

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	近藤 駿
論文審査 委員氏名	主査	三谷 章雄	
	副査	成瀬 桂子	
	副査	前田 初彦	
論文題名	歯周炎において誘導される ANGPTL4 は MMP13 の発現を増加させる		

インターネットの利用による公表用

歯周炎は、口腔内における主要な慢性炎症性疾患である。近年慢性炎症においてアンジオポエチン様タンパク質 (ANGPTL) が発現していることが注目されている。7種類存在する ANGPTL ファミリーの1つである ANGPTL4 は、慢性または急性の炎症で産生されることが分かっている一方で、歯周炎における ANGPTL4 の関わりは明らかではない。今回、歯周炎における ANGPTL4 の新規作用を明らかにするため、歯周炎における炎症が ANGPTL4 の発現を上昇させるかどうか、また ANGPTL4 が何らかの形で炎症反応を制御するかどうかを検討した。

実験動物には5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。上顎両側第二臼歯の歯頸部に縫合用ナイロン糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起させ歯周炎群 (n=8) とした。また、無処置のラットを対照群 (n=8) とした。実験的歯周炎を惹起し14日後に屠殺した後、両側上顎を採取し、病理組織学的解析および Micro CT による歯槽骨の形態学的解析を行った。また遺伝子解析用に第二臼歯周囲の歯肉を採取し解析した。上顎第二臼歯部組織切片はヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色および抗 ANGPTL4 抗体と抗 MMP13 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、炎症性細胞浸潤の確認、ANGPTL4、MMP13 発現の評価を行った。次に、ヒト歯肉線維芽細胞 (hGF) を用い、100 ng/ml の濃度の *P. gingivalis* LPS または 100、250、500 ng/ml 濃度のヒト組換えタンパク質 ANGPTL4 で刺激を行い、Real-time PCR 法にて、ANGPTLs、ANGPTL4 と *P. gingivalis* LPS 認識に関与するレセプター、炎症

性サイトカイン、MMPs の遺伝子発現を検討し、ウェスタンブロット法により ANGPTL4 タンパク発現解析を行った。最後に hGF に対し、ANGPTL4 siRNA の形質導入を行った。24 時間の形質導入後に、*P. gingivalis* LPS 刺激し、遺伝子発現変動、および抗 MMP13 抗体を用いたタンパク発現変化を検討した。統計学的解析は、2 群間比較の場合は t-test、多重比較の場合は、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用いて行い、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とし表記した。

動物実験において、歯周炎群では、対照群と比較して歯槽骨吸収が有意に増加し、歯肉組織への炎症性細胞の浸潤を認めた。ラット歯周組織における ANGPTL4 タンパク発現量は、歯周炎群において対照群と比較し有意な増加を認め、歯肉における ANGPTL4 の遺伝子発現に関しても、歯周炎群は対照群に比べて有意な増加を認めた。hGF に対し、*P. gingivalis* LPS で刺激した場合、刺激群は対照群と比較し、ANGPTL4、iNOS、TNF- α の遺伝子発現を有意に増加させたが、他の ANGPTL 遺伝子発現、ANGPTL4 の受容体とされる ITG1、ITG5 と LPS 認識に関与する受容体である TLR2、TLR4 の遺伝子発現には影響を与えなかった。ANGPTL4 のタンパク発現は、*P. gingivalis* LPS 刺激により対照群と比較し、有意に増加していた。hGF における MMP 発現における ANGPTL4 の作用を検討する目的で、hGF に対しヒトリコンビナント ANGPTL4 で刺激したところ、MMP13 の遺伝子発現を有意に増加させた。ラット歯周組織において、歯周炎を惹起させた歯肉では MMP13 の遺伝子発

現、タンパク発現は、対照群と比較し、歯周炎群で有意に増加していた。さらに *P. gingivalis* LPS は hGF における MMP13 のタンパク発現、遺伝子発現を増加させるが、この増加は siRNA を用いた ANGPTL4 のノックダウンにより抑制されることが確認された。

本研究において実験的歯周炎により歯周組織での ANGPTL4 発現が増加した。また、*P. gingivalis* LPS 刺激は hGF おける ANGPTL4 の発現を増加させ、ANGPTL4 を介して MMP13 の発現を亢進させた。この結果は歯周炎において ANGPTL4 が、組織破壊を促進する MMP13 の発現を亢進する極めて重要な役割を担っている可能性を示唆している。以上の結果から、ANGPTL4 は歯周炎を評価するマーカーとして、また歯周炎の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

以上より、本研究は歯科保存学、歯科病態内科学、口腔病理学をはじめとする関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。