

## 論文の内容の要旨

氏名：山口 洋子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：抗肝細胞増殖因子（抗 HGF）中和抗体を用いた新たな歯周治療の開発

歯周病は国民病と言われるほど罹患率が高く、2016年の歯科疾患実態調査では、40歳以上の約7割が歯周病であると報告されている。とくに、歯周炎はプラークコントロールを行っても、歯と歯肉との付着の喪失、すなわちアタッチメント・ロスが生じるため、最終的に歯が脱落するリスクがある。また、近年においても歯周炎の有病状況は改善しておらず、有効な治療法が確立されているとはいえない。さらに、適切な実験動物モデルも存在しないため、歯周炎の病態については不明な点が多く残されている。

著者は歯周炎の病態を解明するために、歯周炎患者の歯肉組織由来の歯肉線維芽細胞を外生させて凍結保存し、これらの初代培養細胞を用いて研究を進めてきた。一般的に、細胞は二次元で培養・継代されるが、二次元培養は生体環境と大きく異なるという問題がある。そこで、コラーゲンゼルの中に歯肉線維芽細胞を包埋してゲル化させ、その上に歯肉上皮細胞を播種する細胞包埋法による三次元共培養を行った。

歯周炎患者の歯肉線維芽細胞と歯肉上皮細胞を用いて三次元共培養を行ったところ、コラーゲンを高度に分解する細胞群が存在することがわかった。ほとんどの歯周炎患者の歯肉線維芽細胞から、このような形質を示す細胞群を分離することができたため、これらを歯周炎関連線維芽細胞群（Periodontitis-associated fibroblasts : PAFs）とした。健常者の歯肉組織からは、PAFsのようにコラーゲンを高度に分解する細胞群はこれまで分離されていないことから、PAFsは歯周炎の歯肉組織に特異的な病的変化を起こす細胞群であると考えられた。また、コラーゲンが高度に分解される現象は、歯肉上皮細胞と歯周炎患者の歯肉線維芽細胞の三次元共培養を行ったときにしか認められなかった。したがって、歯肉上皮細胞と歯周炎患者に由来する歯肉線維芽細胞を三次元共培養すると顕著なコラーゲン分解が生じる現象は、歯周炎由来の歯肉線維芽細胞に特異的であることから、歯周炎の分子病態の一部を再現する「生体外歯周炎モデル」として応用可能であると考えられた。

さらに、三次元共培養に用いたコラーゲンゼル中の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、PAFs を含むゼルにおいて肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor : HGF）mRNA の発現が上昇することがわかった。したがって、HGF が歯周炎の病態形成に関与している可能性があるが、詳細は不明である。

そこで、本研究では HGF が歯周炎の病態形成に関与し、歯周炎の治療標的となりうるかを検証するため、抗ヒト HGF ポリクローナル中和抗体（抗 HGF 中和抗体）をサル歯周炎組織に投与し、その治療効果を検証した。また、ヒト生体外歯周炎モデルにおいても抗 HGF 中和抗体を作用させ、コラーゲン分解能や遺伝子発現への影響を検討した。

第1章では、歯周炎を自然発症したサルの歯肉組織に抗 HGF 中和抗体を投与し、その効果を検討し、さらに、サル生体外歯周炎モデルを用いて抗 HGF 中和抗体歯肉組織投与の影響を検証した。まず、歯周炎を自然発症したサルの歯肉にコラーゲンを顕著に分解する細胞群、PAFs が存在することを確認した。また、サルの歯肉線維芽細胞で構築した生体外歯周炎モデルへ抗 HGF 中和抗体を作用させたところコラーゲン分解を阻害した。そして、サルの歯周炎組織での抗体による HGF の中和は歯周炎を改善するのか検討した。サルの歯肉組織に抗 HGF 中和抗体を局所投与し、3か月間経過観察したところ臨床的に歯周炎の改善がみられた。肉眼的観察終了後、歯肉組織を病理組織学的に解析した。その結果、抗 HGF 中和抗体を局所投与された歯肉では炎症性細胞浸潤の減弱がみられた。さらに、その歯肉組織から外生させた歯肉線維芽細胞を用いて三次元培養を行ったところ、抗 HGF 中和抗体を投与された歯肉線維芽細胞を包埋したコラーゲンゼルでは、コラーゲン分解が抑制されていた。以上のことから、抗 HGF 中和抗体は歯周治療薬として有効である可能性が示唆された。

第2章では、歯周炎患者由来の歯肉線維芽細胞を用いた三次元共培養、すなわちヒト生体外歯周炎モデルを用いて、コラーゲンゼル分解に対する抗 HGF 中和抗体の影響を解析した。さらにそのコラーゲンゼル中の細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、HGF を介した作用を阻害することを示す遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。その結果、抗 HGF 中和抗体は、コラーゲン分解を抑制するとともに、

細胞外マトリックス (Extracellular matrix : ECM) や細胞接着に関連する遺伝子群の発現変化を誘導した。このことから、歯周炎組織における HGF を介した作用の阻害は、コラーゲン分解の抑制だけでなく ECM 合成や細胞接着になんらかの影響を及ぼすことが明らかになった。

以上のことから、HGF は歯周炎の病態形成に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、抗 HGF 中和抗体を用いて HGF を介した作用を阻害することは、歯周治療の新たなアプローチとなる可能性が考えられた。