

氏名	佐光 秀文
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6153号
学位授与の日付	令和2年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	真菌二次代謝産物(+)-terrein は絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて 炎症性骨吸収を抑制する
論文審査委員	大原 直也 教授 江國 大輔 准教授 稲葉 裕明 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

歯周病は、口腔内の細菌性バイオフィルム感染が原因となって発症する炎症性疾患である。現行の歯周病治療は細菌バイオフィルムの機械的除去が中心である。しかし、組織破壊をもたらす炎症反応に関しては宿主に依存しており、炎症反応に対する新たなアプローチが求められている。

インターロイキン6 (IL-6) は、免疫反応の初期に歯周組織の多様な細胞から産生される炎症性サイトカインである。先行研究から、歯根膜線維芽細胞から産生される IL-6 はヘルパーT17 細胞への分化を誘導し、歯周組織中の receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) 濃度を上昇させ、破骨細胞分化亢進による歯槽骨吸収を強力に誘導することが知られている。したがって、IL-6 の作用を制御することによって、歯周炎症による組織破壊を制御することが可能になると考えられる。

一方、IL-6 を標的とした分子標的薬はすでに上市され、関節リウマチの治療等において効果をあげている。しかし、宿主の免疫応答を強力に抑制するため、易感染状態に陥る副作用が問題となっている。そのため、新規の作用機序でマイルドな抗炎症性骨吸収治療薬の開発が求められている。

申請者は、抗炎症作用を有すると報告される天然化合物の中から、真菌 *Aspergillus terreus* の二次代謝産物として分離された低分子化合物(+)-terrein (TER) に着眼した。*in vitro* の先行研究から、有機化学的に合成した TER は、IL-6 そのものではなく、IL-6 が誘導する血管内皮細胞増殖因子やマクロファージコロニー刺激因子の産生抑制作用と、RANKL 誘導性の破骨細胞分化抑制作用を有することが報告されている。そのため、炎症性骨破壊疾患の一つである歯周病においても、TER は炎症性骨吸収抑制作用を示すことが期待される。しかし、TER の *in vivo* における炎症性骨吸収抑制作用とその機序は未だ不明である。

本研究では、TER の *in vivo* における炎症性骨吸収抑制効果を検討するため、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用い、骨吸収抑制効果、抗炎症効果、および生体安全性について検討した。

【材料・方法】

1. 試薬：TER は L-酒石酸から合成したものをを用いた（岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士から恵与された）。
2. 絹糸結紮歯周炎マウスモデルの作製：10 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウスの上顎左側第二臼歯に 6-0 絹糸を結紮し、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* W83 株を感染させた。さらに、TER (30 mg/kg) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を腹腔内に投与した。
3. 画像解析：Micro-computed tomography (マイクロ CT) 解析を用いて、歯槽骨吸収量を定量した。

4. 組織学的解析：ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，末梢好中球と単球のマーカータンパク質である Ly-6g と Ly-6c に対する抗体を用いた免疫組織化学（IHC）染色，および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）染色を行い，組織像を観察した。
5. 歯周組織における炎症性骨吸収関連遺伝子発現の解析：被験部位の口蓋側歯肉を採取し，全 RNA を抽出した。Real time reverse transcription-polymerase chain reaction（リアルタイム RT-PCR）を用い，*IL-17A*，*Tumor necrosis factor alpha*（*TNF- α* ），および *Osteoprotegerin*（*OPG*）の発現量を解析した。なお，mRNA 発現量は，*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*（*GAPDH*）を内在性コントロールとして，比較 Ct 法にて定量を行った。なお，同個体の絹糸を結紮しなかった反対側を陰性コントロールとして，相対発現量を求めた。
6. 血清中炎症性サイトカインの解析：末梢血を採取後に遠心分離を行い，血清を回収した。Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法を用いて，血清中の *TNF- α* と *IL-6* の濃度を定量した。
7. TER の生体安全性の解析：PBS および TER を投与し，投与期間中の体重変動を測定した。また，投与開始 14 日後に肝臓および腎臓を摘出し，組織学的変化を観察した。
8. 統計解析：2 群間の差の検定には Student's *t*-test を用いた。3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance，多重比較検定には Tukey-Kramer test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. マイクロ CT による歯槽骨吸収の評価：TER 投与群では，PBS 投与群に対して，歯周炎誘導 7 日後および 14 日後の歯槽骨吸収が有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。
2. 好中球の浸潤と破骨細胞発現の評価：HE 染色において，歯周炎群では，非歯周炎群と比較して，結紮糸による上皮の陥凹がみられた。IHC 染色において，TER 投与群では，PBS 群に対して，Ly-6g 陽性好中球の上皮下組織への浸潤が抑制された。TRAP 染色において，TER 投与群では，PBS 投与群に対して，破骨細胞数が有意に抑制された（ $p < 0.05$ ）。
3. 歯周炎誘導から 7 日後の歯周組織中の炎症性骨吸収関連遺伝子の評価：TER 投与群では，PBS 投与群に対して，歯周炎誘導部における *TNF- α* mRNA の発現量が，歯周炎未誘導のレベルまで減少した（ $p < 0.05$ ）。また，統計学的に有意差がなかったものの，*IL-17A* mRNA の発現量は減少傾向にあり，*OPG* mRNA の発現量は増加傾向にあった。
4. 歯周炎誘導から 7 日後の血清中の炎症性サイトカインの評価：TER 投与群では，PBS 投与群に対して，血清中の *TNF- α* 濃度は歯周炎未誘導のレベルにまで低下した（ $p < 0.05$ ）。一方，*IL-6* 濃度は統計学的に有意差がなかったものの，低下傾向にあった。
5. TER の生体安全性の評価：TER 投与群では，PBS 投与群と比較して，明らかな体重の変化はなかった。肝臓および腎臓の HE 染色において，TER 投与群では，PBS 投与群と比較して，細胞形態や組織構造に明らかな異常はなかった。

