


# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	丹羽 崇之		
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授	澁谷 俊昭	
	(副 査) 朝日大学歯学部教授	明坂 年隆	
	(副 査) 朝日大学歯学部教授	柏俣 正典	
論文題目			
歯周病で産生される細胞走化性因子の破骨細胞に及ぼす影響			
論文内容の要旨			
<p><b>[目的]</b></p> <p>歯周病は、骨吸収を伴う局所慢性炎症性疾患である。破骨細胞は生体内で唯一骨吸収能を持ち歯周病における骨吸収の中心的役割を果たす。破骨細胞の機能の解明は分化、融合、骨吸収能に関する領域で検討が進んでおり、また近年、炎症性細胞、骨芽細胞、破骨細胞が放出する細胞走化性因子、及び補体系の活動が歯周病の進行に深くかかわっていることを示唆する報告が数多くなされている。しかし、それら細胞走化性因子、補体と破骨細胞に関する研究は分化融合、骨吸収能に対する評価が主であり、走化性に関する研究はボイデンチャンバー法に代表される膜透過性試験での評価を除き十分には解明されていない。しかし、膜透過性試験による走化性の評価は走化した細胞の割合のみを評価するものであり、種々の問題がある。本研究の目的は歯周病変に産生される細胞走化性因子、及びそのインヒビターが破骨細胞に与える影響を、EZ-TAXIScan™並びに象牙切片吸収窩形成試験によって測定し検討することである。</p> <p><b>[材料及び方法]</b></p> <p>(1) EZ-TAXIScan™による細胞走化性試験</p> <p>SD Rat 骨髄由来細胞を UpCell(φ40mm)上に <math>1 \times 10^6</math> cells/well の細胞濃度で播種した。培地は 10%FBS, RANKL, M-CSF, ペニシリン-ストレプトマイシン含有 <math>\alpha</math>-MEM 培地を使用した。3 日間又は 6 日間培養した後、培地を 0.1%BSA 含有 RPMI1640 培地に交換し、細胞濃度を <math>2 \times 10^6</math> cells/ml に調整して回収した。I 型コラーゲンコーティングカバースリップをセットした EZ-TAXIScan™ に細胞浮遊液を <math>1 \mu</math>l ずつ各ウェルに注入し 1 時間静置した。3 days 培養群ではテラス深さ <math>6 \mu</math>m, 6 days 培養群ではテラス深さ <math>8 \mu</math>m のチップを使用した。走化性因子は MCP-1, MIP-1<math>\alpha</math>, RANTES, SDF-1<math>\alpha</math>, C5a をそれぞれ <math>1 \mu</math>M から 1nM(C5a のみ <math>10 \mu</math>M も使用)までの濃度で使用し、各実験ごとに 1 チャンネルはネガティブコントロール(NC)として走化性因子を注入せず遊走性を観察した。走化性因子を注入したのち直ちに 2 時間細胞の走化性反応を撮影した。撮影した映像は ImageJ に取り込み、走化性速度、直進性、走化性を示す細胞の割合を定量的に算出し比較検討した。</p>			

## (2) C5a Inhibitory Sequence(H-8135)による C5a 阻害試験

EZ-TAXIScan™ に注入した破骨細胞に H-8135 1 μ M から 1nM までの濃度をそれぞれ注入し 1 時間プレインキュベートした。また H-8135 を溶解させるのに使用した TFA の影響を調べるために 0.0001%TFA 添加による走化性試験も行った。その後 3 day 培養群では C5a 1 μ M, 6 days 培養群では C5a 100nM で走化性試験を行った。

## (3) 象牙切片 Pit Formation Assay

φ 6mm の象牙切片を 96 ウェルプレートにセットし, SD Rat 骨髄由来細胞を  $6 \times 10^5$  cells/ml に調整し 100 μ l/well ずつ各ウェルに細胞浮遊液を注入した。24 時間培養後培地を C5a 100nM, H-8135 1 μ M から 1nM 添加培地と交換し 14 日間培養した。培養終了後象牙切片を回収しマイヤーのヘマトキシリン液で染色し象牙切片上の吸収窩の面積を測定した。また(2)と同様に 0.0001%TFA 添加による試験も行った。

## [結果]

### (1) EZ-TAXIScan による細胞走化性試験

- 各細胞走化性因子は濃度依存的に破骨細胞の走化性反応を惹起させた。
- C5a は他の細胞走化性因子と比較して 3 days 培養群, 6days 培養群共に走化速度, 直進性, 走化性細胞の割合の点において有意に強力に走化性反応を惹起した。

### (2) C5a Inhibitory Sequence(H-8135)による C5a 阻害試験

- 3 days 培養群では H-8135 1 μ M が C5a 1 μ M, H-8135 1nM, C5a + TFA と比較して有意に低い走化速度を示した。また, H-8135 100nM, 10nM と比較して有意に低い直進性を示した。
- 6 days 培養群では H-8135 1 μ M が C5a 100nM, H-8135 1nM, C5a + TFA と比較して有意に低い走化速度を示した。

### (3) 象牙切片 Pit Formation Assay では H-8135 1 μ M が C5a 100nM, C5a + TFA と比較して有意に低い値を示した。

## [考察]

*P. gingivaris* は Arg 特異的プロテアーゼである gingipain を産生し C5a を新生させることが報告されている。6 days 培養群では 100nM での走化速度が最も高かったが, C5a 10nM~100nM の存在は好中球の免疫活性を阻害することが報告されている。以上の事から C5a は *P. gingivaris* によって歯周病変組織で増加し免疫応答の抑制, 破骨細胞の走化性の亢進を通じて歯周病の進行に非常に重要な役割を果たすと考えられる。

また H-8135 は C5a の活性を有意に阻害することからアンタゴニスト歯周病治療薬として有効な選択肢の一つとなる可能性が示唆された。

## [結論]

平均走化速度, 直進性, 走化性を示す細胞の割合のいずれにおいても 3 days 培養群, 6 days 培養群共に C5a が最も強力に破骨細胞の走化性を惹起させた。また, C5a 阻害作用のある C5a Inhibitory Sequence を作用させることで濃度依存的に破骨細胞の走化性, 骨吸収能を抑制した。以上の結果から歯周病における歯槽骨の吸収において C5a が非常に重要な役割を果たすこと, 及び C5a 阻害薬が歯周病による骨吸収阻害剤として有効である可能性を持っていることが示唆された。