

氏名	井手口 英隆
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5308号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	ゾレドロン酸が歯周炎に及ぼす影響
論文審査委員	森田 学 教授 鳥井 康 弘 教授 高柴正悟 教授

学位論文内容の要旨

緒言

日本は超高齢社会に突入し、悪性腫瘍や骨粗鬆症の罹患患者数は増加し続けている。近年、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、骨転移、あるいは骨粗鬆症に対する第一選択の治療薬としてビスフォスフォネート製剤 (BP) が多くの患者に投与されている。一方で、BP を投与された患者に対して抜歯等の侵襲的歯科処置を行った後に、顎骨壊死が発生するビスフォスフォネート関連性顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw : BRONJ) が 2003 年に報告された。以降、BRONJ に関する多くの論文が発表されているものの、その発生機序は未だ不明な点が多く、予防法や治療法が十分に確立されていない。

BP が生体に及ぼす影響としては破骨細胞の活性抑制、口腔内細菌感染の増加、血管新生の抑制と血管閉塞による骨内での血流低下、上皮細胞の増殖と遊走の抑制、免疫機能の低下などが報告されている。特に破骨細胞の活性抑制は、骨の代謝不全を招くと推測される。また、BRONJ が顎骨にのみ発症する一因として歯周病などの口腔内の感染に起因した炎症の波及が考えられる。しかし、歯周病と BRONJ 発症との関係を示す分子生物学的なメカニズムや、BP が歯周炎組織の骨代謝に及ぼす影響を調べた報告はない。よって、細菌感染に起因した歯周炎組織における炎症と骨代謝は、いずれも BRONJ の発症と関連があり歯周病患者における BRONJ 発症の病態解明と治療方法の確立には、*in vivo* 歯周炎モデルでの検討が必須であると考えた。

そこで、生体内でおこる様々な生体现象を、分子マーカーを選択することで外部から分子レベルで画像化し、様々な疾患の病態理解に応用することができる分子イメージング技術に着目した。分子イメージング解析による歯周炎組織の微細な炎症性変化の検出系は確立されていないが、この課題を解決することで、歯周組織の炎症と BRONJ 発症に関連する病態解析に応用できると考えた。

すなわち本研究は、歯周炎の状態を分子イメージング解析できるモデルを完成させ、それをを用いて歯周炎組織における BRONJ 発症の病態を明らかにすることを目的とした。そのため、第三世代の BP であるゾレドロン酸を投与した歯周炎モデルマウスの歯周組織において、炎症と骨新生に特異的な分子マーカーを標的とした分子イメージング解析を行い、さらに、病理組織学的な解析によって骨新生に関わる TGF- β シグナルへの影響を調べた。

材料と方法

1. 歯周炎モデルマウスの作製

野生型C57BL/6マウスの上顎左側第2大臼歯に絹糸を結紮し、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* を感染させて、歯周炎モデルマウスを作製した。さらに、グリチルリチン酸およびゾレドロン酸を投与した群を作製した。

2. 歯周炎モデルマウスに対するグリチルリチン酸の抗炎症効果の検討

歯周炎モデルマウスにおける、*P.gingivalis* に対する血清IgG抗体価、歯槽骨吸収像、歯槽骨体積、歯槽骨面積および破骨細胞の発現を調べた。解析方法は、enzyme-linked immunosorbent assay法、computed tomography (CT) 解析、病理組織学的解析を用いた。

3. 歯周炎モデルマウスに対する分子イメージング解析の有用性

歯周炎群とグリチルリチン酸投与群の歯周組織において、好中球に特異的なミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を分子マーカーとした分子イメージング解析を行った。

4. ゾレドロン酸が歯周炎組織に及ぼす影響

歯周炎群とゾレドロン酸投与群の歯周組織において、MPO活性と新生骨のハイドロキシアパタイトを分子マーカーとした分子イメージング解析を行い、炎症と骨新生の動態を調べた。さらに、歯周組織におけるTGF- β 1, Smad2, P-Smad2の発現を調べるために、蛍光免疫組織染色解析を行った。

結果

1. 歯周炎モデルマウスに対するグリチルリチン酸の抗炎症効果

グリチルリチン酸投与群では歯周炎群と比較して、*P.gingivalis* に対する血清IgG抗体価の上昇、歯槽骨面積の減少および破骨細胞の発現が抑制された。

2. 歯周炎モデルマウスに対する分子イメージング解析の有用性

MPO活性を分子マーカーとした分子イメージング解析では、歯周炎群とグリチルリチン酸投与群の歯周炎罹患部位に発光を検出した。さらに、グリチルリチン酸投与群では歯周炎群と比較して発光強度が低下した。

