

論文の内容の要旨

氏名：小池 亮

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Butyric Acid in Saliva of Chronic Periodontitis Patients Induces Reactivation of EBV

（慢性歯周病患者唾液中の酪酸は EBV の再活性化を誘導する）

Epstein-Barr Virus (EBV) はヘルペスウイルス科のウイルスで、わが国では成人のほとんどに不顕性感染している。EBVは、唾液を介して咽頭上部から侵入し B 細胞に感染した後、細胞内において潜伏感染状態となる。ウイルスと宿主の共存関係が破綻すると、ウイルス再活性化による感染細胞の異常増殖が起こり伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、及び上咽頭癌などが発症する。EBV の再活性化は疾患の発症において必須であるが、再活性化過程においてウイルスの転写因子：BZLF1 は重要な役割を演じる。BZLF1 は再活性化の最初期に発現した後、転写因子として機能しカプシドやウイルスポリメラーゼなどの遺伝子発現を次々と誘導することで EBV の複製を強力に促進する。近年、遺伝子発現におけるエピジェネティック制御の重要性が明らかとなるに従い、EBV を含む多くのウイルスの潜伏感染の成立と維持においてもエピジェネティック制御が深く関与していることが解ってきた。EBV の場合、Sp1 や Sp3 などの宿主転写因子が、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を BZLF1 のプロモーター領域にリクルートする。HDAC によりヒストン C 末端のリジン塩基が脱アセチル化されヘテロクロマチンが形成されると、BZLF1 の発現が転写レベルで阻害されるため、EBV は潜伏感染状態を維持できる。潜伏感染の成立が転写レベルで明らかとなった一方で、潜伏感染の破綻、即ちウイルスの再活性化がどのような状態で起こるのかは未だによく解っていない。

近年、EBV が歯周病や潰瘍性大腸炎等の炎症性疾患の発症と進行にも深く関与するとの興味深い研究結果が世界各国から報告されている。歯周病の発症においては、*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性菌の重要性が知られている。しかし、最近の研究から、歯周病の発症に細菌の関与は必須であると考えられるものの、主な原因は宿主側にあり、特に免疫機能の低下が重要との考えが広く認識されるようになった。そこで、宿主に感染し免疫機能の低下を引き起こす EBV の役割が注目されている。これまでに、EBV が歯肉の B 細胞のみならず歯肉上皮細胞にも感染していることや、歯周病患者の歯周ポケットや唾液中の EBV 検出率と歯周病の重症度とに相関があることなどが報告されている。さらに、*P. gingivalis* や *F. nucleatum* の培養液中に含まれる短鎖脂肪酸の一つである酪酸が、エピジェネティック制御を介して EBV の再活性化を誘導することが示された。酪酸は強力な HDAC 阻害作用を有することが知られているが、BZLF1 プロモーター上の HDAC に直接作用してヒストンの脱アセチル化を解除した結果、EBV の再活性化を誘導したと考えられる。歯周病患者の唾液中には歯周病原菌が多く存在するため、歯周病原菌が産生した唾液中の酪酸が EBV を再活性化する可能性がある。しかしこれまでに、唾液中の短鎖脂肪酸と EBV 再活性化に関する報告は見当たらない。そこで本研究では、実際の歯周病患者の唾液を採取し、唾液中の短鎖脂肪酸の濃度を測定すると共に、唾液が EBV を再活性化するか否かを検討した。

実験には、歯周病患者 7 名、及び健常者 5 名から採取した唾液を用いた。無味ガムを噛んでもらい 5~10 ml 程度の唾液を回収し遠心後、0.22 μm のフィルターに通したものを使用した。唾液の採取は歯学部倫理委員会の承諾を得て（許可番号：EP17D006）実施した。唾液中の短鎖脂肪酸（酪酸、プロピオン酸、酢酸、イソ吉草酸、及びイソ酪酸）の濃度は、高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。EBV 再活性化は EBV 潜伏感染 B 細胞である Daudi 細胞に唾液刺激を行った後、BZLF1 の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検出することで解析した。BZLF1 がコードする蛋白質である ZEBRA の発現とヒストンのアセチル化は各々の特異的抗体を用いた Western blotting 法にて調べた。また、転写レベルで検討するために、BZLF1 のプロモータープラスミドが安定的に組み込まれた B95-8-221 細胞を用いて Luciferase assay を行った。

はじめに、唾液中の短鎖脂肪酸濃度を測定した結果、歯周病患者唾液中には酪酸、プロピオン酸、及び酢酸が、それぞれ 0.95 ± 0.39 mM, 0.67 ± 0.31 mM, 3.41 ± 1.20 mM と高濃度で存在していることが解った。その値は健常者の唾液中の濃度と比較してそれぞれ、33.3 倍、3.3 倍、及び 2.4 倍と有意に高かった。イソ吉草酸とイソ酪酸の濃度は健常者と歯周病患者ともに $0.01 \sim 0.03$ mM と低い値を示し、両者の間に有意差は認められなかった。次に、Daudi 細胞と B95-8-221 細胞に唾液を添加し BZLF1 の mRNA 発現と転写活性を検討した。その結果、歯周病患者の唾液により BZLF1 の発現が転写レベルで誘導されると共に、BZLF1 発現量は唾液中の酪酸濃度との間のみ有意な相関関係があることが認められた。そこで、5つの短鎖脂肪酸をそれぞれ実際の歯周病患者の唾液中に含まれる濃度で Daudi 細胞を刺激した結果、酪酸のみに BZLF1 の誘導能があることが解った。さらに、歯周病患者の唾液と酪酸は Daudi 細胞において ZEBRA の発現を誘導すると共に、ヒストン H3 のアセチル化を促進することが確認できた。

以上の結果から、歯周病患者の唾液中の酪酸は、エピジェネティック制御を介して BZLF1 の発現を誘導することにより、EBV を再活性化することが明らかとなった。今後、唾液のサンプル数を増やして実験を行っていく必要があるが、本研究から歯周病が EBV 再活性化のリスク因子となり得ることが推察され、歯周病のみならず上咽頭癌やバーキットリンパ腫等の発症機序の解明とその予防法の開発に繋がる可能性が示唆された。