【考察】

本研究の結果から，TER は絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて *IL-6* 産生への影響はほとんどなく，①歯槽骨吸収抑制作用，②破骨細胞の形成抑制作用，および③歯周組織と血清中における *TNF- α* の産生抑制作用を有することが明らかになった。

先行研究において，TER は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制することが報告されており，本研究において歯槽骨の吸収と破骨細胞数が抑制されたことは，TER が破骨細胞の分化を抑制し，歯槽骨の吸収を抑制した結果であることが示唆される。また，他の先行研究においては，*TNF- α* は好中球の活性化と破骨細胞の分化を促進することが報告されている。本研究で血清中の *TNF- α* の濃度低下と歯周組織中の *TNF- α* mRNA の発現抑制が観察されたことから，TER が血清中の *TNF- α* の濃度を低下させるとともに歯周組織中の *TNF- α* の産生を抑制させ，その結果，歯槽骨の吸収抑制と破骨細胞の形成抑制が生じたことも示唆される。

本研究では TER 投与群と PBS 投与群で体重変化に差は無く、TER の投与期間中に腎臓や肝臓の組織像に明らかな異常はなく、TER には副作用が少ないことが示唆された。しかし、TER の直接的な標的分子や代謝経路は未だ不明である。そのため、TER の標的分子を同定し、代謝経路を明らかにすることは今後の課題であり、また生体安全性に優れた新たな炎症性骨吸収治療薬としての TER の可能性をさらに高めるためにも必要であると考ええる。

【結論】

絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、TERによりTNF- α の産生が抑制された結果、破骨細胞の分化が抑制されると共に歯槽骨の吸収が抑制されたことが示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周炎が進行すると、炎症反応に伴い病的な歯槽骨の吸収が生じる。その機序として、細菌感染に伴い歯根膜線維芽細胞から産生されるインターロイキン6 (IL-6) がヘルパーT17細胞への分化を誘導し、歯周炎組織中に receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) が産生され、破骨細胞分化が促進されることで歯槽骨吸収を誘導することが報告されている。したがって、IL-6の作用を制御することができれば、歯周炎による組織破壊を制御することが可能になると考えられる。

申請者は、抗炎症作用を有することが報告される天然化合物の中から、真菌 *Aspergillus terreus* の二次代謝産物として分離された低分子化合物(+)-terrein (TER) に着眼した。*in vitro* の先行研究では、有機化学的に合成した TER は、IL-6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子やマクロファージコロニー刺激因子の産生抑制作用と、RANKL 誘導性破骨細胞分化の抑制作用を有することが報告されている。そのため、炎症性骨吸収疾患である歯周病においても、TER は骨吸収抑制作用を示すこと期待できる。しかし、TER の *in vivo* における作用とその機序は未だ不明である。

本研究では、TER の *in vivo* における炎症性骨吸収抑制効果を検討するため、絹糸結紮歯周炎マウスモデルを用い、骨吸収抑制効果、抗炎症効果、そして生体安全性を検討した。

- 1) マイクロCTを用いたTERの歯槽骨吸収抑制効果の解析：TER (30 mg/kg) 投与群では、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 投与群と比較して歯槽骨吸収を有意に抑制した ($p<0.05$)。
- 2) TERの抗炎症効果の組織学的検討：TER投与群では、PBS投与群と比較して、上皮下組織へのLy-6g陽性好中球の浸潤が抑制され、破骨細胞の発現数は有意に抑制された ($p<0.05$)。
- 3) TERが歯周組織中の炎症性骨吸収関連遺伝子の発現量に与える影響：TER投与群では、PBS投与群と比較して、*Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) mRNAの発現量が有意に減少した ($p<0.05$)。また、*IL-17A* mRNAの発現量は統計学的に有意差がなかったものの、減少傾向にあり、*Osteoprotegerin* mRNAの発現量は統計学的に有意差がなかったものの、増加傾向にあった。
- 4) TERが血清中の炎症性サイトカイン濃度に与える影響：TER投与群では、PBS投与群と比較して、TNF- α の濃度が歯周炎未誘導のレベルにまで低下した ($p<0.05$)。一方、IL-6濃度は統計学的に有意差がなかったものの、低下する傾向がみられた。
- 5) TERの生体安全性の検討：TER投与群では、PBS投与群と比較して、明らかな体重変化は無く、肝臓と腎臓の細胞形態や組織構造に明らかな異常はみられなかった。

以上のことから、絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおいて、TERによりTNF- α の産生が抑制された結果、破骨細胞の分化が抑制されると共に歯槽骨の吸収が抑制されたことが示唆された。本研究の結果は、炎症性骨吸収治療薬としてTERが使用できる可能性を示唆し、歯周病をはじめとする炎症性骨吸収疾患の治療の発展に寄与するものと考えられる。

よって本審査委員会は、本申請論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。