

## 論文審査の結果の要旨

氏名：丹野 努

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Inflammatory cytokines and cAMP regulate amelotin gene expression and the effects of heated coral calcium mouthwash on plaque and periodontal tissue

（炎症性サイトカインとcAMPによるアメロチン遺伝子発現の調節と焼成サンゴカルシウム含有洗口剤のプラークおよび歯周組織に対する効果）

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

歯周炎は、環境、宿主および細菌因子によって引き起こされる炎症性疾患で、成人の歯の喪失原因の第一位である。炎症歯周組織中で生じる免疫応答により、炎症性サイトカインやプロスタノイドが多量に放出されるが、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) は、歯周組織の炎症と歯槽骨吸収を誘導する代表的なサイトカインである。

接合上皮 (JE) は、歯肉溝底部に位置し、エナメル質とヘミデスモゾーム結合している。JE は、歯の発生における退縮エナメル上皮に由来した非角化上皮で、細菌感染からの免疫防御に寄与していると考えられる。

1 つめの研究では、アメロチン (AMTN) をターゲットとして研究を行った。AMTN は、成熟期のエナメル芽細胞から分泌されるエナメルタンパク質であり、JE がエナメル質と結合する内側基底板および歯肉線維芽細胞で発現する。本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯肉上皮細胞である Sa3 細胞と Ca9-22 細胞における AMTN の転写に対する、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  および細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度を上昇させるフォルスコリン (FSK) の影響について解析した。

2 つめの研究では、患者をサンゴカルシウム洗口群 (10名) とプラセボ洗口群 (10名) の2群に分け、焼成サンゴカルシウムを含有する洗口液による1日3回、1カ月間の洗口により、プラセボ洗口液と比べて、歯周病の臨床パラメーターであるプロービングポケット深さ (PPD)、アタッチメントレベル (CAL)、プロービング時の出血 (Bleeding on probing; BOP)、プラーク指数 (PII) および歯肉炎指数 (GI) と歯周ポケット内細菌の中で *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Prevotella intermedia* および *Porphyromonas gingivalis* の検出数および総菌数に対する割合の洗口前後での変化に関して解析を行った。

IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の効果が、AMTN 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たため、AMTN 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 AMTN 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 (-100, -211, -353, -501, -7697 および -950AMTN) を HGF に導入し、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) および TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、HGF に導入した -211AMTN コンストラクトおよびそれよりも長い遺伝子プロモーターを挿入した 5 つのコンストラクトのルシフェラーゼ活性が増加した。Sa3 細胞に 6 つの AMTN 遺伝子プロモーターコンストラクトを導入し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、-211AMTN コンストラクトとそれよりも長い遺伝子プロモーターを挿入したコンストラクトのルシフェラーゼ活性が増加した。Ca9-22 細胞を FSK (1  $\mu$ M) で経時的 (0, 3, 6, 12 および 24 時間) に刺激すると、12 および 24 時間後に AMTN mRNA の発現量が有意に増加した。Ca9-22 細胞に AMTN 遺伝子プロモーターコンストラクトを導入し、FSK (1  $\mu$ M) で 12 時間刺激すると、-100AMTN コンストラクトとそれよりも長い遺伝子プロモーターを挿入したコンストラクトのルシフェラーゼ活性が増加した。ヒト

AMTN 遺伝子プロモーターには、Yin Yang 1 (YY1; nts -228 to -212), 2 種類の C/EBP エlement (C/EBP2; nts -163 to -150) と C/EBP1 (nts -117 to -105) および activator protein 1 (AP1; nts -94 to -84) 転写因子結合配列が存在する。

サンゴカルシウム洗口群とプラセボ洗口群の2群とも、1日3回、1カ月間の洗口では、PPD, CAL, BOP, PII および GI に有意な改善は認められなかった。しかしながら、サンゴカルシウム洗口群で、CAL, BOP, PII および GI に改善傾向が認められた。総菌数, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* および *P. gingivalis* の検出数は、洗口前後で、両群ともに有意な変化は認められなかったが、サンゴカルシウム洗口群で、*P. intermedia* と *P. gingivalis* の総菌数に対する割合が、洗口後に減少傾向にあった。一方、プラセボ洗口群では、*P. intermedia* と *P. gingivalis* の総菌数に対する割合が、洗口後に増加傾向にあった。

1 つめの研究の結果、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  刺激で、-211AMTN コンストラクトよりも長い遺伝子プロモーターを挿入したコンストラクトのルシフェラーゼ活性が増加し、FSK 刺激では、-100AMTN コンストラクトを含む全てのルシフェラーゼコンストラクトの活性が増加したことから、IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  刺激で、YY1, C/EBP2 および C/EBP1 配列に結合する転写因子が活性化されることで転写活性が上昇し、FSK 刺激では、AP1 配列に結合する転写因子が活性化されて転写活性が増加することが示唆された。また、本研究では、細胞内 cAMP 濃度を上昇させるフォルスコリン (FSK) 刺激で AMTN の転写活性が増加し、AMTN 遺伝子プロモーター中の AP-1 配列を介して遺伝子発現を調節していることが、初めて明らかになった。

2 番目の研究の結果、サンゴカルシウム洗口液またはプラセボ洗口液で、1日3回、1カ月間洗口することで、歯周病の臨床パラメーターである PPD, CAL, BOP, PII および GI と歯周ポケット内細菌叢に変化が生じるかどうかを解析し、いずれの指標および細菌数および総菌数に対する割合に有意な改善を認めなかった。しかし、サンゴカルシウム洗口群で、CAL, BOP, PII および GI に改善傾向を認め、*P. intermedia* と *P. gingivalis* の総菌数に対する割合が、洗口後に減少傾向にあったことから、さらなる長期に渡る解析が必要であると考えられた。

AMTN は、JE で発現することから歯周組織の健康維持に重要な役割を果たすと考えられ、AMTN の発現を調節することは歯周炎の改善度の指標になる可能性が示唆される。サンゴカルシウム洗口液での洗口により CAL, BOP, PII および GI に改善傾向を認め、*P. intermedia* と *P. gingivalis* の総菌数に対する割合が、洗口後に減少傾向にあったことから、長期に渡る解析が必要であり、歯周炎の改善に寄与する可能性が示唆された。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3年1月21日