

論文審査の結果の要旨

氏名：比嘉 桂子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Down 症候群由来歯肉線維芽細胞における歯周病原細菌および病原因子に対する異常応答性

審査委員：(主査) 教授 平塚 浩一

(副査) 教授 泉福 英信

教授 野本 たかと

Down 症候群 (DS) は 21 番染色体のトリソミーに起因して様々な表現型を示すことが知られており、口腔領域では重度歯周病の罹患率が高いとされている。原因として活性酸素産生の増加や免疫応答異常などが報告されているが、いまだその発症と進行のメカニズムは明らかにはされていない。そこで本研究は、DS で発症する重度歯周病の発症と進行のメカニズムの解明を目的とした。

歯周病は細菌感染による慢性炎症性疾患であり、発症にはバイオフィルムの形成が重要な働きを担う。近年、大腸癌発症への関与が明らかにされたことで、その多面性が着目されるようになった歯周病原細菌の *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は、他の細菌との共凝集能が高く、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の栄養面をサポートし、バイオフィルムの形成で中心的役割を果たす。

本研究では、*F. nucleatum* に対する歯肉線維芽細胞 (GF) の細胞応答性について、健常由来の GF (NGF) と DS 由来の GF (DGF) を比較した。両 GF に *F. nucleatum* を接種し、炎症誘発性サイトカインである interleukin (IL) -1β , tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ ならびに好中球の走化性に関与するケモカインである IL-8 と、組織破壊に関与する matrix metalloproteinase (MMP) -3 および MMP-9 の遺伝子発現を定量 PCR 法によって比較した。これらの遺伝子産物は、宿主の細胞表層のパターン認識受容体の toll like receptor (TLR) 2, TLR4 で認識された後、nuclear factor κ B や mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して発現が誘導される。また、細胞表層に存在する 7 回膜貫通型受容体の protease-activated receptor (PAR) ファミリーに属する PAR2 は、歯周病原細菌の産生するプロテアーゼによっても活性化される。PAR2 は炎症誘発性サイトカインの発現を誘導し、さらに MAPK の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化 (phospho-ERK1/2) を介して細胞増殖、細胞分化、炎症、免疫応答など多様な応答に関与する。そして、phospho-ERK1/2 の発現には 21 番染色体上にのる DS 責任遺伝子である dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A が関与している。以上のことから、*F. nucleatum* による DGF の細胞応答性について、前述の IL- 1β , TNF- α , IL-8, MMP-3 および MMP-9 の遺伝子発現解析に加えて、TLR2, TLR4 と PAR2, そしてその後のシグナル伝達経路の phospho-ERK1/2 のタンパク質発現を Western blotting 法によって NGF と DGF を比較した。

歯周病の主要な原因細菌である *P. gingivalis* は、細胞外膜で構成された約 100 nm (20-300 nm) の小胞体 (outer membrane vesicles; OMVs) を放出する。*P. gingivalis* 由来の OMVs (P-OMVs) には LPS, gingipain, 線毛などほぼすべての細胞障害性の病原因子が含まれる。P-OMVs は生菌よりも口腔粘膜や線維芽細胞へ侵入しやすく、生菌では検出されない生体部位でも検出されるなど、病原因子として様々な疾患に関与する。以上のことから、GF における P-OMVs に対する細胞応答性を確認すること