3. ゾレドロン酸が歯周炎組織に及ぼす影響

ゾレドロン酸投与群では歯周炎群と比較して、MPO活性を分子マーカーとした分子イメージング解析で歯周炎罹患部位における発光強度が低下した。さらに、新生骨のハイドロキシアパタイトを分子マーカーとした分子イメージング解析で歯周組織全体における発光強度が増加した。また、歯周炎群の歯周組織においてTGF- β 1, Smad2, P-Smad2の発現は検出されなかったが、ゾレドロン酸投与群の歯周組織ではTGF- β 1, Smad2, P-Smad2の発現が検出された。

考察

歯周炎モデルマウスにおけるMPO活性を分子マーカーとした分子イメージング解析によって、歯周炎組織の微細な炎症性変化の検出系を確立することができた。

さらに歯周炎モデルマウスに対する分子イメージング解析によって、歯周病患者に対するゾレドロン酸の投与は、歯周炎組織における好中球のMPO活性を抑制することで炎症反応を抑制し、さらに歯槽骨の新生を亢進していることが分かった。また、骨の新生にはTGF- β 1シグナル系の活性を介して行われている可能性がある。

今後は、本研究で完成した歯周組織に対する分子イメージング解析のモデルを用いて、BRONJ発症の予防法として歯周治療が有効であることを確認することができると考えられる。

結論

ゾレドロン酸は細菌感染に起因した歯周炎組織において炎症反応を抑制し、歯槽骨の新生を亢進する。また、ゾレドロン酸による歯槽骨新生の亢進にはTGF- β シグナルが関与している可能性がある。

論文審査結果の要旨

骨粗鬆症やがんの治療の一環としてビスフォスフォネート製剤 (BP) を投与した患者に対して抜歯等の侵襲的歯科処置を行った後に、顎骨壊死が発生するビスフォスフォネート関連性顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw : BRONJ) が 2003 年に報告された。しかし、BRONJ の発生机序には未だ不明な点が多く、予防法や治療法が十分に確立されていない。BRONJ が顎骨にのみ発症する一因として歯周病などの口腔内の感染に起因した炎症の波及と、骨新生に関わるカップリング因子である transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルへの BP の関与が考えられるが、歯周病と BRONJ 発症との関係を示す分子生物学的なメカニズムや、BP が歯周炎の骨代謝に及ぼす影響を調べた報告はない。よって、歯周病患者における BRONJ 発症の病態解明と治療方法の確立には *in vivo* 歯周炎モデルでの検討が必須であると考えた。

そこでまず、分子マーカーを用いて生体内で起こる生体現象を画像化することで、疾患の病態理解に応用可能な分子イメージング技術に着目し、歯周組織の炎症解析に対して分子イメージングが有効であるかを調べた。そして、BP 製剤であるゾレドロン酸を投与した歯周炎モデルマウスの歯周組織において、炎症と骨新生に特異的な分子マーカーを標的とした分子イメージング解析を行い、さらに、病理組織学的な解析によって骨新生に関わる TGF- β シグナルへの影響を調べた。研究結果は、以下の内容であった。

1) 歯周炎モデルマウスに対するグリチルリチン酸の抗炎症効果

抗炎症剤であるグリチルリチン酸投与群では歯周炎群と比較して、*Porphyromonas gingivalis* に対する血清 IgG 抗体価の上昇、破骨細胞の発現および歯槽骨吸収が抑制された。

2) 歯周炎モデルマウスに対する分子イメージング解析の有用性

ミエロペルオキシターゼ (MPO) 活性を分子マーカーとした分子イメージング解析では、歯周炎群とグリチルリチン酸投与群の歯周炎罹患部位に発光を検出した。さらに、グリチルリチン酸投与群では歯周炎群と比較して発光強度が低下した。

3) ゾレドロン酸が歯周炎に及ぼす影響

ゾレドロン酸投与群では歯周炎群と比較して、MPO 活性を分子マーカーとした分子イメージング解析で歯周炎罹患部位における発光強度が低下した。さらに、新生骨のハイドロキシアパタイトを分子マーカーとした分子イメージング解析で歯周組織全体における発光強度が増加した。また、歯周炎群の歯周組織において TGF- β 1, Smad2, P-Smad2 の発現は検出されなかったが、ゾレドロン酸投与群の歯周組織では TGF- β 1, Smad2, P-Smad2 の発現が検出された。

以上のことから、歯周組織を分子イメージング解析することで、歯周炎による炎症を可視化、定量化することが可能である。また、ゾレドロン酸は細菌感染に起因した歯周組織において炎症反応を抑制し、歯槽骨の新生を亢進する。そして、ゾレドロン酸による歯槽骨新生の亢進には TGF- β シグナルが関与している可能性がある。本研究で得られた結果は、BRONJ の病態解明と治療方法の確立の一助となり、今後の歯科医療の発展に貢献するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認めた。