 図4 HGF-1 における TGF-β1 産生量への GGsTop®の影響

HGF-1 に GGsTop®を添加した後、8 時間および 24 時間培養後に回収した培養上清中における TGF-β1 産生量を ELISA 法にて測定した。両群とも時間依存的に TGF-β1 の産生量は増大した。GGsTop®添加によって TGF-β1 産生量はコントロール群と比較して有意に上昇した。(n=4) \*\*p<0.01

## 図5 HGF-1 における創傷治癒能への GGsTop®の影響 (スクラッチアッセイ)

実験群は、コントロール群、GGsTop®単独群、TGF-β1 単独群、TGF-β1 存在下 GGsTop®群、bFGF 単独群とし各群、GGsTop®10 µg/ml, TGF-β1 5 ng/ml, bFGF 10 ng/ml を添加した。全ての群にて、創面閉鎖距離は経時的に短縮した。bFGF 単独群は最も早期に短縮し、GGsTop®単独群および、TGF-β1 存在下 GGsTop®群の短縮はコントロール群よりも亢進し、TGF-β1 存在下 GGsTop®群の方が高い亢進が認められた。60 時間では、コントロール群および TGF-β1 単独添加群以外では細胞間距離が計測できなかった。0 時間と 24 時間、48 時間における短縮率を算出し (表 1)、二元配置分散分析を行った後に多重比較 Tukey-Kramer を SPSS にて行った (表 2)。(n=4) \*p<0.05

## 図6 HGF-1 における type I collagen, MMP13, αSMA 遺伝子発現への GGsTop®の影響

Type I collagen は TGF-β1 単独群、TGF-β1 存在下 GGsTop®群でコントロール群よりも有意に高く、両群間では有意差を認めなかった (A)。MMP13 は、TGF-β1 単独群および TGF-β1 存在下 GGsTop®群でコントロール群よりも有意に高く、両群間では TGF-β1 存在下 GGsTop®群の方が有意に高かった (B)。αSMA は全ての群間において有意差を認めなかつ

た (C)。\* $p < 0.05$

#### 図7 GGsTop®によるマウス口蓋粘膜創傷治癒への影響

コントロール群, GGsTop®塗布群の2群を各群  $n=4$  で設定し, 口蓋粘膜創傷付与後, 毎日塗布を行うと共に創面の写真撮影(最終倍率5倍)を行った。明瞭に確認できるM1ないしM2の近遠心径を基準線とし, Image Jver.1.52にて創面面積の計測を全てのマウスで行った(表3)。写真は典型例を示した。GGsTop®塗布群において, 群内の全てのマウスにおいて創部に黄色の痂皮形成がDay1に認められ(黒矢印), コントロール群では認められなかった。Day 20, 25では創面面積に違いが認められた。

#### 英文抄録:

Wound healing in the oral mucosa is clinically distinguished from skin healing in terms of both its rapidity and relatively minimal to no scar formation. However, wound healing failure induces oral function decline. The condition of chronic non-healing wounds induces eating disorder, communication obstacles, and breathing difficulty. These symptoms cause severe life-threatening as well as reducing patients' quality of life. It is easy to have these phenomena in the individuals with disability and the elderly because of their malformation, dysfunction and immunodeficiency. According to previous study, GGsTop®,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) inhibitor, suppressed reactive oxygen species and induced the production of collagen and elastin in dermal fibroblasts. In addition, Shimamura et al reported that GGsTop® was highly valuable for use as a treatment of oral mucositis. It was considered that GGsTop® would be useful for oral wound healing. Therefore, we studied the effect of GGsTop® with/without TGF- $\beta$ 1 in gingival fibroblasts HGF-1. In addition, we demonstrated the efficacy of GGsTop® on wound healing of palatal mucosa in mice. The cell migration of HGF-1 was enhanced with GGsTop® by scratch assay. GGsTop® with TGF- $\beta$ 1 strongly promoted wound healing. The production of TGF- $\beta$ 1 in HGF-1 was enhanced by GGsTop®, which induced the gene expressions of type I collagen and matrix metalloproteinase 13. However,  $\alpha$ SMA gene expression was not enhanced. In the wild type mice, the wound healing process of palatal mucosa was faster than in the control. Scarring was not seen. It was considered that GGsTop® was useful for treatment of oral wound healing.

