

# 論文内容要旨

実験的歯周炎モデルマウスにおける歯肉上皮細胞および好中球に着目した歯周炎持続メカニズムの解明

主指導教員：栗原 英見 教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹 教授

(医系科学研究科 歯髓生物学)

副指導教員：宮内 睦美 教授

(医系科学研究科 口腔顎顔面病理病態学)

竹村 翼

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

歯周病は細菌感染とそれに対する免疫応答による慢性炎症性疾患である。炎症が長期的に持続することで、炎症性サイトカインの継続的な全身への移行や、血中の高感度 CRP が上昇することにより、糖尿病や関節リウマチなどの様々な疾患に影響する。これまでに、歯周病の初期段階において歯周病原細菌に対して歯肉上皮細胞と好中球が応答して歯周病が発症していくメカニズムが解明されてきた。しかし、炎症が長期間持続していくメカニズムについては不明な点が多い。炎症の長期化が歯周組織のみならず全身に与える影響を考えると、炎症の慢性化メカニズム解明は極めて重要である。本研究では、歯肉上皮細胞と好中球の動態、またその制御機構に着目して、炎症が持続するメカニズムを解明することを目的とした。

## 【材料と方法】

### 実験 1

実験には BALB/c の雄マウス (7~9 週齢) を供試した。上顎第二大臼歯に 7-0 絹糸を結紮し、非結紮群、結紮後 30 分, 6, 12 時間, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 日の各群に分けて以下の実験を行った。

- 1) 上顎骨を剖出し、通法通りパラフィン包埋切片を作製し、Hematoxylin Eosin 染色また E-cadherin の免疫染色をした。
- 2) 結紮絹糸を回収後、好気性細菌を評価するために、回収した絹糸から BHI 液体培地(1ml)中にボルテックスミキサーで菌を分散した後、BHI 寒天培地に播種、37°C で 2 日間培養して CFU を算出した。また、嫌気性細菌の評価のために、回収した絹糸から TSBYE 液体培地(1ml)中に同じ方法で菌を分散した後、SCD 羊脱繊維血液寒天培地に播種、37°C で 1 週間嫌気培養後に CFU を算出した。
- 3) セメント-エナメル境から歯槽骨頂の距離を Image J 上にて計測することで、歯槽骨吸収量の評価を行った。
- 4) 口蓋側歯肉を採取し、RNA 抽出後に real-time PCR 法で IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, CXCL1, 2, E-cadherin の mRNA 発現を解析した。
- 5) 歯槽骨を剖出し、IV型コラゲナーゼ処理後に歯肉を採取、フィルターで濾して細胞を分離回収後、CD45, CD11b, Ly6G に対するそれぞれの抗体を結合させ、FACS による好中球の動態解析を行った。
- 6) 上顎骨を剖出し、脱灰後に凍結切片を作製し、抗 Ly6G 抗体で免疫染色をした。

### 実験 2

不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞 (RT7) 培養系を用いて以下の実験を行った。

- 1) IL-1 $\beta$  または IL-6 刺激時の E-cadherin mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。
- 2) IL-17 刺激時の IL-8, E-cadherin mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。
- 3) 細胞スクラッチ法によって、IL-17 または IL-8 刺激時の上皮細胞の遊走能、増殖能を評価した。

## 【結果】

### 実験 1

- 1) 結紮 1 日後から接合上皮構造の破壊、上皮とセメント質との剥離が見られた。一方、5 日以降では上皮とセメント質との再付着が見られ、上皮バリアが修復傾向を示した。
- 2) 絹糸から検出された好気性細菌は結紮 7 日目以降で増加した。また嫌気性細菌は 5 日目以降で増加した。
- 3) 歯槽骨の吸収は結紮 5 日後に進行した。
- 4) 歯肉組織における CXCL1,2 mRNA 発現は結紮 6,12 時間後と 7 日後、二峰性のピークが見られた。IL-17 mRNA 発現は 1 日後また 5,7 日後で増加した。IL-6 mRNA 発現は 12 時間後で、IL-1 $\beta$  mRNA 発現は 2 日後にピークに達した。E-cadherin mRNA 発現は 1 日後に減少し、5 日以降で回復した。
- 5) FACS 解析の結果、歯周組織中の好中球の割合は 12 時間後および 5,7 日後で増加した。
- 6) 免疫染色で、12 時間後、5,7 日後において上皮組織への好中球の浸潤が見られた。

### 実験 2

- 1) RT7 の E-cadherin mRNA 発現は IL-6、IL-1 $\beta$  刺激によって濃度依存的に減少した。
- 2) IL-17 刺激によって、RT7 の IL-8 mRNA 発現は濃度依存的に増加したが、E-cadherin mRNA 発現には影響しなかった。
- 3) RT7 の細胞遊走能、増殖能は IL-17、IL-8 刺激によって亢進した。

## 【考察】

絹糸結紮歯周炎モデルは初期に好中球の浸潤とそれに続く上皮バリアの破壊が生じ、深部組織への急激な細菌感染拡大と、それに伴い急速な炎症の拡大と歯槽骨の吸収が生じる。その後、歯肉上皮細胞の遊走、増殖が亢進し、上皮バリアが修復傾向に入ること、深部組織への細菌感染が減少し歯槽骨の吸収が収束していく一方、上皮組織への好中球浸潤が持続することで軽微な炎症が維持されていくと考えられる。したがって、炎症が軽微な状態で長期的に維持されるメカニズムには上皮バリアの修復が関与している可能性が示唆された。また、上皮バリアの修復には IL-17 や IL-8 の関与が示唆された。