

論文審査の結果の要旨

氏名：Zhang Fengzhu (張 鳳洙)

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：The role of hypoxia responsive transcription factor DEC1 in periodontal inflammation

(歯周炎における低酸素応答性転写因子 DEC1 の役割)

審査委員：(主査) 教授 平塚 浩一
(副査) 教授 小方 頼昌
教授 吉垣 純子

口腔内に常在する嫌気性細菌は、歯周組織での炎症反応と共に、歯周ポケットでは低酸素環境をもたらす。DEC1 は塩基性 helix-loop-helix (bHLH) とオレンジドメインをもつ低酸素応答性転写因子であり、低酸素環境のほか TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β などのサイトカインが DEC1 発現を誘導する上流因子として報告されている。低酸素環境や細菌由来のリポポリサッカライド (LPS) により細胞を刺激すると、様々な炎症性サイトカイン産生が増加することが明らかとなっている。また、組織の炎症部位における低酸素環境は、炎症性サイトカインの産生を増加させることで、より一層、細胞における感染および炎症性シグナルに対する感受性が増加することが知られている。本研究の目的は、歯周炎による炎症や低酸素環境における転写因子 DEC1 の発現の意義を解明することである。

(1) *in vivo* 実験として、野生型マウス(C57BL/6)と、その DEC1 ノックアウト (KO) マウスとを用いた。それぞれの群のマウス口腔内に、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)をカルボキシメチルセルロースと混合し投与した群とカルボキシメチルセルロースのみ投与したコントロール群を用意した。感染後、経時的にマイクロ CT にて撮影をおこない、歯槽骨の吸収を調べた。感染 30 日後の歯肉組織から歯肉単核細胞 (gingival mononuclear cells : GMC) を percoll 密度勾配遠心法にて単離し、抗 CD4, CD11b, F4/80, RANKL 抗体と反応させ、フローサイトメトリーで陽性細胞の分布を解析した。歯周組織切片を作成し抗 TNF- α 、IL-1 β 、RANKL、カテプシン K、CD4、F4/80 抗体にて免疫組織化学染色法をおこなった。TaqMan Array 96-Well plate を用いて、免疫応答に関与する遺伝子群の発現量を網羅的にリアルタイム PCR にて測定した。

(2) *in vitro* 実験として、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF-1) を培養後、DEC1 挿入ベクターの細胞内導入による DEC1 過剰発現を、または、siRNA 導入による DEC1 発現抑制を行った。培養細胞から、RNA とタンパク質を抽出し、それぞれを定量的リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法にて解析した。

また、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDLF)も同様に DEC1 siRNA を導入し、培地中への LPS 添加、または低酸素環境下で細胞培養を施し、RNA およびタンパク質から定量的リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法による遺伝子発現解析とタンパク質発現解析をおこなった。

マウスに *P. gingivalis* を感染させることで歯肉の炎症反応や歯槽骨吸収が認められた。感染 30 日後での DEC1KO マウスでは、野生型マウスに対する *P. gingivalis* 感染と比較し、歯槽骨吸収量が有意に減少した。また同様の比較において、GMCs における CD11b⁺F4/80⁺、CD4⁺、CD4⁺/RANKL⁺細胞数も有意に減少した。さらに DEC1KO マウス歯周組織から分離した GMCs での CD3e、CD68、FasL、IL-1 β 、IL-6、IL-17a、TGF- β 1、TNF- α 、IFN- γ および NF κ B の遺伝子発現は有意に、*P. gingivalis* 感染の野生型マウス GMCs と比較し低下した。免疫染色においては、DEC1KO マウスでは TRAP 陽性細胞数の減少が認められた。

ヒト歯肉線維芽細胞の培養系実験における DEC1 過剰発現では、*P. gingivalis* LPS 刺激により TNF- α および IL-1 β 遺伝子の発現は有意に上昇し、一方で DEC1 発現抑制をおこなうと両遺伝子の発現量は著明に減少することが確認された。また、歯根膜線維芽細胞の培養系実験を低酸素環境下でおこなうと、LPS 刺激や IL-1 刺激環境下と同レベルに DEC1 発現量が上昇した。また、LPS 刺激により上昇した DEC1 発現量は、低酸素環境下でさらに上昇をするが、DEC1 発現抑制系では共に DEC1 発現がほとんど確認されなかった。

以上の結果から、低酸素応答性転写因子 DEC1 における歯周組織における炎症や低酸素環境におけ

る働きを、*DEC1KO* マウスを用いたフローサイトメトリーや免疫組織化学染色法による解析を施し、また培養細胞として歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞に *DEC1* 発現ベクターや *DEC1* siRNA を導入することで、*DEC1* タンパク質の過剰発現や発現抑制を施した実験から、本転写因子 *DEC1* は歯肉組織や歯槽骨の恒常性を調節する重要な因子であり、*P. gingivalis* LPS で誘導される炎症性サイトカインの発現調節に重要な役割を担う可能性が示唆されたと結論付けている。

本研究は、歯周疾患の病態進展、特に歯周病の慢性化機序の解明について新たな知見を得たものであり、歯科医学ならびに歯周治療学の基礎研究に大きく寄与し、今後一層の発展が望めるものである。

よって本論文は、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