The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた歯周病の分子病態解析
Author(s)	津島, 賢一朗
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61648
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　津島　賢一朗　）	
論文題名	Loeys-Dietz症候群モデルマウスを用いた歯周病の分子病態解析

論文内容の要旨

【研究目的】

歯周病は環境因子と遺伝的因子の影響を受けて進行する疾患であり、大きく慢性歯周炎と侵襲性歯周炎とに分けられる。慢性歯周炎と比較して、侵襲性歯周炎は遺伝的因子により大きな影響を受けると言われているが、その詳細については明確になっていない。

遺伝性疾患であるマルファン症候群（MFS）における歯周炎の罹患状況に関する実態調査により、両者に関連性があるという結果が示された。MFSは、細胞外基質*Fibrillin-1*の異常により発症する遺伝性疾患であり、主な臨床症状として、高身長、痩せた体格、細くて長い指（クモ状指）などの身体的な特徴および大動脈瘤や大動脈解離などの心臓血管系の症状が挙げられる。*Fibrillin-1*はTGF-βの作用を制御しており、*Fibrillin-1*に異常が起こることで、TGF-βの遊離が増加し、その結果Smadシグナルが促進されることで発症すると言われている。さらに、TGF-βシグナルの異常によりおこるMFS類縁疾患もいくつか報告されている。その一つであるロイスディーツ症候群（LDS）は、TGF-β受容体Ⅰ型（*TGFBR1*）もしくはⅡ型（*TGFBR2*）遺伝子の変異によって発症する遺伝性疾患であり、MFSと共通の所見を伴うが、LDSにおける大動脈瘤、大動脈解離はMFSに比べ早期かつ重度に発症すると言われている。そこで我々は、MFSと歯周炎との関連性に着目し、TGF-βシグナルの異常が歯周病の進行に与える影響について検討することを目的として、以下の研究を行った。

【材料および方法】

①　MFSおよび類縁疾患における歯周病実態調査

国立循環器病研究センターとの共同研究により、同病院に歯周病外来を開設し、MFSおよびその類縁疾患患者の歯周組織検査、パノラマX線撮影を行った。上顎右側大臼歯、上顎右側中切歯、上顎左側大臼歯、下顎左側大臼歯、下顎左側中切歯、下顎右側大臼歯の6群において、ポケット深さ（PD）4㎜以上を有する者の割合を、厚生労働省の平成23年歯科疾患実態調査の結果を対照群として比較した。

②　LDS患者のゲノム遺伝変異の解析とLDSモデルマウスの作製

実態調査で見出したLDS患者の遺伝変異をゲノムシークエンス解析した。マウスにおける同変異を再現するため、Tgfbr1遺伝子の第３エクソン563番目のGをTに変換したノックインベクターを構築し、通法によりLDS患者の遺伝変異を再現したノックイン（KI）マウスを樹立した。マウスの遺伝子型解析はゲノムPCR法にて行った。

③　LDSモデルマウスの病態解析

KIヘテロマウス同士の交配から得た胎仔、新生仔の遺伝子型解析を行い、それぞれの個体数を調べた。さらに、WTおよびKIマウスの180日間の生存率をカプランマイヤーの生存曲線で示した。6週齢と24週齢雄のWTおよびKIマウスの大動脈を採取し、組織切片を作製後、Elastica van Gieson染色を行い、弾性線維を観察した。

④　*Tgfbr1*^{G188V}変異による反応性変化の解析

Tgfbr1^{WT}、*Tgfbr1*^{G188V}の強発現ベクターを作製し、それぞれを同量のSMAD反応性のルシフェラーゼレポーターと共にヒト腎臓細胞株293細胞にトランスフェクションすることで強発現させた。トランスフェクション後、無血清培地にてstarvation後、TGF-βにて刺激し、8時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

KIヘテロマウス同士の交配から得た胎生14.5日の胎仔からマウス胎仔線維芽細胞（MEFs）をTripsin-EDTA処理により単離し、10% FBS含有D-MEM培地にて培養を行い、継代数3～5を実験に用いた。MEFsを無血清培地にてstarvation後、TGF-βにて刺激し、全RNAおよびタンパクを抽出後、TGF-β反応性遺伝子の*Serpine1*の発現をリアルタイムPCR法にて、リン酸化Smad2の発現をウェスタンブロット法にて解析した。

⑤　LDSモデルマウスにおける歯周組織の表現型の解析

6週齢と24週齢雄のWTおよびKIマウスの上顎骨を回収し、マイクロCT撮影を行い、セメントーエナメル境と歯槽骨

頂間の面積を測定することにより、加齢による歯槽骨吸収について評価を行った。また、上顎骨の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色を行い、歯周組織の組織学的解析を行った。

⑥　歯周病原性細菌投与による歯周組織の変化の解析

8週齢雄のWTおよびKIマウスに3日おきに10回、*Porphyromonas gingivalis*（*P.g*）ATCC W83株を経口投与し、実験的歯周炎モデルを作製した。*P.g*投与後、同マウスの上顎骨を回収し、マイクロCT撮影を行い、セメントーエナメル境と歯槽骨頂間の面積を測定することにより歯槽骨吸収について評価を行った。また、上顎骨の切片を作製し、HE染色を行い、歯周組織の組織学的解析を行った。

⑦　腹腔マクロファージの反応性変化の解析

8～10週齢のWTおよびKIマウスの腹腔内に4%チオグリコレート培地2mLを注射し、3日後に5mLハンクス平衡塩溶液（HBSS）を用いて腹腔内を洗浄し、腹腔内の浮遊細胞を回収、播種し、プレートに接着した細胞をマクロファージとして実験に用いた。マクロファージを*Esherichia coli*由来のLipopolysacchalide（LPS）にて刺激し、全RNAを回収後、*Il-6*, *Tnf*の遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて解析した。

