

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	古玉 大祐
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
実験的歯周炎マウスにおける海馬領域の炎症反応			
論文審査担当者			
主査教授 宮内 睦美 印			
審査委員 教授 小松澤 均			
審査委員 教授 河口 浩之			
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>高齢化の進行に伴い，認知症患者数は増加している。2025年には認知症患者数は700万人に達し，高齢者の5人に1人が認知症を発症すると予測されている。認知症の60～70%をアルツハイマー型認知症（AD）が占めると報告されている。</p> <p>ADは患者本人だけでなく，家族や，社会の大きな問題であり，そのメカニズムの解明，治療法開発は大変期待されている。ADの臨床症状が現れる20～30年前から脳組織中で，アミロイドBの沈着や神経変性などの病理学的変化が生じていると報告がされている。また，全身の慢性炎症が持続すると，血流中の炎症性サイトカインが上昇することで，血液脳関門（BBB）の透過性が亢進し，脳組織内で炎症性変化が生じると報告されている。その結果，脳組織内の炎症が，アミロイドBの産生，神経変性或細胞死を誘導し，AD発症の素因になると考えられている。</p> <p>歯周炎も慢性炎症で，全身疾患との関連が明らかになっている。歯周組織の炎症がAD発症に関わる可能性がある。歯周治療によってAD発症を遅らせることが出来れば，歯周治療が社会に与える影響は極めて大きい。本研究では歯周炎と脳の炎症の関連について詳細に解明することを目的として動物の歯周炎モデルを用いて以下の研究を行った。</p> <p>実験としては，6-8週齢のc57BL/6の雌マウスに5-0絹糸を上顎両側第二臼歯に結紮して歯周炎を発症させた群を歯周炎症群とし，これを歯周炎モデルとした。絹糸を結紮しない群を歯周健全群とし，対照群とした。</p> <p>歯周炎症群の歯周組織，血清中における炎症性サイトカインの発現を検討するために，歯周炎症群（結紮1，4，8週間）と歯周健全群の歯肉中の<i>Il1b</i>，<i>Tnfa</i>，<i>Il6</i>のmRNAの発現量をreal time PCRで調べ，血清中のIL-1β，TNF-α，IL-6の濃度はELISAを用いて解析した。</p> <p>海馬における炎症性サイトカインの発現を調べるために，絹糸結紮1週間後の歯周炎症群から海馬を剖出し，<i>Il1b</i>，<i>Tnfa</i>，<i>Il6</i>のmRNA発現量をreal time PCRで調べた。血中のIL-6が海馬の<i>Il1b</i>のmRNA発現に与える影響を，歯周健全群に，1000 ng/miceの</p>			

recombinant IL-6 または生理食塩水を尾静脈から投与し、また、歯周炎症群に絹糸結紮当日、3日目に IL-6 の中和抗体、または対照としてラット IgG を尾静脈から投与することで検討した。

歯周炎症群の海馬における BBB 構成因子の発現変化を調べるために、絹糸結紮 1 週間後の海馬を剖出し、海馬における tight junction 関連遺伝子(*Tjp1*, *Cldn5*, *Ocln*) の mRNA 発現量を real time PCR で調べた。絹糸結紮 1 週間後の全脳を剖出し、組織切片を作成し、CD31 (血管内皮細胞の指標分子) と *Cldn5* を蛍光色素標識抗体による二重染色を行い、血管内皮細胞の *Cldn5* 発現を蛍光顕微鏡下で観察した。血中 IL-6 が海馬血管内皮細胞の *Cldn5* 発現に対する影響を、歯周炎症群マウスに、絹糸結紮当日、3日後に IL-6 の中和抗体または対照としてラット IgG を尾静脈から投与し、投与 7 日後に全脳を剖出し、組織切片を作成し、CD31 (血管内皮細胞の指標分子) と *Cldn5* を蛍光色素標識抗体による二重染色を行い、血管内皮細胞の *Cldn5* 発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

歯周炎症群の BBB の透過性亢進に対する検討をするために、歯周健常群、または絹糸結紮 7 日目の歯周炎症群マウスに biotin 標識 3000D の dextran を尾静脈から投与し、投与 10 分後に全脳を剖出し、組織切片を作成し、CD31 を蛍光色素標識抗体による染色を行い、dextran が血管内から脳組織内へ漏出している像を観察した。

歯周炎症群では歯肉中の *Il1b*, *Tnfa*, *Il6* の mRNA 発現が上昇していることを確認した。歯周炎症群では血清中 IL-6 濃度も上昇していた。歯周組織の炎症は血清中 IL-6 レベルに影響を与えることが示唆された。歯周炎症群の海馬中の *Il1b* mRNA 発現は上昇したが、*Tnfa*, *Il6* の mRNA 発現に変化はなかった。この *Il1b* mRNA 発現の上昇は IL-6 中和抗体の投与群で抑制された。一方で、歯周健常群に recombinant IL-6 を投与することによって海馬中の *Il1b* mRNA 発現上昇が誘導された。歯周組織の炎症によって上昇した血清中 IL-6 が海馬の炎症を誘導すると考えられる。歯周炎症群の海馬組織中の *Cldn5* mRNA 発現が低下し、海馬の血管内皮細胞における *Cldn5* の発現低下が観察された。この *Cldn5* 発現低下は IL-6 の中和抗体投与によって回復した。歯周組織の炎症によって上昇した血清中 IL-6 が海馬の BBB の機能低下を誘導する可能性が示された。歯周健常群に比べ、歯周炎症群で有意に血管外へ biotin 標識 3000D の蛍光を発する面積が広がった。このことから、歯周組織局所の炎症が、BBB の透過性の亢進を誘導したと考えられる。

本研究の結果から歯周組織の炎症によって誘導された血中の IL-6 によって、海馬領域の血管内皮細胞膜上の *Cldn5* の発現は低下し、BBB の透過性が亢進した。また、これにより海馬領域で炎症反応が誘導された。歯周炎を早期から治療することで、歯周炎の急性増悪を防ぎ、慢性炎症を取り除くことによって、海馬領域の炎症反応を抑制出来れば、AD 発症時期を遅延させ、相対的な AD 患者数の減少に繋がる可能性があると考えられる。

以上の結果から、本論文は歯周炎の治療の重要性をさらに普及啓発することに貢献し、AD 発症メカニズムの解明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、本論文が古玉大祐に博士 (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。