

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 奥村 剛
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 946 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Experimental arthritis and Porphyromonas gingivalis administration synergistically decrease bone regeneration in femoral cortical defects (コラーゲン誘発関節炎と歯周病菌 *P. gingivalis* 投与は相乗的に骨新生を減少させる)
論文審査委員 主査 教授 佐藤 昇
副査 准教授 木村 慎二
副査 講師 渡邊 慶

博士論文の要旨

【背景】歯周病は関節リウマチ(RA)に合併することが多く、RAの疾患活動性にも悪影響を及ぼす。動物モデルでも歯周病菌 *P. gingivalis* (*P. g*) の投与が全身性炎症とともに関節炎を増悪させることが示されている。また、リポ多糖(LPS)投与による全身性炎症は骨新生を減少させ(Behrends D. 2016)、RAモデルであるコラーゲン誘発性関節炎(CIA)マウスにおいても骨折治癒が遷延する(Hu Y. 2018)との報告と併せて、歯周病とRAの合併は骨折治癒遷延因子と予想される。関節炎と歯周病菌投与の合併は骨新生がより減少する、という仮説をマウスモデルで検証した。【方法】7週齢のDBA/1J雄マウスに5週間・計10回の *P. g* を経口投与し、11, 14週齢でコラーゲン誘発関節炎(CIA)を誘導し、16週齢で両側大腿骨骨幹部に皮質骨欠損を作成した。(1)対照(W)群、(2) *P. g* 投与単独(P)群、(3)CIA単独(C)群、(4)合併(PC)群の4群を設け、骨損傷後(P0)2, 3, 4週で評価した(n=6-8)。評価項目は μ CTによる骨新生量(骨欠損部における新生骨体積比;BVd/TVd%)、組織学的評価(新生骨面積あたりの破骨細胞数、新生骨表面のオステオカルシン免疫染色による活性化骨芽細胞面)、血清TNF α の値で、副次的項目として、 μ CTによる脛骨近位部の骨微細骨構造、骨塩量を測定した。統計手法はCIAと *P. g* 投与の2要因分散分析を、群間比較にはTukeyの多重比較を用いた。結果はW, P, C, PC群の順に平均±標準誤差で示し、有意水準は5%未満とした。【結果】骨新生量に関して、CIAは全期間でBVd/TVdを減少させた。*P. g* 投与はP02週のみ減少させたが以降は影響しなかった。合併による相互作用をP02, 4週で認め(いずれもP<0.001)、P04週では合併群で相乗的な骨新生減少を認め、群間比較でもPC群が最も低値であった(BVd/TVd; 83.7±2.6, 91.2±1.2, 65.0±3.3, 46.2±2.4%)。面積当たりの破骨細胞数はP03, 4週でCIAによって増加した(P03週; 2.8±0.7, 2.3±1.0, 13.8±1.1, 10.4±1.6mm⁻², P04週; 2.5±1.1, 0.9±0.4, 4.4±0.5, 3.3±0.8mm⁻²)。活性化骨芽細胞面はP02週でCIA, *P. g* 投与ともに減少した(60.5±4.6, 47.6±4.6, 45.6±9.4, 37.5±3.8%)。血清TNF α はP04週で相互作用を認め(P=0.005)、PC群が他群より高値であった(13.5±1.4, 13.0±1.8, 16.2±1.5, 24.9±3.7pg/ml)。

脛骨の骨微細骨構造については、骨量BV/TV(%)はP02週; 12.8±1.0, 11.3±0.94, 9.0±0.70, 9.2±0.57%

で、P04週では同 14.5 ± 1.27 , 10.8 ± 0.66 , 8.2 ± 0.46 , $6.4 \pm 0.42\%$ と変化した。P02週でCIAは多くの骨微細構造パラメーターを劣化させ・骨塩量を有意に減少させたが、P. g投与は影響しなかった。P04週ではCIA, P. g投与は共に多くの骨微細構造パラメーターを劣化させ・骨塩量を有意に減少させた。P04週における体積骨密度vBMDは 107 ± 9.2 , 64.7 ± 5.5 , 40.6 ± 2.5 , $30.7 \pm 1.6\text{mg/cm}^3$ であり、PC群が有意に低値であった。

