

論文の内容の要旨

氏名：長 嶋 秀 和

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：CXCR4 signaling contributes to periodontal mechanical hypersensitivity and alveolar bone resorption in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in mice

(CXCR4 シグナルは *Porphyromonas gingivalis* によって誘導されるマウス歯周炎の機械痛覚過敏と歯槽骨吸収に関与する)

歯周炎は、細菌感染によって引き起こされる進行性の炎症性疾患であり、30 歳以上の 35%、65 歳以上の 80% が罹患している。歯周炎は歯周組織の破壊と歯槽骨の吸収を伴うが、他の炎症性疾患と異なり痛みを伴わず進行するため、発見と治療が遅れる。歯周炎の発症と進展には、バイオフィルムに生息する口腔細菌が複合的に関与しているが、中でも *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) は最も重要な病原菌である。*P.g.* の病原因子として知られる線毛 (fimbriae) は、本菌の歯周ポケット内への定着に関わるが、マクロファージに発現するケモカイン受容体：CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) を介して細胞内シグナルを亢進させることで、宿主の免疫応答を抑制することも知られている。歯周炎の進行にともない免疫応答が抑制されると、疼痛感覚も抑制される可能性があるが、マクロファージにおける CXCR4 シグナルの活性化と歯周組織の疼痛調節機構との関連性は解っていない。また、CXCR4 は歯周組織の破骨細胞にも発現しており、歯周炎において CXCR4 のリガンドである CXC motif chemokine 12 が増加することが報告されている。このことから、*P.g.*-fimbriae の CXCR4 を介するシグナル伝達が歯槽骨吸収にも関与することが考えられるが、その詳細は不明である。

そこで本研究では、*P.g.* によって惹起される歯周炎において、CXCR4 を介するシグナル伝達が歯周組織の機械痛覚と歯槽骨吸収にどのように関与するのか、生理学的、組織学およびマイクロコンピュータ断層撮影 (mCT) 解析を行い検討した。

実験には 7 週齢、雄性の C57BL/6 マウスを用いた。右側上顎第二臼歯周囲に 5-0 絹糸を結紮 (ligation : L) し *P.g.* を播種 (*P.g.*-L 処置)、または右側上顎第二臼歯頬側歯肉にポジティブコントロールとして Complete freund's adjuvant (CFA) を注射した。2% カルボキシメチルセルロースの投与のみを行った群を Sham とした。2% イソフルランにて浅麻酔を行い、右側上顎第二臼歯頬側歯肉に機械刺激を与え、逃避反射閾値を経日的に測定するとともに、CFA および *P.g.*-L 処置後 2 日目に HE 染色を行い、組織学的検討を加えた。

その結果、CFA および *P.g.*-L 処置群では、歯周組織にリンパ球、好中球およびマクロファージなどの炎症細胞の著明な浸潤が観察されたが、Sham では認められなかった。また、CFA 処置は Sham と比較して有意に逃避反射閾値が低下したが、Sham と *P.g.*-L 処置群との間に有意差は認められなかった。さらに *P.g.*-L 処置後、右側上顎第二臼歯頬側歯肉に CXCR4 中和抗体を連続投与し、機械刺激に対する逃避反射閾値の変化を解析した。その結果、CXCR4 中和抗体の連続投与後 2 日目には逃避反射閾値が有意に低下した。そこで、中和抗体投与後 2 日目に免疫組織学的解析を行うとともに、疼痛閾値の調節に関与する一酸化窒素 (NO) の産生量を測定した。その結果、CXCR4 中和抗体投与後 2 日目に CXCR4 陽性マクロファージ数と NO の産生量が有意に増加した。

次に、NO の基質である L-arginine を naive マウスの歯周組織に直接投与し、vehicle 投与と比較して逃避反射閾値の低下がみられるか否かを検討した結果、L-arginine の投与後 0.5~1 時間に逃避反射閾値は有意に低下した。そこで、*P.g.*-L 処置したマウスに NO 合成酵素阻害剤である L-NAME を投与した後、CXCR4 中和抗体を投与し、機械刺激に対する逃避反射閾値の変化を解析した。その結果、*P.g.*-L + CXCR4 中和抗体処置群、および vehicle 群では処置後 2 日目に有意に逃避反射閾値が低下したが、L-NAME の前投与によってその低下は部分的に緩和された。さらに、NO の産生には転写因子 NF- κ B が重要な役割を担っていることから、*P.g.*-L 処置群の歯周組織に NF- κ B のアクチベーターである betulinic acid を投与し、逃避反射閾値の低下が起こるか否かを検討した。その結果、*P.g.*-L および betulinic acid 処置後 2 日目に逃避反射閾値が有意に低下していることも確認された。

次に、CXCR4 中和抗体投与の歯槽骨吸収への影響について検討した。本実験においても、*P.g.-L* 処置によって逃避反射閾値の低下が起きないことを確認した。処置後 14 日目に HE 染色を行った結果、*P.g.-L* + CXCR4 中和抗体処置、または *P.g.-L* + vehicle 処置によって炎症細胞の増加が認められたが、抗体処置群では vehicle 処置群よりその数が多い傾向にあった。さらに、右側上顎第二臼歯近心頬側根と口蓋根の間の分岐部の最下点を中心とする $0.6 \times 1.2 \times 1.2$ mm の範囲において mCT を用いて骨量を測定した。その結果、*P.g.-L* + vehicle 処置群では Sham と比較して骨量が有意に減少したが、抗 CXCR4 中和抗体の投与によって骨量の減少が緩和された。一方、抗 CXCR4 中和抗体の投与のみでは骨量に変化は認められなかった。

以上の結果から、マウス歯周炎において、歯周組織に浸潤したマクロファージにおける *P.g.-fimbriae* による CXCR4 シグナルの亢進は、NF- κ B を介した NO の放出を阻害することで、歯周炎の無痛性進行に深く関与していることが示された。また、CXCR4 を介したシグナル伝達がマウス歯周炎における歯槽骨吸収に重要な役割を果たすことも示唆された。