

氏名	黄野 頂策
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6816号
学位授与の日付	令和5年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	加齢が歯周病態、マクロファージのオートファジーと間葉系幹細胞に与える影響とそれらの関連
論文審査委員	山本 直史 教授 仲野 道代 教授 久保田 聡 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、加齢に伴う内在性間葉系幹細胞(MSCs)の機能変化が、老化関連疾患の形成や重症化に関与する可能性が示唆されるようになった。しかし、その詳細はほとんど明らかにされていない。

我々の研究グループでは、これまで、加齢に伴い中高年で、歯周炎に関連した歯周組織破壊の頻度が高いことに着目し、内在性 MSCs の機能低下と歯周組織破壊の関連性について検討してきた。すなわち、高齢マウス骨髄由来 MSCs では、細胞走化性、骨芽細胞分化能、Fas・Fas リガンドによる細胞死誘導能が著しく低下しており、炎症局所への MSCs の集積能の低下と免疫調節不全をもたらし、歯周組織破壊を進行させるという可能性が示唆されてきた。

一方で、細胞内消化システムの一つであるオートファジーは、全身性エリテマトーデスなどの炎症性自己免疫疾患でその活性が上がることで知られており、特に T 細胞やマクロファージ、破骨細胞におけるオートファジー活性の抑制が、新たな治療ターゲットとして研究が進められている。我々の研究グループでも実験的マウス歯周炎モデルにおいて、歯周組織でのオートファジーの活性化、ならびに、オートファジー抑制ペプチド投与による歯槽骨破壊の抑制を報告してきた(Akiyama et al. 2022)。しかし、宿主の加齢による歯周炎の重症化とオートファジー活性の関わりや、加齢による内在性 MSCs 機能の変化がこれらにどのように関連するかについては、いまだ推測の域を出ない。

そこで本研究では、加齢に伴う歯周炎の重症化、特に歯周組織破壊の進行に、オートファジー活性や内在性 MSCs 機能がどのように関わるかを明らかにするために、マクロファージと内在性 MSCs の炎症局所への集積状況を、若齢と高齢マウスを用いた実験的マウス歯周炎モデルを用いて組織学的に検討した。また、若齢と高齢の歯周炎モデルマウスから採取した顎骨由来マクロファージのオートファジー活性の差を検討し、マクロファージの実験的極性変化や MSCs との間接共培養が、マクロファージのオートファジー関連遺伝子の発現にどのように影響するかを *in vitro* にて検討した。

【方法】

既報(Aung et al., 2020)に従い、若齢と高齢のマウス(C57BL/6J, メス, 5 および 50 週齢)の下顎第一臼歯に 5-0 絹糸を結紮して実験的歯周炎モデルを作製し、非結紮群を対照群とした(各群 n=3~5)。実験群は、結紮 3, 7, 10, 14 日後に屠殺し、 μ CT 解析による骨組織破壊の評価、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ [TRAP]染色、マッソントリクローム染色にて組織形態学的解析を行った。また、1 型マクロファージ(M1)、2

型マクロファージ(M2), および, 内在性 MSCs の経時的な集積を, 蛍光免疫染色にて検出した. さらに, 各週齢マウスの下顎骨から単離した F4/80 陽性マクロファージのオートファジー関連遺伝子 (*Beclin1, Lc3, P62*) の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて評価するとともに, 5 週齢および 50 週齢の骨髄由来 MSCs と 5 週齢骨髄由来マクロファージを共培養し, MSCs がマクロファージのオートファジー関連遺伝子発現 (*Beclin1, Ulk1, Lc3, P62*) に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法にて比較・検討した. 各データの統計学的有意性は, 一元配置分散分析および Tukey の多重比較検定にて解析した.

【結果】

マイクロ CT 解析の結果, 5 週齢, 50 週齢の両群で, 結紮した下顎第一臼歯の歯根分岐部関心領域におけるエックス線不透過性領域の面積割合は, 結紮直後から結紮 14 日後にかけて減少傾向にあり, 7 日後および 10 日後では, 5 週齢と比較して, 50 週齢群でそれぞれ有意に低い結果であった. マッソントリクローム染色においても, マイクロ CT 解析結果と同様に, 下顎第一臼歯の歯根分岐部関心領域における歯槽骨組織は結紮後, 少しずつ吸収し, 残存した面積の割合は, 結紮 7 日後, 10 日後において, 5 週齢と比較して, 50 週齢群で, 有意に低いことが示された.

