

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 根津 新  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第402号  
学位授与の日付 平成30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 **Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues**  
(歯周炎罹患歯肉組織におけるネプリライシンの発現)

論文審査委員 主査 教授 吉江 弘正  
副査 教授 山崎 和久  
副査 教授 田沼 順一

### 博士論文の要旨

【目的】アルツハイマー病(AD)と歯周炎は加齢や慢性炎症など共通した特徴があり、疫学的に関連があることが明らかとなっている。しかし、両疾患の病態についての生物学的な関連は未だ不明な点が多い。本研究の目的は、歯周炎罹患歯肉組織におけるアミロイド- $\beta$ 前駆タンパク(APP)とネプリライシン(NEP)の mRNA 発現レベル、およびタンパク質局在を調べ、歯周炎とADの共通の病態を明らかにすることである。

【材料と方法】本研究は新潟大学歯学部倫理審査委員会により承認され(27-R9-6-11)、全被験者より研究参加へのインフォームドコンセントを得た。重度慢性歯周炎患者または抜歯を必要とする患者から、歯周炎罹患歯肉組織または臨床的健常歯肉組織をそれぞれ18検体採取した。得られた歯肉組織より抽出した全RNAをcDNAに逆転写し、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)によりAPPおよびNEPのmRNA発現量を定量した。qRT-PCRのリファレンス遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)を使用した。また、APP、ヒト好中球エラスターゼ、CD68、NEPに対する一次抗体を用いて免疫組織化学(IHC)によりAPPとNEPのタンパク質局在を同定した。歯肉組織中のmRNA発現量の比較にはMann-Whitney U検定により、有意水準を0.05として統計解析を行った。

【結果と考察】APPとNEPの遺伝子発現はいずれも、健常歯肉組織と比較して歯周炎罹患歯肉組織で有意に高かった(それぞれ $p=0.0075$ 、 $0.0003$ )。IHCの結果、APPは粘膜固有層の毛細血管周囲の結合組織に浸潤した炎症細胞の細胞質に局在が認められ、これはCD68陽性細胞と同一であった。一方、NEPは上皮下に浸潤した好中球エラスターゼ陽性細胞と同様の分葉核を有する円形細胞、および細長い核を有する紡錘形細胞の細胞質に局在を認めた。以上より、APPはマクロファージに、NEPは好中球および線維芽細胞に局在することが明らかとなった。APPの局在が認められたマクロファージは炎症の急性期に組織に浸潤し、炎症性サイトカインの産生に関与し、免疫反応を調節する。NEPはサブスタンスPやブラジキニンの分解、IL-1 $\beta$ の不活性化などの機能を有していることを考慮すると、歯周炎罹患歯肉組織におけるNEP発現の亢進はこれらの因子を制御することにより急性期から慢性期を通じて炎症反応の防御的メディエーターとして作用している可能性がある。

【結論】健常歯肉組織と比較して、歯周炎罹患歯肉組織においてAPPとNEPの遺伝子発現は共に亢進した。歯周炎罹患歯肉組織においてマクロファージにAPPの発現が確認され、またNEPは主に好中球と線維芽細胞に発現することが初めて明らかとなった。

## 審査結果の要旨

アルツハイマー病 (AD) 患者と歯周炎患者は、加齢や慢性炎症など共通の特徴を有することがよくあるが、若齢期の口腔衛生と老齢期の AD との関連について調べた研究は極めて少ない。炎症はアテローム性動脈硬化症や心血管疾患において重要なプロセスであり、AD と歯周炎のいずれにおいても重要な役割を果たすと思われる。一方、つい最近、メタアナリシスを含むシステマティックレビューにより、歯周病の有無は AD の有無と疫学的に関連があり、重度歯周炎だけを評価すると関連はより著しい (OR 2.98, 95% CI 1.58- 5.62) ことが明らかとなった。したがって、歯周炎と AD には双方向性の関連の可能性が考えられるが、歯周病が認知症に先行する因子かどうかは明らかではない。さらに、歯周炎と AD の関係について有力な生物学的エビデンスはほとんどない。以上の背景から、本研究の目的である、APP とアミロイドの潜在的分解酵素であるネプリライシン (NEP) の mRNA 発現バランス、および APP と NEP のタンパク質局在を調べたことは妥当性があり、新規性が高い。

本研究結果から、APP と NEP の遺伝子発現は歯周炎と関連しており、炎症により増加する可能性が明らかとなった。APP と NEP の遺伝子が同時に亢進したことは、神経および線維芽細胞において APP 代謝産物である APP 細胞内ドメインの調節によって両遺伝子が増加することから、論理的にも妥当であると考えられる。また、IHC 解析により粘膜固有層に浸潤したマクロファージに APP の局在が認められ、我々の以前の報告に一致していたことは、本研究方法の信憑性・再現性の点で評価できる。さらに、歯周炎罹患歯肉組織の上皮下の好中球および線維芽細胞に NEP 発現が認められたことは、新規性が高い知見であり、評価に値する。NEP は主な炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  を分解するため、歯周炎罹患歯肉組織における NEP 発現の亢進は炎症の急性期から慢性期で、IL-1 $\beta$  やサブスタンス P、ブラジキニンをコントロールすることにより炎症の調節に寄与することは興味深く、今後の研究で直接的証明を期待したい。NEP と全身状態との関連については、歯周炎罹患歯肉組織における NEP の発現増加は血圧など全身状態に影響を与えている可能性がある。NEP 発現の亢進は歯肉組織において炎症反応の防御的メディエーターとして作用し、増加した NEP は血流に移行して通常のペプチド代謝を攪乱し、全身循環に病的な変化をもたらす可能性がある。このことは、歯周医学的にみて極めて重要な仮説であり、その影響力、貢献度は大きい。

本研究の結果を導いた研究方法では、歯周炎罹患歯肉組織群と臨床的健常歯肉組織群、それぞれ 18 検体を使用し、適切な割り振りもされており、対象数は必要な統計学的検定力を満たしていることは、結果の信憑性を裏付けるものである。RNA 抽出、cDNA 合成、qRT-PCR、免疫組織化学、統計解析ともに、正当的、堅実な手法であり、評価に値する。特に免疫組織化学の組織標本所見は、鮮明、明確で、細胞同定も十分に可能な結果となっており、形態学的に信頼性のある報告となっている。最終的には、APP と NEP の mRNA 発現レベルを定量化し、形態的にタンパク質局在を組み合わせ、実験結果から結論に至る過程には高い妥当性が認められる。今後の課題として、ヒトにおける AD と歯周炎の関連性の研究には制限があるが、AD と歯周炎患者の血清 NEP レベルの更なる比較解析が有用でかつ重要な点であり、さらなる研究成果を期待したい。

以上から、本研究では、目的・研究デザインにおいて妥当性・正当性があり、研究方法の堅実性、結果の新規性・信憑性、ならびに、結果から結論に至る妥当性も認められた。さらに、本研究結果は歯周医学の分野における新所見として貢献度が極めて高く、学位論文としての価値を十分に認めるものである。