

## 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ィー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 LPS 刺激による IL-6、IL-8、MCP-1 の産生に及ぼすアナンダマイドの影響を検討した。
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  $16.4\text{ng}$  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くない。

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)