

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 山田 ひとみ
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第321号
学位授与の日付 平成27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 Endoplasmic reticulum stress response and bone loss in experimental periodontitis in mice
(実験的歯周炎マウスにおける小胞体ストレスと骨吸収の関連)

論文審査委員 主査 教授 山崎 和久
副査 教授 吉江 弘正
副査 教授 織田 公光

博士論文の要旨

【目的】小胞体は、脂質およびタンパクの合成輸送の場であるとともに、タンパクの折り畳みや糖鎖付加によりその高次構造を形成する機能をもつ。低酸素、遺伝子変異、タンパク合成亢進などの細胞内外からの様々な刺激により、その機能に破綻が生じて小胞体内に高次構造の異常なタンパクが蓄積してしまうが、このような状態を小胞体ストレスといい、これに対する細胞の反応を小胞体ストレス応答という。小胞体ストレス応答は神経変性疾患、糖尿病など様々な疾患に関与する報告されており、近年炎症や骨代謝との関連が注目されている。我々はこれまでに歯周炎患者の歯肉組織において、小胞体ストレス関連遺伝子発現の有意な上昇を報告したが、そのメカニズムは不明である。本研究の目的は、歯周炎の病態形成における小胞体ストレス応答の役割を解明することである。

【材料と方法】6週齢雄の C57BL/6 マウスに *Porphyromonas.gingivalis* W83 株を3日毎に計10回口腔感染させた。感染後、歯槽骨吸収と破骨細胞数の測定および歯肉での小胞体ストレス関連分子、炎症性サイトカイン、破骨細胞関連遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。また小胞体ストレス抑制剤である 4-フェニル酪酸 (4-PBA) を投与する群で同様の検討を行った。

また *in vitro* において 4-PBA の破骨細胞分化に及ぼす影響をマウス骨髄細胞由来マクロファージを用いて、TRAP 染色および Real-time PCR 法にて解析した。

【結果と考察】*P. gingivalis* 口腔感染により歯肉における小胞体ストレス関連遺伝子が上昇していた。一方で 4-PBA 投与により同遺伝子発現が抑制されるとともに歯槽骨吸収が抑制されたが、炎症性サイトカイン発現において大きな差は認められなかった。さらに同群では破骨細胞関連遺伝子発現が有意に減少したことにより、小胞体ストレスは破骨細胞形成に直接的に関与している可能性が示唆された。また *in vitro* で 4-PBA の濃度依存的に RANKL 誘導性の破骨細胞形成が抑制された。さらに RANKL 添加時の小胞体ストレス関連遺伝子は有意に上昇し、4-PBA により有意に抑制された。*in vivo/vitro* において異なる種類の小胞体ストレス関連遺伝子が上昇したが、これらは *in vivo/vitro* における刺激方法や細胞の種類が異なるため、小胞体ストレス応答のシグナル経路が違った可能性が考えられる。

【結論】歯周炎において小胞体ストレスは破骨細胞分化を促進し、歯槽骨吸収を誘導する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

近年、小胞体ストレスとそれに対する小胞体ストレス応答のメカニズムが明らかとなり、慢性的な小胞体ストレスは糖尿病や動脈硬化疾患など様々な疾患の発展・進行に関連があると報告されている。また感染や炎症においては、様々なタンパクが合成されることから、小胞体ストレスが惹起されること、逆に小胞体ストレス応答を介して炎症を誘導することも知られている。申請者の所属する研究グループではこれまでに歯周炎患者の歯肉組織において、小胞体ストレス関連遺伝子発現の有意な上昇を報告したが、そのメカニズムは不明である。このことから申請者は、歯周病の病態形成に小胞体ストレスが関与するのではないかと仮説をたて、*P. gingivalis* 口腔感染マウスモデルを用いて検証を行った。本研究の結果では、感染により歯肉組織における小胞体ストレス関連遺伝子が上昇した。一方で、小胞体ストレス抑制剤である 4-PBA を投与し同様の感染を行った群では、同遺伝子発現が抑制されるとともに歯槽骨吸収が抑制された。さらに同群では破骨細胞関連遺伝子発現が有意に減少したことより、小胞体ストレスは破骨細胞形成に直接的に関与している可能性が明らかとなった。また *in vitro* で 4-PBA の添加が RANKL 誘導性の破骨細胞形成を抑制した。このことから小胞体ストレスが歯周炎において小胞体ストレスは破骨細胞分化を促進し、歯槽骨吸収に関連する可能性が示唆された。歯周炎の病態形成の解明のために、小胞体ストレスという新しい概念に着目したことが本研究の意義であり、将来的にこの研究が歯周組織破壊の予防や歯周治療への発展へ寄与することを期待している。

学位論文に関して主査、副査による下記内容に関する質疑応答を行った。

- ① 4-PBA の作用メカニズムについて。
- ② 20mM の 4-PBA をマウスに飲ませても食餌量などに影響はないのか。
- ③ 4-PBA は口腔内の細菌にも影響しているか。
- ④ 炎症が起きるとなぜ小胞体ストレスが起こるのか。炎症と小胞体ストレス応答は同じ経路なのか。
- ⑤ 染色像で破骨細胞数の変動はみられるが、歯肉で RANKL の遺伝子発現は変動していない理由は。
- ⑥ 小胞体ストレス関連ノックアウトマウスはあるのか。
- ⑦ ATF4 を調べた理由は。
- ⑧ GRP78 は 3 つの小胞体ストレスセンサー (IRE1、ATF6、PERK) の共通の分子シャペロンであるが、Pg 感染の歯肉における遺伝子発現で XBP1 だけが変化した理由は。
- ⑨ どの細胞で小胞体ストレス応答 (UPR) が働いているのか。
- ⑩ Pg はどういう経路で骨吸収を起こしているのか、また小胞体ストレスはどういう経路で作用しているのか。
- ⑪ *In vitro* の実験で Pg を入れなかった理由は。
- ⑫ 今後はどのような研究が必要だと思うか。

本研究は、歯周炎の病態メカニズムを小胞体ストレスという全く新しい観点から解析しており、学位論文として十分な価値を認める。論文内容に関する試問に対しても十分な回答を得ることができた。よって、博士 (歯学) の学位を授与するにふさわしいと判断した。