

氏 名	喜多村 洋幸
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第187号
学位授与の日付	2015年2月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	LPS 刺激ヒト歯肉線維芽細胞における Extracellular Signal-Regulated Kinase のリン酸化抑制を介した葛根湯の炎症反応抑制効果
指導教員	(主) 講師 荒 敏昭 (副) 教授 川上 敏行 (副) 教授 平岡 行博
論文審査委員	主査 教授 宇田川 信之 副査 教授 各務 秀明 副査 准教授 平賀 徹

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的】

これまでに学位申請者の所属する研究グループは漢方薬(小柴胡湯、黄連湯、半夏瀉心湯)がヒト歯肉線維芽細胞を LPS 刺激した際に産生されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 量を低下させることを報告してきた。本研究では一般的に使用されている葛根湯を選択し、その作用についてヒト歯肉組織由来の細胞培養実験系を用いて検討した。

### 【対象および方法】

通法に従い埋伏歯抜去時の遊離歯肉片からヒト歯肉線維芽細胞を培養した。歯肉線維芽細胞を *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (10 ng/ml) で 24 時間刺激した後に培養上清中に産生された PGE<sub>2</sub>、IL-6、IL-8 量を ELISA にて測定し、刺激終了時の生細胞数で補正した。これらの実験系に葛根湯 (0.01-1mg/ml) を同時に添加することにより葛根湯の作用を検討した。シクロオキシゲナーゼ (COX) 活性の阻害能は Cayman 社の COX Inhibitor Screening Assay キットにより測定した。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) および COX-2、アネキシン 1、Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)、リン酸化 ERK の量はウェスタンブロット法で検討した。

### 【結果】

葛根湯は 1 mg/ml までは細胞の生存率にほとんど影響を与えなかったが、2 mg/ml 以上の濃度では生存率を低下させたため以降の実験では葛根湯の最大濃度を 1 mg/ml とした。

葛根湯は LPS 刺激により歯肉線維芽細胞から産生される PGE<sub>2</sub> 量を濃度依存的に減少させた。一方、葛根湯は LPS 刺激なしの場合に産生される PGE<sub>2</sub> 量に影響を与えなかった。また葛根湯は LPS 刺激による IL-6 および IL-8 産生量を増加させた。

葛根湯は COX-1 活性をわずかに低下させたが、COX-2 活性には影響を与えなかった。葛根湯はアラキドン酸カスケードの分子である PLA<sub>2</sub> および COX-2、アネキシン 1 (PLA<sub>2</sub> 活性を抑制する分子) の産生量に影響を与えなかった。しかし、葛根湯は LPS 刺激による ERK のリン酸化を抑制した。

## 【考察】

ヒト歯肉線維芽細胞を用いた実験系において、葛根湯が PGE<sub>2</sub> の産生を抑制することから抗炎症作用を示すことが示唆された。これまでに ERK のリン酸化が PLA<sub>2</sub> の活性化を引き起こすことが報告されており、葛根湯は LPS 刺激による ERK のリン酸化を抑制した。したがって、葛根湯が PLA<sub>2</sub> の活性化を抑制し、アラキドン酸の産生量およびそれに引続く PGE<sub>2</sub> の産生量を低下させたものと考えられる。

## 学位論文審査の結果の要旨

臨床的に様々な疾患の治療薬として漢方薬が使用されているが、その多くは作用メカニズムが解明されていない。本研究論文で使用されている葛根湯も結膜炎や中耳炎、扁桃腺炎などの炎症性疾患の治療に使用されているが、その抗炎症作用のメカニズムは十分に解明されていない。本研究論文では、葛根湯の抗炎症作用のメカニズムについてヒト歯肉線維芽細胞を使用して明らかにした。

実験は、ヒト歯肉線維芽細胞を LPS と葛根湯で刺激して炎症性ケミカルメディエーターである PGE<sub>2</sub> の産生量の変化を検討した。また、シクロオキシゲナーゼ活性、アラキドン酸カスケードの分子の発現量、細胞内情報伝達系 ERK の活性化に与える影響について検討した。

その結果、葛根湯は LPS 刺激による ERK のリン酸化を抑制することで、アラキドン酸カスケードを抑制することを明らかにした。

本研究の所見は、葛根湯の作用メカニズムは既存の抗炎症薬とは異なり、アレルギーや胃腸障害などの副作用のためにこれらの抗炎症薬を使用できない場合に使用することができるという可能性を示しており、臨床的に将来性が感じられる。

以上から、本論文が学位論文に値すると判定した。

なお、本論文は *ISRN Pharmacology* (2014) 784019 に掲載されている。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位論文 “Preventive Effects of a Kampo Medicine, Kakkonto, on Inflammatory Responses via the Suppression of Extracellular Signal-Regulated Kinase Phosphorylation in Lipopolysaccharide-Treated Human Gingival Fibroblasts.

(LPS 刺激ヒト歯肉線維芽細胞における Extracellular Signal-Regulated Kinase のリン酸化抑制を介した葛根湯の炎症反応抑制効果)” を中心に、本研究に関する基礎知識、論文の内容に関する事項、および研究成果の今後の展開などについて、口頭試問による試験を行った。

質問事項は以下の通りである。

- ・ 葛根湯の臨床的な効果の作用機構は？
- ・ 漢方薬を用いた実験の際に含まれる各々の成分の効果を検討することが可能であるか？
- ・ 歯周病患者に投薬することは有効であるか？
- ・ 抗炎症作用を有している漢方薬はどのようなものがあるか？
- ・ 漢方薬の副作用は？

・漢方薬の口腔内疾患の適応としては口腔乾燥症や舌痛症が挙げられるが、歯周病のような慢性疾患に対して適応させたいと考えた理由は？

以上の質問が出されたが、申請者は論文の内容およびそれに関連する事項に対して的確に回答した。

以上から、本審査委員会は、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有する者と認め、最終試験を合格と判定した。