#### 対訳和文:

口腔粘膜における創傷治癒は, 比較的治癒が早く, 痂痕化も見られないなど皮膚よりも良好である。しかしながら創傷治癒の遅延が起きた場合, 口腔機能不全を誘発する。慢性的な創傷治癒不全は, 栄養摂取障害, コミュニケーション障害, 呼吸障害を引き起こすことになる。このような状況は, QOLの低下だけでなく生命を脅かす原因となる。障害児者の場合, 奇形や, 機能異常, 免疫応答異常などから, このような状況になりやすい。過去の報告によ

ると、 $\gamma$  グルタミルトランスペプチダーゼである GGsTop® は皮膚由来線維芽細胞において、活性酸素種の産生を抑制し、コラーゲンやエラスチンの産生を促すとされている。さらに、Shimamura は GGsTop® が口内炎の治療薬として有用性が高いことを報告している。これらのことから、GGsTop® は口腔粘膜創傷治癒にも効果があると思われた。それゆえ、我々は歯肉線維芽細胞である HGF-1 を用いて TGF- $\beta$ 1 との関係性を含めて GGsTop® の影響について検証した。さらに、マウス口蓋粘膜創傷に対する GGsTop® 塗布による効果について実証した。スクラッチアッセイによって、HGF-1 の創傷閉鎖能が GGsTop® によって高められ、さらに TGF- $\beta$ 1 存在下でその機能が高められる可能性があることが示された。HGF-1 は GGsTop® によって誘発された TGF- $\beta$ 1 を介して type I collagen や MMP13 の遺伝子発現が増大すると思われた。しかしながら  $\alpha$ SMA の遺伝子発現は増大されなかった。マウスの実証実験では、付与された口蓋粘膜創傷は GGsTop® 塗布群の方がコントロール群に比べて治癒が早かった。癒痕も認められなかった。口腔粘膜創傷治癒に GGsTop® は有用であると思われる。

表 1

	Control	GGsTop®	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1/GGsTop®	bFGF
0 hr(mm)	2.146( $\pm$ 0.081)	2.248( $\pm$ 0.015)	2.229( $\pm$ 0.017)	2.243( $\pm$ 0.009)	2.123( $\pm$ 0.041)
24hrs-0hr(mm)	0.361( $\pm$ 0.096)	1.063( $\pm$ 0.050)	0.944( $\pm$ 0.077)	1.026( $\pm$ 0.023)	0.961( $\pm$ 0.028)
24hrs短縮率(%)	16.703( $\pm$ 4.064)	47.285( $\pm$ 2.020)	42.335( $\pm$ 3.140)	45.749( $\pm$ 0.996)	45.280( $\pm$ 0.885)
48hrs-0hr(mm)	0.702( $\pm$ 0.086)	1.584( $\pm$ 0.019)	1.298( $\pm$ 0.069)	1.601( $\pm$ 0.008)	1.673( $\pm$ 0.022)
48hrs短縮率(%)	32.603( $\pm$ 2.821)	70.457( $\pm$ 0.548)	58.238( $\pm$ 3.364)	71.367( $\pm$ 0.102)	78.803( $\pm$ 1.087)

表 2

		24hrs-0hr・短縮率					48hrs-0hr・短縮率				
		Control	GGsTop®	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1/ GGsTop®	bFGF	Control	GGsTop®	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1/ GGsTop®	bFGF
24hrs-0hr 短縮率	Control	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	GGsTop®	*		No	No	No	*	*	*	*	*
	TGF- $\beta$ 1	*	No		No	No	*	*	*	*	*
	TGF- $\beta$ 1/GGsTop®	*	No	No		No	*	*	*	*	*
	bFGF	*	No	No	No		*	*	*	*	*
48hrs-0hr 短縮率	Control	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	GGsTop®	*	*	*	*	*	*		*	No	No
	TGF- $\beta$ 1	*	*	*	*	*	*	*		*	*
	TGF- $\beta$ 1/GGsTop®	*	*	*	*	*	*	No	*		No
	bFGF	*	*	*	*	*	*	No	*	No	



表 3

	コントロール群	GGsTop® 塗布群
Day 0	10.799(±0.734)	10.629(±0.375)
Day 1	8.938(±0.274)	8.912(±0.337)
Day 20**	4.449(±0.1182)	3.184(±0.856)
Day 25*	2.571(±0.112)	1.863(±0.091)

