

氏名	高橋 弘太郎
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第 191 号
学位授与の日付	2015 年 2 月 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当(博士課程修了)
学位論文題目	実験的歯周炎の動脈硬化症への影響
指導教員	(主) 教授 吉成 伸夫 (副) 教授 小笠原 正 (副) 教授 宇田川 信之
論文審査委員	主査 教授 長谷川 博雅 副査 教授 藤井 健男 副査 准教授 中村 美どり

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的】

歯周病と動脈硬化症の関連を明らかにするため、マウスの歯周組織に局所的に投与された Interleukin-6 (IL-6) が、動脈硬化症にいかなる影響を及ぼすかを *in vivo* のモデル実験とヒト大動脈血管内皮細胞を用いた *in vitro* の実験で追及した研究である。

### 【材料と方法】

生後 8 週齢の雄アポリポプロテイン E 欠損マウス (ApoE<sup>-/-</sup>) を使用し、IL-6 (25ng/ $\mu$ l) 投与群と (PBS 群) の 2 群に分け、以下について検討した。投与部位は下顎臼歯の頬側歯肉部で、両群ともに最長 12 週間にわたり 10 $\mu$ l の IL-6 と PBS を隔日に投与した。投与は左右交互に実施した。

SAA は、IL-6 群投与開始後 1、2、3、4、5、6、20、21、41、42 (6 週)、62、63、83、84 (12 週) 日に ELISA 法で測定した。また IL-6 群と PBS 群投与開始後 6、12 週で大動脈と下顎骨を採取した (n=6/群)。摘出した大動脈内膜の脂肪沈着を Sudan IV 染色後に測定した。さらに大動脈基部の横断薄切切片を作製し、Sudan IV 染色と Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1) および Toll-like receptor 2 (TLR2) の免疫染色を行った。下顎骨は  $\mu$ CT で撮影し、IL-6/PBS 局所投与部位の歯槽骨吸収状態を測定した。

また、ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAECs) を培養後に SAA 刺激を行い、ICAM1、VCAM1、MCP1 の発現を real-time PCR 法で解析し、さらに、TLR2 抗体添加群も同様に検索した。

### 【結果】

IL-6 群の血清 SAA は、上昇や下降の変動をみたが、全実験期間を通じて投与開始前および PBS 群と比較して有意に上昇した。投与部周囲歯槽骨のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離は、IL-6 群が PBS 群と比較して一部 (6 週例の M1 遠心根、近心根) で有意に増加した。また、歯根中央部の頬側歯槽骨の厚さも一部 (12 週例の M1 近心根と M2 近心根) で IL-6 群が PBS 群よりも有意に減少した。一方、大動脈における動脈硬化病変部位率は、6 週で IL-6 群と PBS 群間に有意差はなかったが、12 週では IL-6 群で有意に増加した。免疫組織化学的には、大動脈基部で内膜の TLR2 の発現が PBS 群よりも IL-6 群では有意に上昇した。MCP1 の陽性面積も 6 週と 12 週で増加し、IL-6 群が PBS 群よりも有意に増加した。In vitro で、HAECs は SAA 刺激で ICAM1、VCAM1、MCP1 の発現が増加し、抗 TLR2 抗体の添加でこれらの発現が半分以下に減少した。

## 【結論】

以上の結果から、局所の軽度な慢性炎症性疾患である歯周病で産生される IL-6 が、肝臓を刺激して血中 SAA 濃度を上昇させ、SAA は血管内皮細胞の TLR2 に結合することで ICAM1、VCAM1、MCP1 の発現を上昇させ、動脈硬化症が増大させる可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

歯周病は、動脈硬化症 (AS) のリスク因子といわれているが、両者の関連はいまだ明らかとはいえない。今日、AS は我が国のみならず、西欧諸国においても死因の上位を占める脳血管疾患や心疾患の原因としてきわめて重要な因子であり、AS の予防は社会的に注目される課題である。この領域は、世界的な注目の的であり、最近 2 年間でも実に 100 編を超える両疾患に関する英語論文が出されている。

その中であって、本研究は局所の軽微な慢性炎症が AS に与える影響を検討するために IL-6 を歯肉に局所投与するという challenging な方法を検討した内容で、独創的である。IL-6 局所は増加を肉眼的にも病理組織学的にも、対照群と比較して有意な AS 病巣の増加を招き、同時に MCP 1 陽性部位の増加も有意であることから、局所の IL-6 増加が ApoE<sup>-/-</sup>マウス AS を促進することを明確に示した点は興味深い。また同時に、局所の IL-6 増加は SAA 上昇に続き、AS 病巣の TLR2 の発現も有意に増加させていることから明らかにした。さらに *in vitro* で SAA の刺激で MCP1 などの発現が亢進し、抗 TLR2 抗体の添加で SAA 刺激後の MCP1 などの上昇が抑制されたことから、局所で産生された IL-6 による SAA 産生、TLR2 結合、MCP1 などの亢進によって AS 病巣にマクロファージなどの遊走を招くことが論理的に示された研究で、意義深く、優れた研究であるといえる。

残念なことに IL-6 投与で歯肉にいかなる変化が生じたかを病理組織学的に証明できていないため、歯周病に相当する変化と AS の関係を直接的に論じることはできない。今後、この点を含め、他の経路についても明らかにされなければならない点が数多く残されており、今後の展開にも大いに可能な研究である。

## 最終試験の結果の要旨

学位論文の内容に関する質疑に加え、以下のような項目について口頭による試験を行った。

1. MCP1 染色標本で、なぜ面積率を比較したのか。
2. ヒト大動脈血管内皮細胞を用いた理由はなにか。
3. *In vivo* の再現が出来たと考えているか。
4. 評価部位として大動脈起始部を選択した理由はなにか。
5. 大動脈起始部で atheroma が発生しやすい理由はなにか。

以上の質問に対して概ね適切な回答が得られたことから、学位申請者は博士 (歯学) の課程修了者として十分な知識と学力を有していると判断し、最終試験を合格と判定した。