

## 論文の内容の要旨

氏名：池田 寛

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of inflammatory cytokines on follicular dendritic cell secreted protein gene expression and comparison of the amount of aspartate aminotransferase and clinical parameters pre- and post-periodontal regeneration therapy

(炎症性サイトカインの濾胞性樹状細胞分泌タンパク質の遺伝子発現に対する効果と歯周組織再生治療前後における臨床パラメーターとアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ量の比較検討)

歯周炎は、細菌、宿主および環境因子によって引き起こされる炎症性疾患で、腫脹、出血および歯槽骨吸収等の臨床症状を示す。リスク因子の中で特に細菌の産生物質に対する免疫応答が、炎症性サイトカイン、プロスタノイドおよびマトリックスメタロプロテアーゼの産生を誘導する。インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) および腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は、炎症と歯槽骨吸収の誘因となる代表的サイトカインである。

濾胞性樹状細胞分泌タンパク質 (follicular dendritic cell secretory protein ; FDC-SP) は、ヒト扁桃腺の濾胞性樹状細胞から分泌される低分子タンパク質である。FDC-SP 遺伝子は、クロモソーム 4q13 上の ODAM や CSN3 遺伝子に近接した casein locus に存在する。FDC-SP は、翻訳後修飾を受けて B リンパ球に結合するが、T リンパ球には結合しない。FDC-SP は、耳下腺、接合上皮 (JE) および歯根膜で発現し、唾液タンパク質であるヒスタチンやスタセリンと類似した抗菌活性を有する。歯根膜細胞において FDC-SP を過剰発現させると、骨芽細胞への分化が抑制され破骨細胞形成が増強される。

JE は、歯肉とエナメル質との接合部に存在し、エナメル質にヘミデスモゾーム結合し、歯周組織の免疫防御に重要な役割を果たす。細菌感染への免疫応答として、JE はケモカインやサイトカインを分泌する。JE での FDC-SP の発現は、歯肉の炎症に伴い一時的に喪失する。一方、ニフェジピンによる増殖歯肉では、FDC-SP の発現が増強する。これらの結果は、JE における FDC-SP の機能の維持が、歯周組織の防御機構の向上に繋がることを示唆している。炎症性サイトカインによるヒト FDC-SP 遺伝子の転写調節機構を解明するために、歯肉上皮細胞、耳下腺導管細胞および歯根膜細胞における FDC-SP の転写に対する IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の影響を解析した。

リスク因子を利用した歯周炎の診断法が、幾つか開発されている。歯周病は多因子性疾患であり、歯周炎により破壊された歯周組織の評価は、プロービングポケット深さ (PPD)、クリニカルアタッチメントレベル (CAL) およびプロービング時の出血 (BOP) 等の臨床パラメーターを用いて行われる。歯肉溝滲出液 (GCF) 中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性は、歯周疾患による細胞の破壊を反映するため、歯周炎の臨床予測と歯周基本治療や歯周組織再生療法の予後判定に使用される。Periodontal Tissue Monitor (PTM) キットは、半定量の AST 活性 (PTM 値) を測定するキットである。PTM 値と歯周病の臨床パラメーターとの関係に関する報告は少なく、歯周組織再生療法の予後判定と AST 活性の臨床的有用性に関する報告はない。本研究では、27 名の患者の 56 部位にエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) を使用した歯周組織再生療法を行い、手術前後の臨床パラメーターと PTM 値の関係を解析した。

異なる濃度の IL-1 $\beta$  で、ヒト歯肉上皮 Ca9-22 細胞を 12 時間刺激すると、1 および 10 ng/ml で有意に FDC-SP mRNA の発現が増加した。IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) で Ca9-22 細胞を経時的に刺激すると、FDC-SP mRNA 量は刺激 3 時間後に増加し、6 および 12 時間後に最大となった。Sa3 ヒト歯肉上皮細胞を IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) で経時的に刺激すると、FDC-SP mRNA 量は刺激 3 時間後に増加し、24 時間後に最大となった。HSY ヒト耳下腺導管細胞では、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) 刺激 3 時間後に FDC-SP mRNA 量は有意に増加し、6、12 および 24 時間後に最大となった。IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の効果が、FDC-SP 遺伝子プロモーター中の転写因子結合配列とサイトカイン刺激で誘導された転写因子との結合によると考えられるため、FDC-SP 遺伝子プロモーターを挿入したコンストラクトを使用したルシフェラーゼアッセイを行った。長さの異なるヒト FDC-SP 遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼコンストラクト (-116、-210、-345、-501、-717