図 1

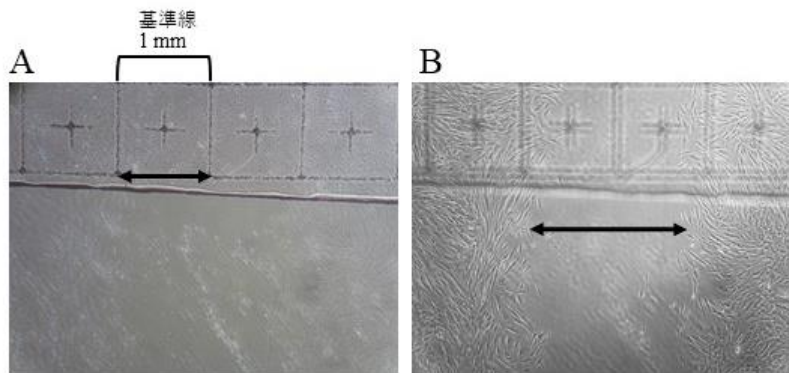


図 2

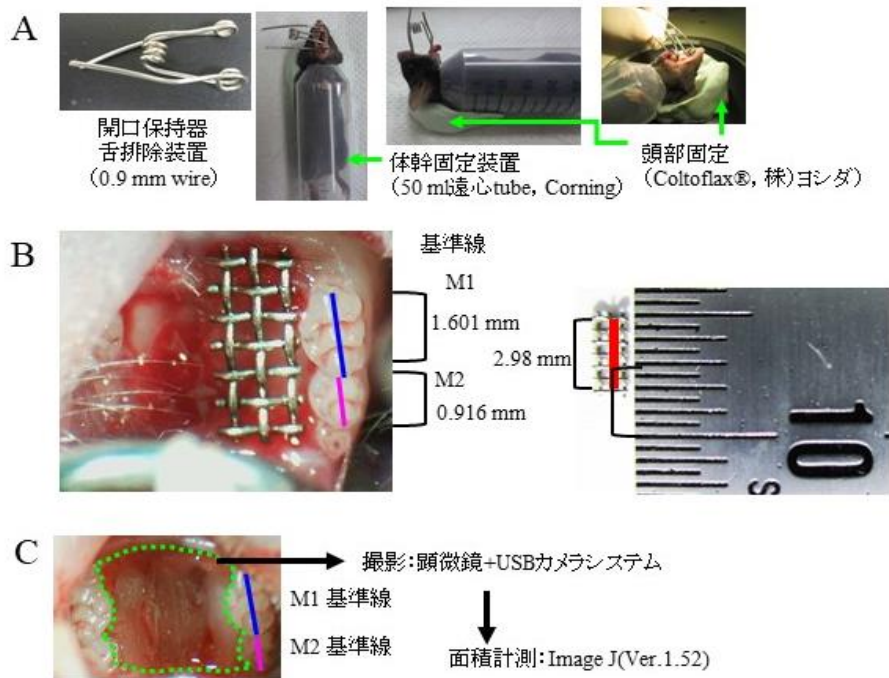


图 3