M1 マーカーである CD80 蛍光免疫染色では 5 週齢, 50 週齢の両群ともに, 誘導開始後 0 日目から 10 日目にかけて経時的に陽性細胞数が増加し, 10 日目にピークを迎え, 14 日目に減少した. 観察期間中, 全てのタイムポイントで, 50 週齢群における CD80 陽性細胞数が高い傾向にあり, 特に, 結紮 3, 7, 10 日後では 5 週齢群と比較して 50 週齢群で有意に高かった. 同様に, MSCs マーカーである PDGFR α 蛍光免疫染色においても, 5 週齢群では結紮直後から結紮 10 日後にかけて陽性細胞数が増加し, 10 日目でピークを迎えた. その一方で, 50 週齢群では, 陽性細胞数がわずかに増加しているものの, 3 日目以降で有意な増加は認められなかった. また, 観察期間中, 結紮 3, 7, 10 日後において, 5 週齢群と比較して 50 週齢群で有意に陽性細胞数が少なかった. TRAP 染色による破骨細胞の検出では, 5 週齢, 50 週齢の両群とも, 結紮直後から結紮 10 日後にかけて, 経時的に陽性細胞数が増加し, 結紮 14 日後では減少した. 観察期間中, 5 週齢群では, 50 週齢群と比較して, 陽性細胞数が低い傾向にあり, 結紮 7, 10 日後で有意に低かった. M2 マーカーである CD206 蛍光免疫染色では, 観察期間中, 全ての群間で有意な差は認められなかった.

歯周炎モデルの下顎骨由来 F4/80 マクロファージのオートファジー関連遺伝子 (*Beclin1, Lc3, P62*) の発現は, 両群ともに経時的に上昇することがわかり, これらの全ての遺伝子は, 7 日目では 50 週齢群が 5 週齢群と比較して有意に高く発現していた.

宿主の加齢が, マクロファージの極性変化におけるオートファジー活性にどのように影響するのかを検討するため, *in vitro* にて骨髄由来マクロファージ単体, もしくは MSCs との間接共培養を行ない, オートファジー関連遺伝子 (*Beclin1, Ulk1, Lc3, P62*) の発現を検討したところ, 5 週齢, 50 週齢群ともに, M0 から M1 に分化することでオートファジー関連遺伝子の発現が上昇する傾向が観察され, 50 週齢における発現は, 5 週齢と比較して有意に高い結果となった. 一方で, M0 から M2 への分化では, 5 週齢では発現に大きな変化は認められなかったものの, 50 週齢において *Ulk1, Lc3* 遺伝子発現が上昇し, 5 週齢と比較しても有意に高かった. さらに, マクロファージの極性変化に伴うオートファジー関連遺伝子の発現に, MSCs がどのように影響するのかを検討したところ, 5 週齢由来 MSCs と間接共培養した M1 群では, 共培養しなかった群と比較して, *Beclin1, P62* の遺伝子発現が有意に抑制されており, 50 週齢由来 MSCs と共培養した群では発現が抑制されることはなかった. また, いずれの週齢由来 MSCs と共培養した M2 群では, オートファジー関連遺伝子の発現に変化は認められなかった.

【考察】

本研究では, 若齢と高齢の実験的マウス歯周炎モデルを用いて, 加齢によるマクロファージや破骨細胞, 内在性

MSCs の炎症巣への集積状況を組織学的に検討し、また、マクロファージのオートファジー活性や内在性 MSCs 機能の変化が、歯周組織破壊進行にどう関連するのかについて検討した。その結果、若齢、高齢の両群ともに、経時的な歯根分岐部残存骨面積の減少が観察され、ほとんどの場合において高齢マウスで有意に残存骨面積が減少していた。M1, MSCs の集積は、残存骨面積の減少が少なかった若齢群において M1 の集積が少なく、反対に MSCs が多く集積する像が観察された。

歯周炎モデル由来マクロファージのオートファジーの変化についても、高齢のマウスでオートファジー関連遺伝子である (*Beclin1*, *Lc3*, *P62*) の発現が高く、実験的に骨髄由来マクロファージを M1 に極性変化させた場合においても、オートファジー関連遺伝子の発現が上昇したことから、高齢マウスでは、M1 の活性化による炎症性サイトカインの過剰産生が、細胞内消化システムであるオートファジー、特にオートファゴソームの形成を促進させるのではないかと考えられた。さらに興味深いことに、*in vitro* での高齢 MSCs との間接共培養では、M1 極性変化によるオートファジー関連遺伝子の発現を抑制することができなかったことから、MSCs 機能の低下は、M1 のオートファジー活性の抑制に失敗し、*in vivo* においても、加齢による内在性 MSCs の機能低下は、炎症局所でのマクロファージのオートファジーを十分に抑制できずに歯周組織破壊を促進する可能性が考えられた。

