

学位論文の内容要約

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

佐々木 慎也

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻 歯学専門プログラム

2018 年度

主指導教員：栗原 英見 教授
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

【目的】

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。当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 *in vitro* 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。

【材料と方法】

1. 絹糸結紮歯周炎モデルを用いた BDNF の歯周組織再生効果の検討

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 週間後または 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。

2. マクロファージ活性に及ぼす BDNF の影響の検討

(1) 食食能

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 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。

(2) 炎症性サイトカイン発現

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 β 、IL-6、tumor necrosis factor (TNF) - α 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。IL-1 β が貪食能に及ぼす影響を調べるために、IL-1 β (10 ng/mL) 単独もしくは IL-1 β の中和抗体存在下で貪食能を検討した。

【結果と考察】

1. 絹糸結紮歯周炎モデルを用いた BDNF の歯周組織再生効果の検討

- BDNF 投与 2 週間後に臨床的指標が他群と比較して最も改善した。
- BDNF 投与 2 週間後に炎症性細胞浸潤の減少と上皮の増殖抑制を認めた。
- BDNF 投与 2 週間後に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、その周囲の細胞にオステオポンチンと TrkB の陽性反応が認められた。
- BDNF 投与 6 週間後では新生セメント質と新生歯槽骨が投与 2 週間後と比較してより顕著に認められた。

2. マクロファージ活性に及ぼす BDNF の影響の検討

- BDNF で刺激すると RAW264.7 の貪食能が亢進し、TrkB 阻害剤および Rac1 阻害剤の添加で抑制された。
- BDNF は RAW264.7 の GTP 結合型 (活性型) Rac1 および Serine-リン酸化 Rac1 の発現を促進した。
- BDNF で刺激すると IL-6、IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現がわずかに上昇し、TrkB 阻害剤の添

加で抑制された。

- ・ IL-1 β は RAW264.7 の貪食能を亢進した。

【結論】

BDNF は非外科的歯周治療と併用することで、過度の炎症を抑制し、セメント質や歯周靭帯、歯槽骨などの歯周組織の再生を促進することが示唆された。また、*in vivo* で認められた炎症制御の機序の一端として、BDNF がマクロファージの活性に及ぼす作用が考えられた。すなわち、BDNF はマクロファージの貪食能を亢進させることで創傷治癒の初期に起炎物質の排除を促進し、歯周組織再生の促進に寄与している可能性が示唆された。