

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	竹村 翼
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 The elucidation of mechanism on persistent inflammation of experimental periodontitis focusing on the gingival epithelium and neutrophil (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)			
論文審査担当者			
主査	河口 浩之 教授	印	
審査委員	杉田 誠 教授		
審査委員	太田 耕司 教授		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周病は細菌感染と免疫応答からな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、血中 CRP が上昇することが知られており、糖尿病やリウマチ等の様々な疾患に影響することが知られている。一方で、歯周炎がどのように長期間持続していくかについては不明な点が多い。歯周病の病態メカニズムについて明らかにすることは歯周病の治療ひいては全身の健康維持を考える上で極めて重要である。以上のことから私は、歯周病の炎症持続メカニズムを上皮と好中球に着目して明らかにすることとした。</p> <p>動物は BALB/c の雄(7~9 週齢)を使用した。上顎第二臼歯に 7-0 絹糸を結紮し、歯周炎を惹起させ実験を行った。実験①では、組織学的分析は、マウスをサクリファイスし上顎骨を採取、通法通りにパラフィン包埋切片を作製、HE 染色また E-cadherin(上皮細胞間接着因子)の免疫染色を行った。細菌感染評価は、絹糸を回収し、好気性細菌感染の評価は BHI 液体培地(1ml)に回収後、BHI 寒天培地に播種、2 日間 37℃にて培養、また嫌気性細菌感染の評価は TSBYE 液体培地(1ml)に回収後、血液寒天培地に播種、1 週間 37℃にて嫌気培養後に CFU カウントを行った。歯槽骨吸収量の評価は、絹糸を除去し、歯槽骨吸収量の計測を行った。</p> <p>実験②では、分子生物学的分析は、口蓋側歯肉を採取し、RNA 抽出後に real-time PCR 法にて、IL-18, IL-6, IL-17 (炎症性サイトカイン)また CXCL1,2 (好中球ケモカイン)さらに E-cadherin の mRNA 発現について解析を行った。好中球動態の評価は、歯槽骨周囲のみをトリミングしIV型コラゲナーゼ処理後(37℃,1hr)に歯肉を回収、ホモジナイズにて細胞回収し CD45(白血球マーカー)、CD11b Ly6G(好中球マーカー)抗体の染色操作を行い、FACS による解析を行った。また、上顎骨を回収し固定、脱灰後に凍結切片を作製し、Ly6G の免疫染色を行った。炎症性サイトカインの上皮間接着因子発現に対する影響の検討は、不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞(RT7)を用い、ヒトリコンビナント IL-18 もしくは IL-6 刺激を加えることで E-cadherin の mRNA 発現への影響を real-time PCR 法にて解析を行った。</p> <p>実験③では、IL-17 および IL-8(ヒト好中球ケモカイン)が上皮細胞バリアへ与える影響の検討は、RT7 を用い、ヒトリコンビナント IL-17 を加え、IL-8, E-cadherin の mRNA 発現への影響を real-time PCR 法にて解析を行った。また、IL-17 もしくは IL-8 刺激を加え、細胞スクラッチ法により、上皮細胞の遊走、増殖能への影響を評価した。</p> <p>実験①では、結紮 12 時間までは接合上皮構造が維持されていた。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に入ることが確認された。また、好気性細菌は 7 日以降で有意に感染が拡大した。また嫌気性細菌は 5 日以降で有意に感染が拡大した。さらに、歯槽骨の吸収は 5 日後に有意に進行した。7,10 日後では吸収は収束した。</p> <p>実験②では、CXCL1,2 の mRNA 発現は 6,12 時間でピークに達し、減少傾向となったが、</p>			

7日で有意に増加した。IL-17 の mRNA 発現は1日後に有意に増加し、減少傾向となったが、5,7日で有意に増加した。IL-6 の mRNA 発現は12時間でピークに達し、減少傾向となった。IL-18 の mRNA 発現は2日後にピークに達し、減少傾向となった。E-cadherin の mRNA 発現は1日後に有意に減少し、5日以降で回復した。また、CXCL1,2 の発現に呼応する形で、組織中の好中球の割合は12時間および5,7日で有意に増加した。なお、免疫染色でも上皮下への好中球の浸潤が見られた。さらに、RT7におけるE-cadherin の mRNA 発現はIL-6,IL-18共に濃度依存的に減少傾向が見られた。

実験③では、IL-17により、RT7におけるIL-8 の mRNA 発現は濃度依存的に増加傾向が見られたが、E-cadherin の発現には影響しなかった。IL-17,IL-8共にRT7の細胞遊走、増殖能に有意な増加が見られた。

以上から絹糸結紮歯周炎モデルは初期に上皮破壊が生じ、深部組織への急激な細菌感染拡大が生じることで急速な炎症の拡大と歯槽骨の吸収が生じる。一方で上皮バリアが修復傾向に入ることによって深部組織への細菌感染がある程度遮断され、炎症応答が収束し、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が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は歯周炎の新規予防、治療法を考える上で大きな示唆を与えうると考える。

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