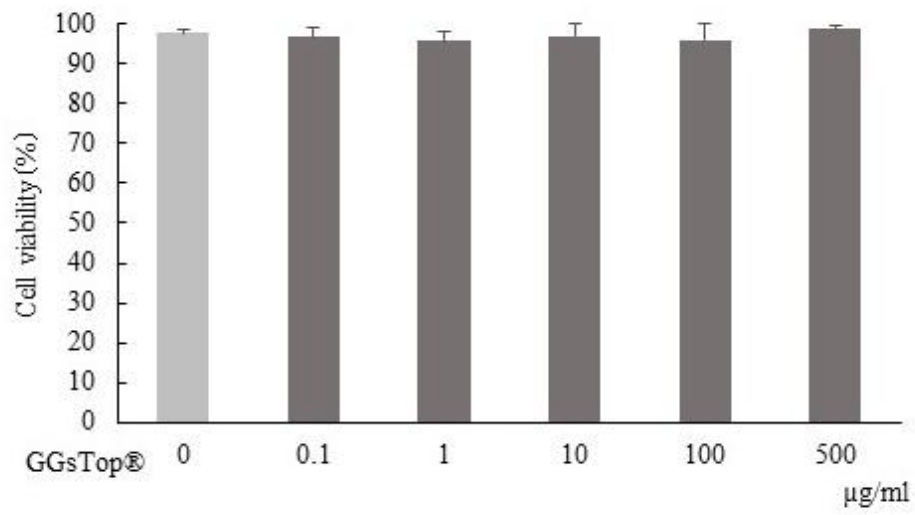


图 4

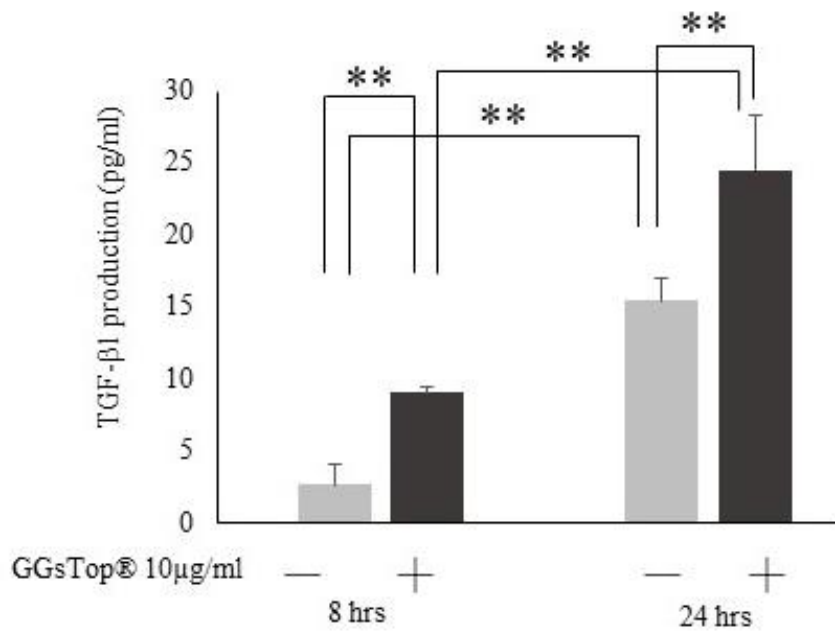
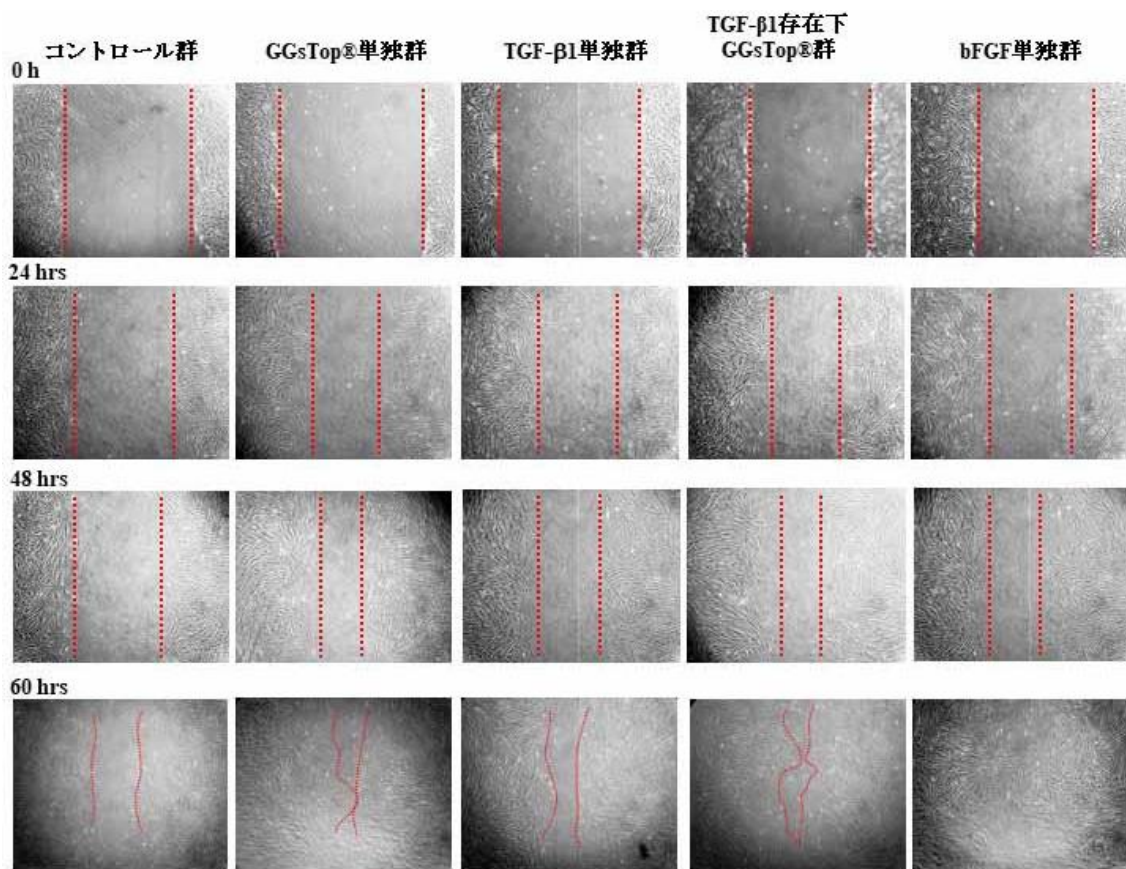