とした。

炎症は、細菌やその病原因子の攻撃に対する宿主の防御反応として必要であるが、炎症誘発因子と炎症抑制因子のバランスが宿主細胞の恒常性を維持するうえで重要である。このバランスの破綻が、歯周病のような慢性炎症性疾患を誘発する。炎症過程において重要な働きを示す IL-1 ファミリーには炎症誘発性サイトカインと抗炎症性サイトカインの 2 種類が存在する。炎症誘発性サイトカインの IL-1 β は、歯周組織における炎症過程における宿主細胞の免疫応答に関与する重要な炎症メディエーターであり、抗炎症性サイトカインの IL-37 は炎症誘発性サイトカインの抑制や他の抗炎症性サイトカインの発現誘導を担い、免疫応答抑制に働く。マクロファージへの recombinant IL-37 (rIL-37) の添加は、LPS 誘導のサイトカイン産生を抑制するため IL-37 は炎症抑制の鍵となると考えられる。DGF において、IL-1 β と IL-37 の発現誘導にアンバランスが生じ、DS において炎症をより増強させていると考えられた。P-OMVs で刺激した DGF と NGF における IL-1 β と IL-37 の遺伝子発現解析を定量 PCR 法にて行い比較した。また、phospho-ERK1/2 のタンパク質発現を Western blotting 法にて確認し、さらに ERK1/2 inhibitor を用いて、P-OMVs 刺激による IL-1 β と IL-37 の遺伝子発現の変化について NGF と DGF を比較した。本研究は日本大学倫理審査委員会によって承認を得ている（日本大学倫理審査承認番号：EC 21-014）。

IL-1 β , TNF- α , IL-8 ならびに MMP-3, MMP-9 の遺伝子発現は *F. nucleatum* 接種 3, 6, 9 時間後における全ての時間において NGF, DGF ともに有意に上昇し、DGF の方が NGF よりも有意に高かった。また、*F. nucleatum* 接種 5 分後の TLR2, TLR4 および PAR2 と *F. nucleatum* 接種 15 分後の phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は、NGF, DGF ともに有意に上昇した。*F. nucleatum* 接種によって上昇した TLR2 および TLR4 のタンパク質発現は NGF と DGF に有意差を認めず、PAR2 は NGF に比べ DGF の方が有意に高かった。さらに、phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は、*F. nucleatum* 非接種群および接種群ともに NGF よりも DGF の方が有意に高かった。以上のことから、DGF では *F. nucleatum* 接種による PAR2 とその後の phospho-ERK1/2 の過剰なタンパク質発現が IL-1 β , TNF- α , IL-8 ならびに MMP-3, MMP-9 の遺伝子発現をより増強させたと思われる。

IL-1 β と IL-37 の遺伝子発現は、P-OMVs 刺激によって NGF, DGF ともに有意に上昇した。P-OMVs による IL-1 β 遺伝子発現は NGF よりも DGF の方が有意に高く、IL-37 遺伝子発現は DGF の方が有意に低かった。また、phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は、NGF, DGF ともに P-OMVs 刺激で有意に上昇し、P-OMVs 非刺激群、刺激群ともに NGF より DGF の方が有意に高かった。さらに、NGF では P-OMVs で誘導された IL-1 β , IL-37 の遺伝子発現は、ERK1/2 の inhibitor (PD98059) 添加によって、ともに有意に低下した。一方、DGF では P-OMVs で誘導された IL-1 β 遺伝子発現は PD98059 添加によって有意に低下したものの、IL-37 の遺伝子発現は低下しなかった。以上のことから、DGF においては P-OMVs による IL-1 β と IL-37 の遺伝子発現誘導パターンにアンバランスが生じていることが示された。また DGF においては P-OMVs による IL-1 β 遺伝子発現誘導に phospho-ERK1/2 が関与しているが、IL-37 の遺伝子発現誘導には別の経路が存在する可能性があることが推察された。これらのことが、DS における歯周病による炎症病態の増悪を誘発している可能性がある。

本研究は、Down 症候群にみられる重度歯周病の発症には *F. nucleatum* と P-OMVs に対する宿主細胞の過剰な炎症反応と Down 症候群の異常な遺伝的背景による炎症誘発性および抑制性サイトカインのアンバランスが認められる新たな知見を得たものである。本研究の成果は、今後の Down 症候群での重度歯周病の発症機序の解明に新たな知見を得たものであり、今後の歯科医学ならびに障害者歯科学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

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

5 年 2 月 22 日