

論文の内容の要旨

氏名：朝 山 雄 之

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Involvement of oral bacteria-produced short-chain fatty acids in the development of alveolar osteitis
(口腔内細菌が産生する短鎖脂肪酸と歯槽骨炎の関係)

抜歯後歯槽骨炎は抜歯窩に一旦形成された血餅が除去されることが誘因となり、一般的にドライソケットと呼ばれている。発症率は通常の抜歯では0.5～5%、下顎第三大臼歯の抜歯では30%以上とされ、炎症反応に乏しいことが知られているが詳しい発症メカニズムについては解明されていない。血餅形成のない抜歯窩では、口腔内細菌が抜歯窩に迷入した食物残渣から代謝産物を産生する。また、抜歯窩にはマクロファージが、露出した骨表面には骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞が存在するため、細菌のリポ多糖（LPS）や代謝産物がこれらの細胞に影響を及ぼすと考えられる。本研究では、口腔内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸と抜歯後歯槽骨炎の関係性を探るために、細胞レベルでの研究を試みた。

口腔内細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) W83 株と FDC381 株, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ATCC25586 株と JCM6328 株, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) ATCC25611 株, *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) ATCC33563 株, さらに *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) Y4 株を、ヘミンおよびメナジオン含有 brain heart infusion 培地で培養し、それらの培養上清を濾過滅菌したものを細菌培養上清として使用した。また、細菌培養上清中に含まれる各短鎖脂肪酸の濃度をガスクロマトグラフィーで測定し、得られた濃度を参考にして細菌培養上清と同じ短鎖脂肪酸組成にした混合溶液（短鎖脂肪酸混合溶液）を調整した。まず、マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を LPS と細菌培養上清、短鎖脂肪酸、あるいは短鎖脂肪酸混合溶液を含む培地で 8 時間培養した後、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 発現を western blot で調べた。また、短鎖脂肪酸あるいは短鎖脂肪酸混合溶液とリコンビナントマウス receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) を培地に加えて 4 日間培養後、tartrate-resistant acid phosphatase 染色を行ない、破骨細胞数を測定した。さらに、骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞から限界希釈法によって単離した NDC10E1 クローン株に短鎖脂肪酸あるいは短鎖脂肪酸混合溶液を作用させ、7 日間の石灰化誘導培養後にアリザリンレッド S 染色によって基質の石灰化を確認した。一方、RANKL によって誘導される破骨細胞形成関連遺伝子の発現に及ぼす酪酸の影響を調べるために、RNA-sequencing 法によるトランスクリプトーム解析を行った。RAW264.7 細胞への RANKL 刺激で 4 倍以上発現が上昇した遺伝子群のうち、酪酸で 4 分の 1 以下に発現が抑制された 566 遺伝子を抽出し、gene ontology (GO) 解析を試みた。

P. gingivalis と *F. nucleatum* の細菌培養上清は、LPS 刺激による RAW264.7 細胞の iNOS 発現誘導を抑制した。また、短鎖脂肪酸の酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸、および *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の培養上清と同組成の短鎖脂肪酸混合溶液も LPS による iNOS 発現誘導を抑制した。酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸は破骨細胞形成をほぼ完全に抑制したが、酢酸、乳酸、コハク酸による抑制効果は弱かった。また、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* の短鎖脂肪酸混合溶液は破骨細胞形成をほぼ完全に抑制したが、*P. intermedia*, *P. nigrescens*, および *A. actinomycetemcomitans* の短鎖脂肪酸混合溶液による抑制効果は弱かった。酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、およびイソ吉草酸は NDC10E1 細胞の石灰化を強く抑制した。*P. gingivalis* と *F. nucleatum* の短鎖脂肪酸混合溶液も石灰化を抑制したが、*P. gingivalis* W83 株の短鎖脂肪酸混合溶液の抑制効果は弱かった。一方、トランスクリプトーム解析によって抽出された遺伝子うち、RANKL 刺激により発現上昇の強かった上位 20 位には破骨細胞分化シグナル伝達経路に関わる遺伝子は検出できなかったが、GO 解析では破骨細胞分化との関連が報告されている Rap1 シグナル伝達経路が上位 2 番目であった。

以上の結果から、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* 由来の短鎖脂肪酸が LPS 刺激によるマクロファージの iNOS 発現誘導を抑制することが明らかになった。また、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* の産生する短鎖脂肪酸は破骨細胞形成の完全な阻害と骨芽細胞による石灰化物形成の減弱化を、また、*P. intermedia*, *P. nigrescens*, および *A. actinomycetemcomitans* の産生する短鎖脂肪酸は破骨細胞形成の減弱化を引き起こ

し、抜歯窩における骨吸収と骨形成の均衡を破綻させる可能性が考えられた。さらに、酪酸による RANKL 誘導性の破骨細胞形成の抑制には、Rap1 シグナル伝達経路が関与する可能性が示唆された。