

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	佐々木 慎也
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
脳由来神経栄養因子（BDNF）を用いた非外科的歯周治療の基礎研究			
論文審査担当者			
主査	河口 浩之	印	
審査委員	加藤 功一		
審査委員	谷本 幸太郎		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は糖尿病や心疾患，関節リウマチなど多くの全身疾患との関連が報告されていることから，歯周炎の治療は単に口腔内の問題解決でなく，全身の健康増進への貢献度も高いと考えられる。しかし，重症化した歯周炎の治療は困難で，現在の歯周組織再生療法には，外科的侵襲が避けられないことや適応症が限られることなど，克服すべき問題が残っている。そこで，本研究は歯周炎の病態が悪化する前に，軽度に破壊された歯周組織を再生させる非外科的歯周治療法を開発することを目的とした。申請者の所属研究室ではこれまでに，フラップ手術に脳由来神経栄養因子（BDNF）/高分子ヒアルロン酸（HMW-HA）複合体ゲルを併用すると，セメント質と歯槽骨の再生が促進されることをビーグル犬とカニクイザルの根分岐部病変モデル（中等度歯周組織欠損を想定）で明らかにした。さらに非外科的に歯周組織を再生する上での障害となる歯肉上皮細胞のアポトーシスを BDNF が誘導することも <i>in vitro</i> で明らかにした。これらの BDNF の特徴を踏まえて，軽度歯周炎に対してスケーリング・ルートプレーニング（SRP）を行い，歯周ポケット内に BDNF を投与することで非外科的に歯周組織再生が促進されるという仮説を立てた。さらに再生を誘導するためには炎症の制御が必要であることから，本研究ではマクロファージの活性化に及ぼす BDNF の影響も検討した。</p> <p>実験方法として，まずビーグル犬の下顎第2～4前臼歯に絹糸を結紮し，軽度歯周組織破壊を伴う歯周炎モデルを作製した。SRP後に BDNF/HMW-HA 複合体ゲルを歯周ポケット内に注入した（BDNF/HMW-HA 群）。対照として無処置群，SRPのみ行う群，SRP後に HMW-HA を投与する群を設定した。処置前と処置2週間または6週後に臨床データ（アタッチメントレベル，ポケットデプス，プロービング時の出血，歯肉炎指数）を記録した後に灌流固定し，組織標本作製後，HE染色，アザン染色，免疫染色（オステオポンチン，BDNF受容体 TrkB）を行い観察した。</p> <p>また，マクロファージ活性化に及ぼす BDNF の影響を検討するため，まず貪食能に着目した。実験にはマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた。細胞を BDNF（50</p>			

ng/mL) で 12 時間刺激し、培養終了 30 分前に FITC 標識ラテックスビーズを培地中に加えて貪食させ、蛍光強度を測定した。BDNF 添加の 30 分前に K252a (TrkB 阻害剤) もしくは Rac1 阻害剤を加えてその影響も評価した。BDNF が GTP 結合型 Rac1 発現および Rac1 のリン酸化に及ぼす影響をプルダウンアッセイとウェスタンブロッティングによって解析した。次に、炎症性サイトカイン発現に関する実験を行った。RAW264.7 を培養終了前の 0, 3, 6, 12, 24 時間 BDNF (50 ng/mL) で刺激し、interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。また、K252a を BDNF 添加の 30 分前に作用してその影響を調べた。最後に、IL-1 $\beta$  が貪食能に及ぼす影響を調べるために、IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 単独もしくは IL-1 $\beta$  の中和抗体存在下で貪食能を検討した。

BDNF/HMW-HA 群は対照群と比較し、臨床データが最も改善し、組織学的には歯周ポケット内の上皮の根尖側への増殖が抑制され、炎症性細胞浸潤は最も軽度であった。また、コラーゲン線維の埋入を伴う新生セメント質と新生骨が観察された。新生セメント質表層や新生骨に TrkB とオステオポンチンに陽性反応を示す細胞が認められた。以上のことから、BDNF が歯周組織再生を促進したと考えられる。

マクロファージへの作用として、BDNF は RAW264.7 の貪食能を無刺激時と比較し約 2.5 倍上昇させた。その効果は K252a および Rac1 阻害剤によって抑制された。活性型である GTP 結合型 Rac1 およびリン酸化 Rac1 は BDNF 刺激 15 分をピークに発現が促進された。以上のことから、BDNF は Rac1 活性化を介して、マクロファージの貪食を亢進することが示唆された。さらに、BDNF は IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を促進し、その効果は K252a で抑制された。また、IL-1 $\beta$  は RAW264.7 の貪食能を無刺激時と比較し約 3 倍上昇させた。このことから、BDNF による炎症性サイトカイン発現促進と貪食亢進の関連性が示唆された。

以上の結果から、軽度歯周炎に対し BDNF/HMW-HA 複合体ゲルを SRP と併用することによって、過度の炎症が抑制され、歯周組織再生が促進される可能性が示唆された。また、炎症が抑制された機序の一端には、BDNF のマクロファージの活性を制御する作用が影響している可能性が考えられた。

本論文の研究成果は、歯周組織の非外科的再生の可能性について新知見を与え、今後の歯周病治療の発展に寄与するものと考えられる。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が佐々木慎也に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	佐々木 慎也
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
脳由来神経栄養因子（BDNF）を用いた非外科的歯周治療の基礎研究			
最終試験担当者			
主査	河口 浩之	印	
審査委員	加藤 功一		
審査委員	谷本 幸太郎		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年11月7日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月6日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1. 歯周病原細菌と歯周組織再生の関連性について			
2. BDNFによる歯周組織再生治療を非外科手術で行う場合の特徴と利点について			
3. 高分子ヒアルロン酸をBDNFの担体として用いた理由、組織再生への影響について			
4. BDNF群の早期組織再生のメカニズムについて			
5. 組織修復過程におけるマクロファージを介したBDNFの作用機序について			
6. 本研究で得られた新たな知見及び今後の研究課題と展望について			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			