

論文の内容の要旨

氏名：石井佳笑

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The expression of Forkhead box transcription factor class O3a and Caspase-3 in human periapical granulomas

（歯根肉芽腫における Forkhead box transcription factor class O3a および Caspase-3 の発現）

根尖性歯周炎は口腔常在菌の根管内への感染により、根尖部歯周組織に発症する炎症性疾患である。炎症の拡大に伴って骨吸収および膿瘍形成を認め、その後、膿瘍の器質化に伴い歯根肉芽腫と呼ばれる病態となる。歯根肉芽腫は様々な臨床症状を引き起こし、感染根管治療で症状の改善が認められないこともしばしば報告されている。これまでに、根尖性歯周炎の病態解明を目的としてサイトカインや成長因子などの炎症性メディエーターの研究が行われてきた。本病態解明に関する一連の研究では、歯根肉芽腫中でのヘパリン結合性の成長因子である midkine の発現および Epstein-Barr virus の免疫反応への関与が明らかとなっている。しかしながら、歯根肉芽腫の発生と遷延のメカニズムは未だに明らかにされていない。

Forkhead box transcription factor class O (FoxO) は、Forkhead box と言われる DNA 結合ドメインをもつ転写因子で、18 種類のサブファミリーで構成されている。哺乳類においては FoxO1, FoxO3, FoxO4 および FoxO6 が存在し、細胞の生存、増殖および DNA 損傷修復反応に関連しているとされており、中でも FoxO3a は、関節リウマチ等の慢性炎症性疾患で発現しているとの報告がある。一方、Tumor necrosis factor ファミリーのひとつである Fas Ligand (FasL) は Fas 受容体に結合することで細胞のアポトーシスを誘導し、その結果 Interleukin-1 β を放出させ、炎症を惹起させると考えられている。これまでの報告から FoxO3a は FasL のプロモーターに結合し FasL 遺伝子の発現を抑制することで Fas-FasL 伝達機構を調節することが知られている。しかし、根尖性歯周炎における FoxO3a の関与については検討されたことはなく、未だにその詳細は不明である。

Caspase は、Cysteine protease ファミリーに分類されるタンパク分解酵素で、アポトーシスを起こすシグナル伝達経路に関与していると言われている。Cysteine protease は、活性部位に Cysteine 残基をもつタンパク分解酵素群であり、Caspase は基質となるタンパク質の Aspartic acid 酸残基の下流を切断するとされており、機能的に誘導型 Caspase、実行型 Caspase および炎症性 Caspase に分類される。中でも Caspase-3 は実行型 Caspase に分類され、Apoptosis repressor with caspase recruitment domain を介して FoxO3a により活性化が抑制される。その結果、心筋細胞におけるアポトーシスが阻害されるとの報告がある。

本研究では、歯根肉芽腫および健常歯肉組織における FoxO3a タンパクの発現を検索する目的で、免疫組織化学的検討を行った。さらに、Caspase-3 遺伝子発現についても分子生物学的に検討した。

日本大学歯学部付属歯科病院歯内療法科を受診し、難治性慢性根尖性歯周炎と診断され、歯根尖切除術または抜歯術を実施した患者を被験者として、根尖病変組織 ($n = 30$) を採取した。また、完全水水平埋伏智歯の抜去の際に採取した健常歯肉組織 ($n = 5$) をコントロールとして用いた。なお、被験者には採取した組織を本研究に用いることを説明し、文書にて同意を得た。採取した試料は直ちに 2 分割し、一方は、10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し、厚さ 5 μm のパラフィン薄切標本を作製した。他方は、real-time PCR 法により Caspase-3 遺伝子の発現を検討するため、OCT-compound に包埋し、ドライアイス-アセトンを用いて凍結した。

作製したパラフィン薄切標本に対してヘマトキシリン・エオジン染色を実施した後、光学顕微鏡下で病理組織学的検討を行った。その結果、根尖病変組織 ($n = 30$) のうち、炎症性細胞の浸潤が著しく、かつ毛細血管および幼弱な線維芽細胞に富む試料を歯根肉芽腫 ($n = 26$) と診断し、本研究に供試した。

一方、コントロールとして採取した健常歯肉組織に対しても、同様に検討を行い、炎症性細胞の浸潤が認められないことを確認した。

歯根肉芽腫中の FoxO3a タンパク発現細胞 (好中球, T リンパ球および B リンパ球) の同定は, 抗ヒト FoxO3a および 3 種の細胞マーカー (Neutrophil Elastase, CD3 または CD79 α) を用いた蛍光二重免疫染色により行った。さらに, 蛍光顕微鏡下で FoxO3a 陽性細胞数を細胞種ごとにカウントした後, 陽性細胞率を算出し, Kruskal-Wallis test を用いて統計学的分析を行った。その結果, 歯根肉芽腫中の好中球, T リンパ球および B リンパ球の核内で FoxO3a タンパクの発現を認め, それぞれの陽性細胞率は 82.1%, 78.3%, 77.5%であった。各細胞種間での陽性細胞率に有意差は認められなかった。一方, 健常歯肉組織での FoxO3a タンパクの発現は認められなかった。

ついで, 歯根肉芽腫および健常歯肉組織中における Caspase-3 遺伝子発現の検索は, 凍結試料から全 RNA を回収し, 相補的 DNA を合成した後, 通法に従い real-time PCR 法で検討した。その結果, すべての試料中からの Caspase-3 遺伝子の発現を認めた。また, Mann-Whitney *U* test による統計学的分析を行ったところ, 歯根肉芽腫における Caspase-3 遺伝子の発現は健常歯肉組織と比較して有意に低かった。

以上のことから, 歯根肉芽腫における FoxO3a および Caspase-3 の発現がその病態の発生と遷延のメカニズムに関与している可能性が示唆された。