

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	富田 尊志
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第295号
学位授与の日付	平成26年3月24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	Gene and protein localisation of tumour necrosis factor (TNF)- α converting enzyme in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth (薬物性歯肉増殖症歯肉組織における tumour necrosis factor (TNF)- α converting enzyme の遺伝子発現とタンパク質局在)
論文審査委員	主査 教授 吉江 弘正 副査 教授 朔 敬 副査 教授 織田 公光

博士論文の要旨

今回提出された博士論文の要旨については下記のとおりである。

【背景と目的】

TNF- α converting enzyme (TACE)はTNF- α の調節を通して炎症をコントロールすることが知られている。また、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-3により特異的に抑制されることが報告されている。薬物性歯肉増殖症(GO)はしばしば歯周炎(P)と複合して発症する炎症及び歯肉線維化を伴う疾患であるが本疾患におけるTACE、TIMP-3についてはまだ十分に研究がなされていない。本研究の目的はGO、Pの患者から採取した歯周組織中のTACE、TIMP-3 mRNA発現レベルとTACEタンパク局在を調べることである。

【材料と方法】

インフォームドコンセントが得られたGO、P各15名合計30名の患者より歯肉組織サンプルを採取した。quantitative reverse transcription real-time PCRによりTACE、TIMP-3 mRNA発現レベルを定量した。免疫組織化学的にTACEのタンパク局在を検索した。mRNA発現レベルはMann-Whitney U-testを用いて統計解析を行い、有意水準は5%とした。

【結果】

TACE mRNA levelsはPに比較して有意にGOで上昇していた($p=0.003$)。また、TIMP-3も同様にPに比較して有意にGOで上昇するという結果を示した($p=0.0401$)。TACE、TIMP-3 mRNA levelはGO($p=0.013$)、P($p=0.012$)どちらにおいても相関が認められた。TACEタンパク発現は主として単球、マクロファージ、形質細胞様細胞、また、上皮細胞の一部にて免疫陽性を認めた。CD68はGOよりPで発現が高い一方、TACEは逆にPに比較してGOで強い免疫陽性を認めた。

【考察】

TACEは歯肉組織においてマクロファージ、形質細胞が発現すること、歯肉増殖症組織においてTACE及びTIMP-3 mRNA発現が有意に高いこと、そしてその結果から、これらがカルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症の病態形成に役割を担っていることが考えられる。

【結論】

本研究は初めてマクロファージ、形質細胞がTACEを発現することを明らかにした。GOにおいてTACE及びTIMP-3 mRNA発現が有意に高いことからこれらがGOの病態形成に役割を担っていることが示唆された。

審査結果の要旨

歯肉増殖症はカルシウム拮抗薬、免疫抑制剤、抗てんかん薬といった薬剤の副作用で生じる歯肉の線維性増殖と炎症を伴う疾患であり、中でも、降圧剤であるカルシウム拮抗薬は歯周病を有病する年齢層と重なる高齢者が服用する割合が多く有病者が増えている。これまでカルシウム拮抗薬剤性の歯肉増殖症領域においては、*in vitro*においてカルシウム拮抗薬の歯肉線維芽細胞への影響、動物実験としてラットへのカルシウム拮抗薬投与実験などが行われてきた。更に、遺伝性歯肉線維腫症において SOS-1 遺伝子の変異が報告され、類似病態でより有病者の多い薬剤性歯肉増殖症との関連も推測されているがその病因については不明な点が多い。本研究では歯肉増殖症の主要な病態である結合組織代謝異常と炎症を調節するタンパク質である Matrix metalloproteinases (MMPs) の 1 種、TACE とその特異的インヒビターである TIMP-3 の遺伝子発現量及び歯肉組織内でのタンパク発現局在を慢性歯周炎患者とそれにカルシウム拮抗薬剤性の歯肉増殖症を伴うもので比較検討した初めての報告である。以上のことからして、本研究の目的は、極めて新規性が高く、独創性が多く認められる。

その結果、TACE 遺伝子発現レベルは慢性歯周炎 (P) に比較して有意に増殖性歯肉組織 (GO) で上昇していた ($p=0.003$)。また、TIMP-3 も同様に有意に増殖症組織で上昇するという結果を示した ($p=0.040$)。TACE、TIMP-3 mRNA level は GO ($p=0.013$)、P ($p=0.012$) どちらにおいても相関が認められたことは、その機能面から見てもリーズナブルな結果である。TACE タンパク発現は主として単球、マクロファージ、形質細胞様細胞、また、上皮細胞の一部にて免疫陽性を認めた。CD68 は GO より P で発現が高い一方、TACE は逆に P に比較して GO で強い免疫陽性を認めた。これらの所見は、当該分野で初めての報告で、美しい組織染色から見ても結果の信憑性、確実性の点において、高く評価したい。

これらの結果を導いた実験系をみると、本学倫理委員会にて承認された研究計画に則り、インフォームド consent が得られた慢性歯周炎患者 15 名、ならびに慢性歯周炎を併発するカルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症患者 15 名より、歯周治療上不要な炎症歯肉組織を採取し、トータル RNA を抽出後に逆転写反応を行い、TACE、TIMP-3 mRNA 領域を特異的な PCR プライマーを用いて増幅し、リアルタイム蛍光検出法にて発現量を定量した。各 2 群における例数も 15 名と事前のパワーアナリシスにより妥当性があり、統計処理も正統的な手法を選択している。また、遺伝子発現の、組織的機能的な検証として、免疫組織化学的手法を用いて、TACE のタンパク局在と発現細胞を特定した。RT-PCR により得られた遺伝子レベルの結果と、組織学的手法でタンパクレベルで検証したことは、最終結論として、薬剤性歯肉増殖症及び慢性歯周炎患者における TACE、TIMP-3 は両疾患ともにその病態形成に影響を与える可能性があるとし唆され、特に増殖症病変での機能亢進の可能性が示されると共に明確な結論となっている。実験結果からの最終結論に至る過程は、高い妥当性があり課題は見当たらない。今後、更に罹患局所である歯肉組織における TACE、TIMP-3 機能的検証が必要であり、今後の研究成果に期待したい。

本研究より、TACE は歯肉組織においてマクロファージ、形質細胞が発現すること、歯肉増殖症組織において TACE 及び TIMP-3 mRNA 発現が有意に高いこと、そしてその結果から、これらがカルシウム拮抗薬剤性歯肉増殖症の病態形成に役割を担っていることが示唆された。

本臨床研究デザインは妥当性、正統性のある実験系であり、測定方法の堅実性、結果から結論への展開の妥当性も認められた。これらの点において、きわめて新規性、話題性が高く、学位論文としての価値を十分に認めるものである。