図 5



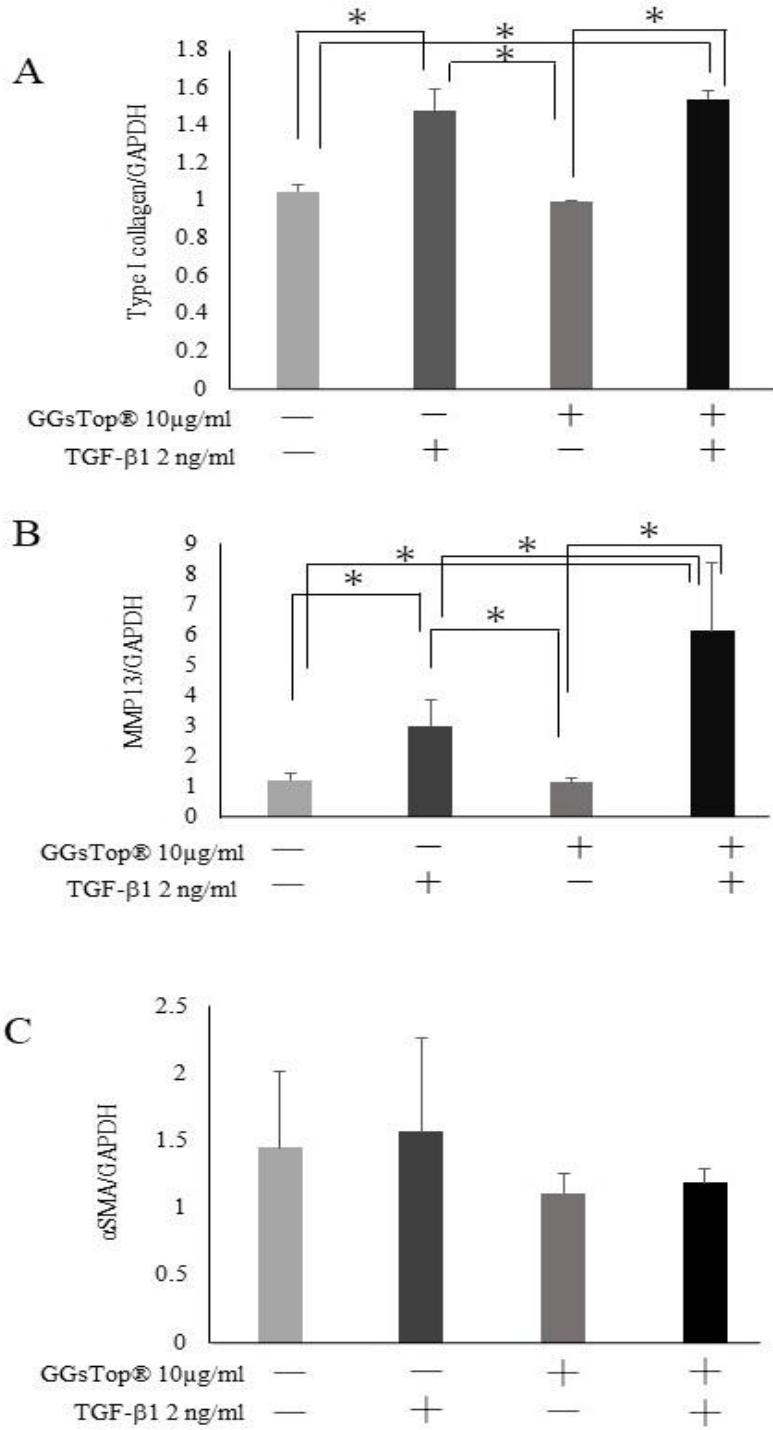


図 7

