

論文要旨

Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing

〔 歯周組織治癒におけるエンドカンナビノイドシステムの関与 〕

小菌 清香

【序論および目的】

エンドカンナビノイドシステム (ECS) とは生体内マリファナ様脂質メディエーターである内因性カンナビノイド (現在アナンダマイド及び2-アラキドノイルグリセロールが同定されている) がその特異的レセプターである CB1、CB2 レセプターを介して生体におよぼす作用である。ECS は抗炎症作用や免疫作用など生体防御の調節機能をもつことが知られている。さらに小腸や肝臓、脊髄などにおいて ECS の組織治癒への関与も示唆されている。

歯周病は口腔内細菌により惹起される歯周組織破壊を伴う慢性炎症性疾患であり、近年では心血管障害や糖尿病などの全身性疾患の病態との関連が報告されている。したがって、治療後の歯周組織治癒のメカニズムを理解することは、重要であると思われる。一般的に歯周治療後の組織治癒には様々なサイトカインや成長因子が関与している。ECS に関する歯周組織における生理的役割については NF- κ B の経路阻害を介し歯周組織の炎症を調節していることが示されている。しかし、ECS の歯周組織治癒への関与については明らかにされていない。そこで、歯周組織の治癒における ECS の生理的な役割を解明することを本研究の目的とした。

【材料および方法】

本研究は鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会および鹿児島大学動物実験委員会の倫理審査承認のもと行った。

・歯周組織治癒過程における歯肉溝滲出液 (GCF) 中のカンナビノイド量測定

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院成人系歯科センター歯周病科外来に通院中の患者 (平均60.7歳、男性7名 女性3名 計10名) からGCFを採取した。GCFはペリオペーパーを用いて歯周外科処置前及び処置後3日、1、2週後に採取した。採取後、高速液クロマトグラフィーによりGCF中の2-アラキドノイルグリセロール (2-Ag) およびアナンダマイド (AEA) 量を測定した。

・ラット歯周創傷モデルにおける CB1、CB2 の発現

ラット (Wister 系、雄、12 週齢、n=4) の上顎第一臼歯近心に歯周組織欠損を作製した。術後 2 週目に屠殺し、組織切片を作製後免疫組織化学染色により CB1、CB2 レセプターの発現を調べた。

・ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) の培養

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院成人系歯科センター歯周病科に来院した歯周病患者 (平均61.3歳、女性3名) の歯周外科手術時に健康歯肉組織を採取し、HGFsを培養した。細胞は10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、5%CO₂-95% air中、37°Cで培養した。実験には継代培養3~5代の細胞を用いた。

・細胞増殖測定

培養HGFs (6.0×10³ cells/well) を96 well microplate にて10%FBS含有DMEM培地で24時間培養後、0.5%FBS含有DMEMにて24時間starvationした。その後カンナビノイドレセプターアンタゴニスト (AM251;250nM、AM630 ; 250nM) またはMEK、p38MAPK、PI3-Kシグナルインヒビター (U0126;500nM、SB203580;250nM、LY294002;500nM) の存在あるいは非存在下で1時間前処

理後、AEA (500nM)、カンナビノイドレセプターアゴニスト (CP55940; 100nM) で刺激し、24時間刺激後のHGFsの細胞増殖をBrdU ELISAキットを用いて測定した。

・スクラッチテスト

chamber slide上でコンフルエントに達したHGFs monolayerに200 μ lピペットチップの先端で直線的に擦過した。AM251 (250nM)、AM630 (250nM)、U0126 (500nM)、SB203580 (250nM)、LY294002 (500nM)の存在あるいは非存在下で1時間処理後、CP55940 (100nM) で24時間刺激した。擦過直後及びCP55940刺激24時間後に写真撮影し、創の閉鎖の割合を調べた。

・ウェスタンブロット分析

HGFs (0.5 \times 10⁶ cells/well) を径100mm培養皿にて10%FBS含有DMEM培地で24時間培養後、0.5%FBS含有DMEMにて24時間starvationし、CP55940 (100nM) で7.5、15、30、60分刺激した。CP55940がERK、p38MAPKおよびAktのリン酸化に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて分析した。

・統計分析 一元配置分散分析 (One-way ANOVA) にて統計処理を行った。有意差をP<0.05とした。

【結果】

- 1) GCF中のAEA量は、歯周外科処置前66.2ng/site、外科処置3日後178ng/siteで、処置前と比較して処置3日後に有意に増加することが示された。
- 2) ラット創傷部の線維芽細胞、マクロファージ様細胞においてCB1、CB2陽性を認めた。
- 3) AEA刺激によるHGFsの有意な増殖が示され、CB1およびCB2アンタゴニストによりその作用が有意に抑制された。
- 4) CP55940刺激によりHGFsの創の閉鎖が有意に促進され、CB1およびCB2アンタゴニストによりその作用が有意に抑制された。
- 5) CP55940刺激により、ERK1/2、p38MAPK、Aktのリン酸化が誘導された。
- 6) CP55940刺激によるHGFsの増殖、スクラッチテストにおける創の閉鎖がMEK1/2、p38MAPK、PI3-Kのシグナルインヒビターにより抑制された。

【結論及び考察】

本研究では歯周組織創傷部において有意にAEAレベルが増加することを示した。最近の研究において、脊髄の損傷部位では受傷後早期におけるAEAレベル増加が認められ、脊髄損傷の治癒過程におけるAEAの関与が示唆されている。本実験も同様の結果を示していることからAEAが歯周組織の治癒過程に関与している可能性が考えられた。

ラット創傷部の肉芽組織内に限局して線維芽細胞及びマクロファージ様細胞において、CB1およびCB2レセプターの発現が認められた。このことから、カンナビノイドレセプターが結合組織の治癒に関与している可能性が考えられる。歯周病によって破壊された結合組織の再構築には線維芽細胞の増殖が必要不可欠である。このため、AEAがHGFs増殖に及ぼす影響を調べたところ、本研究ではAEAがCB1、CB2を介しHGFsの増殖を促進することが明らかとなった。また今回、創傷治癒の評価法としてスクラッチテストを用いた。CB1/CB2レセプターアゴニストがHGFsの創の閉鎖を促進した。これらのことからECSはHGFsの増殖調節を介して歯周組織治癒に関与する可能性が考えられる。加えて、CB1/CB2レセプターアゴニストによるHGFs増殖、創の閉鎖はERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktのシグナルインヒビターにより有意に抑制されたことにより、増殖のメカニズムとして、ERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktシグナル伝達経路を介している事が考えられる。

以上のことより、ECSはERK1/2、p38MAPK、PI3-K/Aktシグナル伝達経路を介し、HGFs増殖を調節することにより歯周組織の治癒において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。