

論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：(主査) 教授 吉垣 純子
(副査) 教授 小方 頼昌
(副査) 教授 松島 潔

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や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 β (IL-1 β) および腫瘍壊死因子- α (TNF- α) 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。歯根膜細胞で 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マゾーム結合し、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し、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 β および TNF- α 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 β 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 β (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 β (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 β (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 β と TNF- α 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

ン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 (LUC) 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 LUC 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 β (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 LUC 活性が増加した。TNF- α (10 ng/ml) では、Sa3 と HSY 細胞に導入した全コンストラクトの LUC 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lement (C/EBP1; nts -143 to -133, C/EBP2; nts -194 to -181, C/EBP3; nts -282 to -269) が存在する。C/EBP α 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 配列との結合の解析のために、不死化歯根膜細胞を IL-1 β (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 α 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部位は、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 の平均値が有意に減少し、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。

GCF 中の IL-1 β 濃度は、歯周炎患者で増加し、歯周基本治療で減少した。さらに、IL-1 β 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- α 濃度と歯周炎の重症度に正の相関を認め、血中 TNF- α 濃度は、2 型糖尿病の肥満患者で増加していた。局所投与抗菌薬を併用した歯周治療で、血中 TNF- α 濃度、CRP、糖化ヘモグロビンの減少が認められたことから、IL-1 β と TNF- α は、歯周炎の進行に関与すると考えられる。本研究の結果、IL-1 β 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 β は、Ca9-22 細胞に導入したヒト FDC-SP の LUC コンストラクトの転写活性を増加させた。本研究では、TNF- α は、Sa3 および HSY 細胞に導入した全ての LUC コンストラクトの活性を増加させたが、IL-1 β は、Ca9-22 細胞に導入した-501 および-717FDCSP コンストラクトの LUC 活性を増加させなかったことから、FDC-SP 遺伝子プロモーター中に、サプレッサー (抑制) エlement 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 β と TNF- α 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 α 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 β と TNF- α 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と考えられた。歯周組織再生療法は、歯周炎の症状改善に効果的であるが、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 値が改善すると、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ことが明らかになったことから、PTM 値の測定は、歯周外科治療の効果予測および治癒判定に有効であると考えられた。

IL-1 β と TNF- α は、FDC-SP の遺伝子発現を FDC-SP 遺伝子プロモーター中の YY1, GATA, C/EBP2 および C/EBP3 配列を介して調整することが明らかになった。さらに、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と考えられた。これらの研究成果は、歯周病の予防および治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 2 年 1 2 月 1 7 日