論文の内容の要旨

氏名：横　江　　　将
博士の専攻分野の名称：博士（歯学）
論文題名：Effects of Epstein-Barr Virus on inflammatory cytokines production in gingival fibroblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells
（EBV が歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン産生と RAW264.7 細胞の RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響）

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で，30 歳以上の約 8 割が罹患している。歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく，誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患，糖尿病および低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることも解ってきた。したがって，歯周病予防は口腔の健康のみならず，全身の健康維持にも重要との考え方が広まっている。しかし，歯周病の病因論は未だ確立されていない。これまでの研究から，*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性菌が歯周病の主な原因菌であることが知られている。しかし，これらの細菌がどのように歯周病の発症に関与しているのかは，現在でも明確に説明することは難しい。最近の研究では，歯周ポケットから検出される *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の数が，患者と健常者において差がなかったとする報告に加え，*P. gingivalis* 等が患部から検出されなかったとする症例も報告されている。したがって近年では，歯周病の発症に細菌の関与は必須であるものの，主な原因は宿主側にあり，特に免疫機能の低下が重要な因子であるとの考えが広く認識されるようになった。そこで，宿主細胞内に寄生し感染局所や全身の免疫能低下を誘導するウイルス，特に Epstein-Barr virus（EBV）と歯周病発症に関する興味深い臨床研究データが世界各国から蓄積されている。これまでに，*P. gingivalis* や *F. nucleatum* が，エピジェネティック制御を通じて EBV の再活性化を誘導すること，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が多数報告されている。さらに，EBV が歯肉上皮細胞にも感染していること，感染歯肉上皮細胞には EBV による癌化や炎症反応において重要な役割を担う Latent membrane protein 1 が発現していることが最近報告された。しかし，EBV がどのように歯周病の発症と進行に関与しているかは不明である。そこで本研究では，歯周病患者由来のヒト歯肉線維芽細胞とマウス単球由来 RAW264.7 細胞を用い，EBV や CMV が歯周病の進行において重要な役割を担う炎症性サイトカインの産生と破骨細胞分化に対する作用を検討した。

実験は，歯肉線維芽細胞に薬剤処理により不活化した EBV，もしくは CMV を添加したのち，培養上清と細胞抽出液を回収し，IL-6 と IL-8 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて，蛋白質量は ELISA 法にて定量した。炎症性サイトカイン産生における，転写因子 Nuclear factor-kappa B（NF-κB）の関与を調べるために，転写活性化はルシフェラーゼアッセイにより，inhibitor of NF-κB (IκBα)の分解および NF-κB p65 のリン酸化は，各々の抗体を用いた Western blotting 法により調べた。また，NF-κB 選択的阻害剤:BAY11-70582 の効果も ELISA 法にて検討した。破骨細胞分化に対する作用は，RAW264.7 細胞を receptor activator of NF-κB ligand（RANKL）(50 ng/ml) で 4 日間処理し破骨細胞分化を誘導する系を用い，Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行うことにより，破骨細胞様の TRAP 陽性多核巨細胞数を計測することにより調べた。

はじめに，歯肉線維芽細胞において，EBV が IL-6 および IL-8 の発現を誘導するか否かを検討した。その結果， EBV は IL-6 で約 35 倍，IL-8 においては約 400 倍と非常に強く両遺伝子発現を誘導した。蛋白質産生においても，EBV は実際の歯周病の患者において検出されるウイルス量よりも少ない量で，IL-6 と IL-8 の産生を強く誘導することがわかった。CMV も両サイトカインの産生を誘導したが，その作用は EBV の約 5 割程度であったため，EBV の作用について更なる研究を進めた。その結果，EBV の炎症性サイトカイン産生誘導能は，すでに炎症性サイトカイン産生を誘導することが知られている *P.gingivalis* の LPS やリポタイコ酸などよりも強いこと，またその作用が EBV の量依存的であることがわかった。

IL-8 をはじめとする炎症性サイトカインの発現には NF-κB が深く関与することが知られている。そこで，EBV 誘導性 IL-6 および IL-8 産生における NF-κB の関与を検討した。 NF-κB p65/p50 は通常，細胞質内で抑制因子 IκBα と結合した状態で存在し活性が抑えられている。刺激により IκBα

が分解された後，p65 はリン酸化され p50 と共に核内に移行する。核移行した p65/p50 が遺伝子プロモーターに結合した結果，炎症性サイトカインの発現が誘導される。はじめに，歯肉線維芽細胞において，EBV が NF-κB を活性化するか否かを検討した結果，EBV は IκBα の分解と p65 のリン酸化を誘導した。また， EBV は転写レベルで NF-κB を活性化することがルシフェラーゼアッセイの結果から明らかとなった。さらに，NF-κB 阻害剤 : BAY11-70582 は，その濃度依存的に EBV 誘導性の IL-6 および IL-8 の産生を抑制したことからも，EBV による両炎症性サイトカイン産生には NF-κB が深く関与していることが示唆された。

次に，破骨細胞分化に対する EBV の効果を RAW264.7 細胞を用いて検討した。破骨細胞は，破骨細胞前駆細胞上の RANK に，そのリガンドである RANKL が結合することにより形成される。RAW264.7 細胞を RANKL 処理した結果，多数の TRAP 陽性の破骨細胞が形成されたが，興味深いことに EBV の添加により，その数は EBV の量依存的に増加した。一方，CMV においてはそのような作用は認められなかった。

以上の結果より， EBV は歯肉線維芽細胞において NF-κB の活性化を介して IL-6 および IL-8 の産生を誘導すること，その作用が既存の病原因子や CMV よりも強いことが明らかとなった。また，EBV が破骨細胞分化を誘導することが初めて明らかとなり，骨吸収促進作用を有することも示唆された。歯周病の進行に伴い患者の歯周ポケット内には IL-6 や IL-8 等の炎症性サイトカインが上昇することが報告されている。これらの炎症性サイトカインは LPS などの病原因子同様，RANKL を誘導することにより骨吸収にも深く関与する。本研究から EBV が炎症性サイトカイン産生と破骨細胞分化の両方を強く誘導することが明らかとなり，これまで細菌感染のみでは説明が困難であった歯周病発症機序の解明に繋がる可能性が示唆された。