【考察】本研究はCIAが骨新生を減少させ、CIAにP. g投与を合併すると修復後期の骨新生量がより減少する、ということを示した初の研究である。

本研究におけるP. g投与は純粋な歯周病モデルではなく、歯周病患者にみられる腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)モデルである。申請者らは過去にP. g投与がdysbiosisを誘導し、腸管免疫を変化させ、関節炎が増悪することや、高LPS血症をきたすことを示している。LPSには骨代謝回転を亢進させて破骨細胞を誘導する作用がある。

修復部の破骨細胞数の解析結果から、CIAにより骨修復部の骨吸収が亢進している可能性が示唆された。Ciucciらはdysbiosisモデルにおいて前炎症性サイトカインIL-17により、骨髄内にTNF α 産生性の“inflammatory osteoclast”が誘導され、過剰な炎症と骨破壊が生じることを報告しており、PC群が最も高値を示した血清TNF α と併せて、このinflammatory osteoclastにより骨修復部の過剰な骨吸収が生じたことが骨新生量の減少につながったと推察する。

活性化骨芽細胞面の解析ではCIA, P. g投与は共に初期の骨形成を低下させた。その原因としてCIAでは炎症性サイトカインの下流に骨形成抑制因子であるDKK-1が発現すること(Matzele MM. 2012), P. g投与ではP. g由来のLPSが骨細胞に作用し、骨形成抑制的なsclerostinの発現を促進すること(Kido J. 2019), により説明がつく。

骨微細構造について、CIAもP. g投与のどちらも骨質劣化・骨塩量を減少する作用を示した。相乗的な骨質劣化・骨塩量減少はなかったが、PC群は相加的にもっとも低い骨塩量を示していた。CIA, dysbiosisはどちらも、炎症性サイトカインの増加により、破骨細胞誘導が亢進し、骨質劣化につながることは多く報告されている。また、少ないながらも、臨床においても腸内細菌叢の変化と骨粗鬆症との関連が示唆されている(Wang Y. 2017)。さらにはdysbiosisに対する治療;prebiotics投与が骨量減少を妨げるとする報告もある(Britton RA. 2014)。

これらの知見を併せると、RA患者の骨折治療や骨粗鬆症予防に対して、RA疾患活動性の改善や腸内細菌叢に対するアプローチが有効な可能性があり、今後の研究課題である。

【結論】CIAは骨形成を減少、修復部の骨吸収を増加させ、P. g投与は初期の骨形成を減少させる。CIAとP. g投与の合併により骨修復後期にTNF α の増加とともに骨新生が相乗的に減少する。

審査結果の要旨

歯周病と関節リウマチ(RA)が合併することによる骨新生への影響を調べる目的で、歯周病菌(P. g)投与とRAモデルであるコラーゲン誘発性関節炎(CIA)の発症を組み合わせ骨新生への影響を検討した研究である。骨新生量は、CIAにおいては骨損傷後(P0)全期間で新生骨体積比(BVd/TVd)の減少が認められた。P. g投与はP02週のみBVd/TVdを減少させたが以降は影響がなかった。一方でP. g投与とCIAの合併群ではP02週から対象との有意差を認め、P04週では相乗的な骨新生減少が確認された。各群の比較では合併症群が最も低値であった。血清TNF α はP04週で合併群が他群より高値であった。面積当たりの破骨細胞数はP03, 4週でCIAによって増加した。脛骨の骨微細構造については、P02週でCIAは多くの骨微細構造パラメーターを劣化させ・骨塩量を有意に減少させた。P04週における体積骨密度は、合併群が最も低値であった。これらの結果は、CIAが骨形成を減少、修復部の骨吸収を増加させ、CIAとP. g投与の合併により骨

修復後期に $\text{TNF } \alpha$ の増加とともに骨新生が相乗的に減少することを示している。

以上、CIA が骨新生を減少させ、CIA に P. g 投与を合併すると修復後期の骨新生量がより減少する、ということを示した点に学位論文としての価値を認める。