

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	芥川 桂一
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Effects of glycyrrhizin on ligature - induced periodontal inflammation with <i>Porphyromonas gulae</i> infection and blood glucose level in diabetes model mice (糖尿病マウスに <i>Porphyromonas gulae</i> 感染と絹糸結紮で誘発した歯周炎およびその血糖値に対する glycyrrhizin の影響)			
論文審査担当者			
主査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 柴 秀樹		
審査委員	准教授 宮内 睦美		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周病は歯周病原細菌の感染によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、宿主寄主体相互作用の結果、歯周組織に炎症が起きる。歯周組織の慢性炎症は血中の炎症性サイトカインを上昇させ、インスリン抵抗性を惹起し糖尿病 (DM)を増悪させる。一方、糖尿病は宿主の易感染性を引き起こし、歯周病の進行・重症化に関与する。そのメカニズムとして、糖化最終産物(AGEs)の増加及び脂肪細胞が産生する炎症性サイトカインの増加が関与していると考えられる。したがって、DM 患者における歯周組織の炎症の制御は両疾患のコントロールに重要である。核内の非ヒストン性タンパク質である high mobility group box 1 (HMGB1)は免疫応答や細胞死によって細胞外に放出され、AGEs の受容体である receptor for AGEs (RAGE)に結合し炎症性サイトカイン産生を誘導する。また、HMGB1 は歯周病の病巣局所で発現量が増加することから、炎症性サイトカインの上昇に関与している可能性がある。glycyrrhizin (GL)は漢方として用いられる甘草に含まれており、HMGB1 阻害物質として知られている。GL は HMGB1 に直接結合することで HMGB1 を介したサイトカイン産生を阻害する。そこで本研究では、歯周病を誘発した DM モデルマウスを作製し、HMGB1 を GL で阻害することによって歯周病ならびに糖尿病の指標の一つである血糖値の変化に与える影響を評価することを目的とした。</p> <p>材料と方法として、KK/TaJcl マウス（雄、5 週齢）に高脂肪食である HFD32 を 7 週間給餌し DM モデルマウスを作製した。通常食群と高脂肪食群の 2 群を作製し、高脂肪食群に糖尿病を誘発した。糖尿病の状態は体重増加、8 時間空腹時血糖値、経口ブドウ糖負荷試験によって評価した。作製した DM モデルマウスに、上顎左側第 2 臼歯に対する 5-0 絹糸の結紮および動物の歯周病原細菌である <i>Porphyromonas gulae</i> (<i>P.gulae</i>) ATCC 51700 の感染によって歯周病を誘導した。非処置群と歯周病誘導群を作製した。歯周病誘導群に対して絹糸結紮を行うとともに、<i>P.gulae</i> を 1×10^8CFU の密度で 2% carboxymethyl cellulose に懸濁し、それを綿球に浸漬させたものを口腔内留置した。<i>P.gulae</i> 綿球の留置は結紮当日から 2</p>			

週間、毎週 2 回ずつおこなった。これを歯周病 DM モデルマウスとした。マウスの歯周病の評価は *P.gulae* に対する血清抗体価、およびマイクロ CT による骨吸収像によって行った。さらにマウスを 2 週間後に屠殺し、歯周組織の病理組織標本での評価を行った。歯周病 DM モデルマウスに対する GL の影響を検討するために、GL を hydroxiethyl cellulose (HEC) 3% (w/v)ゲルに溶解し 1% (w/v)として口腔内塗布によって局所投与した。塗布は、結紮と *P.gulae* 感染による歯周病誘導処置開始時から屠殺まで毎日行なった。マウスは、歯周病を誘導していない DM モデルマウス群、歯周病 DM モデルマウスの HEC ゲル投与群、GL 投与群の 3 群を作製し、2 週間後に屠殺した。炎症関連因子の評価を行うために、歯肉・肝臓の total RNA ならびに血清を回収し、tumor necrosis factor (TNF) - α 、interleukin (IL) -1 β 、IL-6、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)、osteoprotegerin (OPG)、RAGE および HMGB1 の mRNA 発現を real-time (RT) - PCR で評価した。また、血清中の TNF- α 、IL-6、C-reactive protein (CRP)、Serum Amyloid A (SAA)、RAGE および HMGB1 の量を ELISA 法によって解析した。4 週間飼育した歯周病 DM モデルマウスの 8 時間空腹時血糖値を測定した。さらに、HMGB1 阻害が血糖値に与える影響を評価するため、4 週間飼育した群に抗 HMGB1 中和抗体 50 μ g を静脈内投与し 8 時間空腹時血糖の測定を行った。

高脂肪食の給餌によって体重増加ならびに空腹時血糖の上昇が認められたため DM モデルマウスとした。また、DM モデルマウスにおいて、絹糸結紮、*P.gulae* 塗布によって血清抗体価の上昇、歯槽骨の吸収ならびに歯周組織中への炎症性細胞浸潤を認めたため、歯周病 DM モデルマウスが確立できた。歯周病 DM モデルマウスにおいて、歯肉の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現は上昇し、血清中の TNF- α 、IL-6、CRP 及び SAA は増加した。一方、肝臓における TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現の上昇は認められなかった。4 週間飼育群では空腹時血糖の上昇が認められた。このことから歯周組織の慢性炎症による炎症性サイトカインの増加が血糖値を上昇させる可能性が示唆された。また、GL 口腔内局所投与によって歯周病 DM モデルマウスにおける血清抗体価の抑制が認められた。一方で、歯槽骨の吸収、RANKL、OPG の歯肉における mRNA 発現の抑制は認められなかった。GL は歯肉における TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 の mRNA 発現ならびに血清中の TNF- α 、IL-6 及び SAA の上昇を抑制し、4 週間飼育後の歯周病 DM マウスの空腹時血糖の上昇を抑制した。このことから、GL の口腔内局所投与は歯周組織の炎症を抑制し、血中の炎症性サイトカインを減少させて、血糖値の上昇を抑制することが示唆された。歯周病 DM モデルマウスの歯肉における RAGE および HMGB1 の mRNA 発現ならびに血清中の RAGE 及び HMGB1 が増加したが、GL 口腔内局所投与はそれらの増加を抑制した。さらに、抗 HMGB1 中和抗体の投与は空腹時血糖を抑制した。

以上の結果から歯周病 DM モデルマウスにおいて口腔内局所投与した GL は、HMGB1 制御を介して歯周組織の炎症を抑制し、血糖値を改善することが示唆された。本研究は HMGB1 を標的とした歯周病と糖尿病の両疾患の病態改善に貢献できる基礎研究である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が芥川 桂一に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。