今後は、宿主の加齢に伴うオートファジー活性の上昇メカニズムや、内在性 MSCs 由来のどのような液性因子が、オートファジー関連遺伝子の発現を抑制し、歯周組織破壊を抑制するのか、更なる検討を行っていきたい。

論文審査結果の要旨

【緒言】本研究では、宿主の加齢に伴うマクロファージのオートファジー活性や間葉系幹細胞(MSCs)機能の変化が歯槽骨破壊の進行にどう関連するのかを解明することを目的とし、*in vivo*、*in vitro* の両方から検討した。

【方法】既報(Aungら、2020)に従い、5週齢と50週齢マウス(C57BL/6J、メス)の下顎第一臼歯に5-0絹糸を結紮し歯周炎モデルを作製した(各群n=3~5)。結紮後0、3、7、10、14日で屠殺し、マイクロCT、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色、マッソントリクローム染色にて組織形態学的に解析するとともに、M1型マクロファージ(M1)、M2型マクロファージ(M2)、MSCsの経時的分布を蛍光免疫染色にて検出した。また、各週齢マウス下顎骨から磁気ビーズにて抽出したF4/80陽性マクロファージのオートファジー(ATG)関連遺伝子(*Beclin1*、*Lc3*、*P62*)の発現をリアルタイムPCR法にて評価した。さらには、各週齢マウス大腿骨骨髓由来MSCsと骨髓由来マクロファージを間接共培養し、MSCsによるマクロファージのATG関連遺伝子発現への影響もリアルタイムPCR法で比較した。各データの統計学的有意性は、一元配置分散分析にて解析した。

【結果】マイクロCT解析およびマッソントリクローム染色の結果、各週齢で経時的に残存骨量が減少し、歯周炎誘導後7日目、10日目では50週齢で有意に低い結果であった。また、CD80陽性M1数は10日目まで経時的に増加し、50週齢で有意に多かった。PDGFR α 陽性MSCsは、5週齢では経時的に増加したが、50週齢群では有意な増加は認めず、5週齢と比較して有意に少なかった。TRAP陽性破骨細胞は、各週齢で経時的に増加し、7日目、10日目では5週齢で有意に少なかった。CD206陽性M2数は、観察期間を通じて有意な差は認められなかった。また、下顎骨由来マクロファージのATG関連遺伝子発現は、歯周炎誘導後7日目で5週齢と比較して50週齢で有意に上昇した。さらに、*in vitro*での骨髓由来マクロファージ単独もしくはMSCsとの間接共培養では、各週齢でM0からM1に分化することでATG関連遺伝子の発現が上昇し、50週齢では5週齢よりも有意に高かった。一方、M0からM2への分化では、5週齢では大きな変化は認められなかったが、50週齢において*Ulk1*、*Lc3*の発現が上昇した。さらに、5週齢由来MSCsと間接共培養したM1群では、共培養しなかった群よりも、*Beclin1*、*P62*の遺伝子発現が有意に抑制され、50週齢由来MSCsと共培養したM1群では*P62*及び*Ulk1*発現が増加した。M2ではいずれの週齢由来MSCsとの共培養においてもATG関連遺伝子発現に変化は認められなかった。

【考察】本研究では、急性の歯周炎症を惹起させるマウス結紮モデルを用いて、免疫系が未成熟である5週齢と中高齢である50週齢を比較したところ、加齢によって歯槽骨破壊が重症化することが分かった。そのメカニズムとして、5週齢ではM1の集積が少なくMSCsの集積が多かったことや、50週齢では逆にM1の集積が多くMSCsの集積が少なかった結果に加えて、下顎骨由来マクロファージのATG関連遺伝子の発現が50週齢で亢進していたことから、歯槽骨破壊にこれら細胞の関与が強く疑われた。さらに、*In vitro*での検討において、M1で発現が上昇していたATG関連遺伝子の発現が、5週齢由来MSCsとの共培養で減少し、50週由来MSCsではむしろ増強したことから、加齢に伴うMSCs機能の低下が、マクロファージのオートファジー活性を抑制できずに歯槽骨破壊進行を助長させる可能性が示唆された。本研究では、加齢に伴うマクロファージのオートファジー活性亢進と間葉系幹細胞機能の低下が歯周病を重症化させる可能性を示す新しい知見を得た。得られた成果は新規性に富んでおり、また、新規歯周病治療法の開発の基盤となることが期待される。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。