【結果】

① 本実態調査では、MFSおよび類縁疾患の患者120名（男56名、女64名）は、平均年齢38.7歳であり、対応する年代の対照群に比べ、4㎜以上のPDを有する者の割合が有意に高く、歯周病が進行していることが明らかとなった。歯周病を伴ったMFS患者は慢性歯周炎と考えられる病態であった。さらに、LDS患者において、侵襲性歯周炎様病態を伴った患者を１名見出した。

② ゲノムシークエンスの結果、*TGFBR1*のGSドメインにG188Vという変異を認め、現在までに報告の無い新規の変異であることが明らかとなった。同患者の遺伝変異を再現した*Tgfbr1*^{G188V} KIマウスを作製した。

③ 胎生14.5日では、WT、*Tgfbr1*$^{G188V/+}$、*Tgfbr1*$^{G188V/G188V}$の個体が存在するが、出生数では、*Tgfbr1*$^{G188V/G188V}$はわずか１例のみであり、*Tgfbr1*$^{G188V/G188V}$の変異は胎生致死を引き起こすことが示された。そこで、LDSモデルマウスとして、*Tgfbr1*$^{G188V/+}$マウスについて解析を行った。*Tgfbr1*$^{G188V/+}$マウスはWTに比べ有意に早逝であることが明らかとなった。24週齢の*Tgfbr1*$^{G188V/+}$マウスにおいて、大動脈弾性線維の走行のねじれや微細な断裂像が確認された。

④ *Tgfbr1*^{G188V}を強発現した293細胞において、WTと比較して有意にルシフェラーゼ活性が低下していることが示された。また、KI MEFsにおいて、TGF-βで誘導される*Serpine1*の遺伝子発現およびpSmad2のタンパク発現はWT MEFsと比較して有意に低下していることが明らかとなった。

⑤ 6週齢および24週齢の上顎骨のマイクロCT像において、歯槽骨の吸収状態はWTと*Tgfbr1*$^{G188V/+}$とで差異は認められなかった。また、上顎骨のHE染色像においてもWTと*Tgfbr1*$^{G188V/+}$とで差異は認められなかった。

⑥ P.g投与による実験的歯周炎モデルでは、WTと比較して*Tgfbr1*$^{G188V/+}$において有意に歯槽骨吸収が増加していることが示された。

⑦ *Tgfbr1*$^{G188V/+}$マウスの腹腔内マクロファージは、WTと比較してLPS刺激による*Il-6*、*Tnf*の発現が有意に増加することが示された。

【結論および考察】

本研究におけるMFSおよびその類縁疾患と歯周炎との実態調査の結果から、MFSおよびその類縁疾患の患者は、健常者と比較して歯周炎の罹患率が高く、かつ重症化していることが示され、MFSの遺伝変異は歯周炎のリスクファクターとなっていることが示唆された。しかしながら、日々のプラークコントロールや定期的なメインテナンスを励行することでMFS患者の口腔保健を維持することは可能であると考えられる。一方で、LDS患者において侵襲性歯周炎の様相を呈している患者を見出し、LDSの遺伝変異と歯周炎とに遺伝的に強い関わりがあると考えられた。

本研究で樹立したLDSモデルマウスは大動脈組織の構造異常を示し、WTと比較して早逝の傾向を示すことから、LDSの病態を示していると考えられる。同マウスは、細胞レベルではTGF-βシグナルが減弱化しており、組織中ではそれを補うためTGF-βが過剰に発現していることが示された。過剰なTGF-βの発現により、大動脈では弾性が減弱化し、大動脈壁が弱体化することにより、血流などの刺激によって経年的に大動脈組織の構造異常が起こっていると考えられる。一方で、歯周組織においては明らかな構造異常が認められず、今後、構造異常の有無について、細胞、分子レベルでの詳細な解析が求められる。同マウスにおける*P.g*投与歯周炎モデルでは、WTと比較して有意に破骨細胞が増加し、歯槽骨吸収が増加していることが示された。同マウスの免疫応答細胞において、抗炎症性サイトカインであるTGF-βシグナルが減弱化する結果、LPSに対する反応性が増加していると考えられ、*P.g*を経口投与することで、全身的および局所的な炎症状態が惹起され、それによって歯槽骨吸収が有意に増加したものと考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　津島　賢一朗　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	村上　伸也
	副 査　教 授	川端　重忠
	副 査　准 教 授	野村　良太
	副 査　講 師	村上　智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、transforming growth factor-β（TGF-β）関連遺伝子の遺伝変異によりおこるMarfan 症候群（MFS）およびその類縁疾患と歯周炎との関連について、実態調査および解析を行った。さらに、MFS 類縁疾患の Loeys-Dietz 症候群（LDS）における遺伝変異が歯周組織に及ぼす影響について、LDS モデルマウスにおける *Porphyromonas gingivalis*（*P.g*）投与による実験的歯周炎モデルを用いて解析したものである。

その結果、MFS および類縁疾患の患者は、健常者と比較して歯周炎の罹患率が高く、かつ重症化していることが明らかとなった。さらに、LDS モデルマウスは、野生型マウスと比較して、*P.g* 投与により歯周組織において有意に破骨細胞が増加し、歯槽骨吸収が増加したことが明らかとなった。以上の結果より、MFS および類縁疾患の病態は歯周病の発症・進行のリスクになること、LDS の遺伝変異により *P.g* 感染による歯周病が進行しやすくなることが明らかとなった。これらの研究成果は、MFS および類縁疾患と歯周炎との関連性を明らかにすると共に、TGF-β と歯周病との関連を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。