



|              |                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 炎症関連因子mRNA発現プロファイルのクラスタ分析による歯周炎病態解析                                             |
| Author(s)    | 野崎, 剛徳                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                                                                |
| Version Type | VoR                                                                             |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3172721">https://doi.org/10.11501/3172721</a> |
| rights       |                                                                                 |
| Note         |                                                                                 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                 |
|---------------|-------------------------------------------------|
| 氏 名           | 野 崎 剛 徳                                         |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (歯 学)                                       |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 5 5 8 6 号                                   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 12 年 4 月 3 日                                |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                |
| 学 位 論 文 名     | 炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルのクラスタ分析による歯周炎病態解析           |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 岡 田 宏                               |
|               | (副査)<br>教 授 上 崎 善 規    助教授 石 田 武    講 師 岩 本 資 己 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

歯周炎による組織破壊には、歯周病原性細菌のビルレンスに加えて宿主の生体応答が関与している。それゆえ歯周炎の診断に際しては、歯肉縁下プラーク細菌の評価とともに歯周組織で惹起される生体応答の正確な評価が必要である。そこで本研究では、歯周炎病巣局所における生体応答の客観的解析を目的として、初診時の病巣局所における複数の炎症関連因子 mRNA 発現の同時検出法の開発を行い、得られた mRNA 発現プロファイルをクラスタ分析することにより歯周病の病態解析を試みた。

まず、歯周炎病巣局所より微量（約100mg）の歯肉組織採取を可能とする穿刺採取法を確立した。また、得られた組織検体より RT-PCR とサザンブロッティングを用いて、複数の炎症関連因子（IL-1 $\alpha$ , 6, 8, 10, 15, TNF $\alpha$  MCP-1, IFN $\gamma$ , Cox-1, 2）の mRNA 発現を半定量的に検出する系を確立した。これにより歯周治療の任意の時期に20種類以上の炎症関連因子 mRNA 発現を同時に、かつ半定量的に検出することが可能となった。この系を用いて成人性歯周炎（AP）ならびに早期発症型歯周炎（EOP）患者を対象として、初診時ならびに再評価時の臨床診査の後に組織検体を得て、炎症関連因子 mRNA 発現の検出を行い、各種炎症関連因子 mRNA 発現と臨床所見の関連性を検討した。また、各種炎症関連因子 mRNA 発現の検出結果を基に Ward 法によるクラスタ分析を行って炎症関連因子 mRNA 発現プロファイルを解析した。さらに、各クラスタの臨床所見ならびに臨床診断の特徴に関して検討を行った。その結果、概ねすべての炎症関連因子 mRNA 発現量が歯肉炎指数（GI）と正の相関を示すこと、初診時の歯周病罹患部位で高い発現を示す炎症関連因子 mRNA が、初期治療終了後には健常部位とほぼ同等のレベルまで低下することが明らかとなった。また、炎症関連因子 mRNA の発現プロファイル解析の結果、全被験部位が5つのクラスタに分類されることが示された。この各クラスタの mRNA 発現の特徴として、クラスタ A ではすべての炎症関連因子の強い発現が、クラスタ B では IFN $\gamma$  ならびに IL-6 の相対的低発現と他の各因子の強い発現が、クラスタ C では IFN $\gamma$  の相対的低発現と他の各因子の中等度の発現が、クラスタ D では IL-8 の相対的低発現と他の各因子の中等度の発現が、クラスタ E ではすべての因子の低い発現が認められた。この各クラスタと臨床パラメータの関係を見ると、クラスタ A には AP で GI が大きな値を示す部位が、クラスタ B には EOP で GI が大きい部位が多く含まれた。クラスタ C、D には GI が中等度の部位が多く含まれ、特にクラスタ C で EOP の割合が高かった。またクラスタ E に臨床的健常部位のほとんどが分類された。

次に、上記の IFN $\gamma$ 、IL-8 mRNA の低発現性と、代表的歯周病原性細菌である *P.gingivalis* (*P.g.*)、

*A.actinomycetemcomitans* (A.a.) の存在の関連性を検討するとともに、これらの細菌に対する宿主細胞の応答性を検討した。まず、ペーパーポイント法にて採取した歯肉縁下プラークを検体として、PCR を用いて *P.g.*、*A.a.* を半定量的に検出する系を確立した。これにより、従来の間接蛍光抗体法に比して1000倍以上高感度に、かつ高い特異性で同細菌を検出することが可能となった。同法を用いて、組織採取と同時に採取した歯肉縁下プラーク中の *P.g.*、*A.a.* の検出を行った結果、各クラスタ間で *P.g.*、*A.a.* の検出率に著明な差は認められなかった。また、上記患者の末梢血より単核球 (PBMC) ならびに好中球 (PMN) を分取し、これに終濃度1mg/ml の *P.g.*381 株超音波破碎画分 (*P.g.*SE) もしくは *A.a.* Y4 株超音波破碎画分 (*A.a.*SE) を添加して4時間培養後の IL-8 ならびに IFN  $\gamma$  の mRNA 発現を RT-PCR により検出した。その結果、いずれの細胞においても健常人と同程度の IL-8、IFN  $\gamma$  mRNA 発現上昇が認められた。

これらの研究の結果、歯周炎病巣局所より微量の歯肉組織検体を得て複数の炎症関連因子 mRNA 発現を検出し、その発現プロファイルを解析することが可能となった。さらに、クラスタ分析により、各歯周炎罹患部位が5つのクラスタに分類されることが示された。この mRNA 発現プロファイルは一個人においても各部位で異なっており、歯周炎の病態が部位単位で異なることが示唆された。このような mRNA 発現プロファイルの差異を生むメカニズムの詳細は不明であるが、本研究で確立された炎症歯周組織における mRNA 発現プロファイル解析法は、今後の歯周病の病態を分子レベルで解明する手掛かりを与えるものであり、今後の疾病活動度等の研究において有用な検査法として期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は歯周炎病巣局所における多様な炎症関連因子の発現を mRNA レベルで詳細に検討することにより、歯周炎の病態解析を行ったものである。その結果、クラスタ分析を用いた炎症関連因子 mRNA 発現プロファイル解析によって、臨床的に鑑別の困難な歯周炎が、主として IL-8 ならびに IFN  $\gamma$  と、その他の炎症関連因子の mRNA 発現バランスの特徴から5つのクラスタに分類されることが示された。この研究は歯周炎の病態解析のみならず、臨床的な病態診断においても極めて有益であり、博士 (歯学) の学位請求に十分値するものと認める。