および-948FDCSP)を、Ca9-22、Sa3およびHSY細胞に導入し、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) 刺激すると、Ca9-22に導入した-116、-210、-345および-948FDCSP コンストラクトのルシフェラーゼ活性が増加した。TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) では、Sa3とHSY細胞に導入した全てのコンストラクトのルシフェラーゼ活性が有意に増加した。ヒト FDC-SP 遺伝子プロモーターには、Yin Yang 1 (YY1; nts -69 to -53)、GATA (nts -122 to -106) および3種類のC/EBPエレメント (C/EBP1; nts -143 to -133)、C/EBP2 (nts -194 to -181) と C/EBP3 (nts -282 to -269) が存在する。C/EBP $\alpha$  転写因子とヒト FDC-SP 遺伝子プロモーター中の C/EBP2 および C/EBP3 配列との結合を解析するために、不死化歯根膜細胞を IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) で刺激後、クロマチンを抽出し、細胞内での転写因子とプロモーター配列の結合をクロマチン免疫沈降法(ChIP アッセイ)で解析した。C/EBP $\alpha$  と C/EBP2 および C/EBP3 配列との結合は、時間依存的に増加し、プロテインキナーゼ A、チロシンキナーゼ、MEK1/2 キナーゼ、PI3 キナーゼ阻害剤で抑制された。

EMDを使用した27名、56部位の歯周組織再生療法前後の臨床パラメーターを比較した。術前(BL)の平均PPD ( $5.82 \pm 1.44$  mm)、CAL ( $7.34 \pm 2.17$  mm) およびBOP (58.9%) は、術後(RE)に平均PPD ( $3.45 \pm 0.99$  mm)、CAL ( $5.59 \pm 1.79$  mm) およびBOP (19.6%) へと有意に改善した。再生療法後のPTM値は、手術を行った56部位中42部位で術前と比べて改善した。この42部位の中で、数値が改善または変化しなかったのは、PPDが42部位、CALが38部位、BOPが41部位であった。PTM値と歯周組織再生療法後のPPDとCALの平均値との関係を解析した結果、歯周組織再生療法後に、術前と比べてPTM値が改善した42部位では、PPDおよびCALの平均値が、術前と比べて有意に減少した。一方、術後にPTM値が変化しまたは悪化した14部位では、PPDの平均値は、術前と比べて有意に減少したが、CALの平均値は歯周組織再生療法前後で変化しなかった。

IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ は、同じ転写因子を介して遺伝子発現を調節すると考えられるが、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ 受容体のノックアウトマウスでは、自然免疫反応の開始に際しての感受性が異なる。GCF中のIL-1 $\beta$ 濃度は、歯周炎患者で増加し、歯周基本治療により減少した。さらに、IL-1 $\beta$ の遺伝子クラスター多型と2型糖尿病の歯周炎で関係が認められ、GCF中のTNF- $\alpha$ 濃度と歯周炎の重症度の間に正の相関が認められ、血中TNF- $\alpha$ 濃度は、2型糖尿病の肥満患者で増加した。抗菌薬を併用した歯周治療で、血中TNF- $\alpha$ 濃度、CRPおよび糖化ヘモグロビンの減少が認められたことから、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ は、歯周炎の発症と進行に関与すると考えられる。本研究の結果、IL-1 $\beta$ はヒトFDC-SPのmRNA量を、Ca9-22、Sa3およびHSY細胞で増加させた。IL-1 $\beta$ は、Ca9-22細胞に導入したヒトFDC-SPルシフェラーゼコンストラクトの転写活性を増加させた。本研究では、TNF- $\alpha$ は、Sa3およびHSY細胞に導入した全てのルシフェラーゼコンストラクトの活性を増加させたが、IL-1 $\beta$ は、Ca9-22細胞に導入した-501および-717FDCSPコンストラクトのルシフェラーゼ活性を増加させなかった。以上の結果は、FDC-SP遺伝子プロモーター中に、サプレッサー(抑制)エレメントが存在することを示唆していた。ChIPアッセイの結果から、IL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ は、Aキナーゼ、チロシンキナーゼ、MEK1/2およびPI3キナーゼを介してC/EBP $\alpha$ のC/EBP2およびC/EBP3配列への結合を増加させることが明らかとなった。FDC-SPの発現や機能に対するIL-1 $\beta$ とTNF- $\alpha$ の異なる効果については、さらなる研究が必要である。

2番目の研究の結果、PTM値(AST活性)は、歯周組織再生療法の予後判定に有効であることが明らかになった。歯周組織再生療法は、歯周炎の症状を改善することに効果的であるが、歯間乳頭保存術や自家骨移植等の術式の統一が困難である。EMDを使用した再生療法後に、PTM値が改善した場合は、歯周病の臨床パラメーターに変化が生じ、術後のPTM値の改善は、PPDよりもCALの獲得を予測できる結果が得られたことから、PTM値の測定は、歯周外科治療の効果予測、あるいは治癒判定に有効であると考えられた。