

論 文 要 旨

Daisaikoto restores mitochondrial function and suppresses inflammation induced by periodontal bacteria-derived lipopolysaccharides.

大柴胡湯はミトコンドリア機能を改善し、
歯周病原細菌由来リポ多糖によって惹起される炎症を抑制する

戸澤 紗圭

【序論及び目的】

歯周病は歯周病原細菌によって惹起される炎症性疾患であるが、その中でも *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖 (*P.g* LPS) が炎症反応に関与していることは、特に重要である。また、歯周病の悪化が糖尿病をはじめとする全身疾患に悪影響を及ぼすこと、ミトコンドリア機能障害が糖尿病および歯周病の発症と進行に関係することも報告されている。

私たちはこれまでに神経系の細胞を用い、*P.g* LPS 刺激が神経炎症を惹起することや、活性酸素種 (ROS) を増大させること、ミトコンドリア内膜電位 (Ψ_m) の低下や、ミトコンドリア内 Fe^{2+} ($mtFe^{2+}$) 量の増大が引き起こされ、ミトコンドリア機能障害が惹起されること、ある種の漢方薬やホルモンが *P.g* LPS 刺激による神経炎症やミトコンドリア機能障害を改善させることができることなどを明らかにしてきた。しかしながら、口腔内でも *P.g* LPS 刺激によって炎症反応やミトコンドリア機能障害が起きるのか、また、これらを改善できる薬物候補などについては十分に検討されていない。

そこで本論文では、*P.g* LPS によって惹起される口腔内の炎症反応に対する薬物候補として、抗炎症作用が報告され、且つミトコンドリア機能を改善させると報告されている大黄を含み、さらに効能として糖尿病の改善効果が挙げられている大柴胡湯 (DST) に注目し、DST が *P.g* LPS によって惹起される炎症モデルに有効であるかを検討することとした。さらに、大黄は含まないものの共通する生薬を多く含み、歯肉線維芽細胞で抗炎症効果が報告されている小柴胡湯 (SSK)、歯科でも保険適応のある排膿散及湯 (HNST)、これら3つの漢方薬における効果を比較し、DST に優位性があるかを検討した。

【材料及び方法】

細胞は Human periodontal ligament fibroblasts (HPLF; ScienCell Research Laboratories) を用いた。*P.g* LPS (InvivoGen) 刺激前後に30分間 DST、SSK、HNST (株式会社ツムラ) およびそれぞれの主要有効成分で処理し、1) 抗炎症効果と 2) ミトコンドリア機能改善効果について、以下の項目を調べた。

- 1) *P.g* LPS 刺激 3 時間後のインターロイキン 6 (*IL-6*)、シクロオキシゲナーゼ 2 (*COX2*)、プロスタグランジン E2 合成酵素 (*PGES2*) 遺伝子発現量の変化を定量 PCR にて解析し、比較した。

- 2) ①ミトコンドリア内膜電位 [Ψ_m ; JC-10 (Bio quest)]、ミトコンドリア内鉄イオン量 [mtFe²⁺; Mito-FerroGreen (同仁科学研究所)]、ミトコンドリア内活性酸素種量 [mtROS; mitoSOX (同仁科学研究所)]を蛍光顕微鏡で観察し、輝度を Fiji (NIH) にて半定量画像解析した。
- ②細胞内 ATP 量を ATP Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit (Sigma-Aldrich) にて検出した。また、培養細胞を Mitochondrial Isolation Kit for Cultured CELLS (abcam) にて、ミトコンドリア分画、細胞質分画に分け、それぞれの ATP 量を測定した。
- ③解糖系律速酵素遺伝子ヘキソキナーゼ 1 (*HK1*)、ホスホフルクトキナーゼ (*PFK*) 遺伝子発現量の変化を定量 PCR にて解析した。

【結果】

- 1) *P.g* LPS 刺激により *IL-6*、*COX2*、*PGES2* の遺伝子発現は上昇したが、DST、SSK、HNST、SSK にのみ含まれない芍薬の有効成分であるペオニフロリン (*Pae*)、枳実の有効成分であるシネフリン (*Syn*)処理により減少した。この抗炎症作用は事前・事後処理ともに効果が見られたが、DST、HNST 処理は SSK 処理に比べ、*PGES2* の抑制効果が有意に高く、DST 処理は HNST 処理に比べ、*IL-6* の抑制効果が有意に高かった。また、*Syn* 処理よりも *Pae* 処理の方がこれら抗炎症性マーカーの発現の抑制効果が高かった。
- 2)①*P.g* LPS 刺激により mtROS、mtFe²⁺量は増大、 Ψ_m は低下したが、DST 処理によりコントロールレベルまで改善した。さらにミトコンドリア機能改善作用が報告され、DST にのみ含まれる大黄の有効成分であるセンノシド A (*Sen*) 処理時では mtROS、mtFe²⁺量、 Ψ_m をコントロールレベルまで改善した。
- ②DST 処理は *P.g* LPS 刺激によって低下した全細胞・ミトコンドリア分画 ATP 量を回復させた。一方、細胞質分画 ATP 量は *P.g* LPS 刺激によって上昇し、DST 処理により低下した。
- ③DST 処理により *P.g* LPS 刺激によって上昇した *HK1*、*PFK* の発現を低下させた。これらの効果は SSK 処理では得られなかった。

【結論及び考察】

DST は SSK および HNST と比較して優れた抗炎症作用を示した。SSK の効果が DST や HNST よりも弱かったのは、SSK に抗炎症効果が高いと報告されている *Pae* や *Syn* が含まれていないためと考えられる。

また、DST は *P.g* LPS によるミトコンドリア機能障害を改善することができた。これは DST が、ミトコンドリア機能改善作用が報告されている *Sen* をこれら 3 つの漢方薬の中で唯一含むためであると推察される。

そして細胞質分画 ATP 量のみ *P.g* LPS 刺激によって上昇したのは、低下したミトコンドリア分画の ATP 量つまりミトコンドリア機能低下を代償するために解糖系が亢進したためと考えられる。

さらに、DST は甘草を含まないため、その有効成分であるグリチルリチンによる偽アルドステロン症などの副作用を回避できることが期待される。

本研究は細胞実験のみで行っているため今後は動物実験でも同様の効果が得られるのか検討する必要がある。また、どのように *Sen* が作用し、ミトコンドリア機能を改善しているのか未だ不明である。さらに DST は事前処理でも事後処理と同様の抗炎症効果・ミトコンドリア機能改善効果を認めたため、歯周病治療予防への活用が期待できる。

以上より、DST は抗炎症作用とミトコンドリアの機能改善作用を示し、歯周病治療に有用であることが示唆された。