

博 士 論 文

ヒト歯周炎歯肉を用いた hBD-2 および IL-1 β 発現と
歯周炎の重症度との関連についての研究

2015年8月18日

清水 智子

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

環境病理学講座

博 士 論 文

ヒト歯周炎歯肉を用いた hBD-2 および IL-1 β 発現と
歯周炎の重症度との関連についての研究

2015年8月18日

清水 智子

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

環境病理学講座

槻木恵一教授 指導

論文内容要旨

歯肉溝上皮および歯肉外縁上皮の扁平上皮細胞には、細菌や炎症性サイトカインの刺激によって 様々な自然免疫応答が認められる。特に human β -defensin-2 (以下, hBD-2)は、抗菌性を示すペプチドであり初期防御に関与する。申請者らはこれまでに hBD-2 に注目し、歯周病の発病に関与する *Porphyromonas gingivalis* により刺激後 2 時間で hBD-2 が発現することについて、ヒト歯肉組織を免疫不全マウスに移植した *in vivo* モデルを用いた検討で明らかにしてきた。しかしながら、歯周病の重症度の違いがどのように hBD-2 の発現に影響しているかは明らかにされていない。

そこで、ヒト歯肉組織の 3 次元構築が保持された *in vivo* モデルを用いてヒト歯肉組織の *P. gingivalis* 感染に対する反応を解析し、hBD-2 および Interleukin- 1β (以下, IL- 1β) の発現動態と歯周炎の重症度との関連について検討を行った。

本研究に用いた歯肉は、神奈川歯科大学附属横浜クリニックを受診し、歯周外科手術または抜歯術を行った軽・中等度慢性歯周炎患者 21 名、重度慢性歯周炎患者 19 名より歯肉を採取した。なお、本研究は神奈川歯科大学倫理委員会の承認を得た (第 183 番 20120301)。患者より採取した移植歯肉を 3×2 mm サイズにトリミングし、オスのヌードマウス 8 週齢の背中側に皮膚弁を形成して歯肉を移植した。組織が生着するまで 2 週間おき、*P. gingivalis* を歯肉移植部の皮下に接種し、ヒト歯肉組織に対して細菌感染を起こさせた。また、control として BHI 液体培地を同様に皮下接種した。2 時間細菌曝露させた後にサンプリングを行い、real-time PCR を用いて hBD-2, IL- 1β の mRNA 発現を解析した。統計学的分析は、感染群と control (非感染) 群の差を Wilcoxon 符号付き順位検定を用いて比較した。さらに、hBD-2 と IL- 1β の関連を Spearman の順位相関検定、歯周病の重症度と hBD-2 および IL- 1β の発現パターンの関係を Fisher の直接確率法を用いて分析・検討した。

軽・中等度慢性歯周炎において、*P. gingivalis* 感染群では hBD-2 の発現が有意に増加 ($p=0.001$) したが、重度慢性歯周炎では有意な増加を認めなかった。IL- 1β 発現は軽・中等度慢性歯周炎、重度慢性歯周炎ともに *P. gingivalis* 感染群で有意な差を認めなかった。軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL- 1β は中程度の相関関係 ($r=0.508$, $p<0.05$) を認めたが、重度慢性歯周炎では相関を認めなかった。また、歯周病の重症度と発現パターンの分析より、軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL- 1β 発現がともに増加したが、重度慢性歯周炎では hBD-2 と IL- 1β 発現がともに減少した。

これらの結果より、慢性歯周炎の重症度の違いにより hBD-2 の初期における発

現動態が異なることが示唆され、IL-1 β の発現と相関して歯周炎の進行に関与している可能性が考えられた。

論文審査要旨

学位申請論文は、自然免疫応答の初期防御に関与する抗菌性ペプチドである human β -defensin-2 (以下、hBD-2)の発現と歯周炎の重症化がどのように影響しているかについて、*in vivo* モデルを用いて検討した結果、慢性歯周炎の重症度の違いにより hBD-2 の発現動態が異なることを示した論文である。

歯肉溝上皮細胞は、病原性微生物の侵入に対して物理的防御機能だけでなく、種々の液性物質の産生による免疫防御反応の役割を担っている。特に初期防御反応に関与する抗菌ペプチドである hBD は Interleukin-1 β (以下、IL-1 β) のような炎症性サイトカインの刺激により誘導され、グラム陰性菌に対し強い抗菌作用を示すことが注目されているが、hBD-2 と歯周炎の重症度との関連性を明らかにするための生態環境を反映した実験モデル系が確立されていない。本論文は、歯周炎の重症度の異なるヒト歯肉を免疫不全ヌードマウスに移植し、歯周病原細菌である *P. gingivalis* (*P. g*) 感染による hBD-2 およびその発現誘導因子である IL-1 β の発現動態を検討し、ヒト歯肉溝再現モデルにおける初期反応性と歯周炎の重症度との関連を明らかにしたものであり、明確性および新規性のある研究目的を有していると評価した。

研究方法の概略は以下の通りである。軽・中等度慢性歯周炎患者 21 名、重度慢性歯周炎患者 19 名より歯肉を採取し、トリミング後に、8 週齢オスのヌードマウスの背中に皮膚弁を形成して、移植した。2 週間後に感染群として *P. g* 菌液を、非感染群として BHI 液体培地液を皮下接種した。2 時間曝露後にサンプリングを行い、real-time PCR 法を用いて hBD-2、IL-1 β のヒト特異的 mRNA 発現の群間差、両マーカーの関連性および歯周炎の重症度と両マーカーの発現パターンについて適切に統計分析を行っている。なお、研究倫理上の配慮がされていることを確認した。

本研究で用いた *in vivo* 移植実験系は、ヒト歯肉の形態的および免疫組織化学的にヒト形質を保存している特徴がある。特に hBD-2 の発現は、歯肉扁平上皮の分化により局在が異なることから、培養歯肉上皮細胞による実験よりも生体に近い現象をとらえることができることから、独創性のある方法である。

結果として、軽・中等度慢性歯周炎歯肉は、*P. g* 感染により hBD-2 mRNA が有意に増加するが、重度慢性歯周炎歯肉では有意な増加は認めなかった。また、*P. g* 感染により、軽・中等度慢性歯周炎の hBD-2 および IL-1 β mRNA 発現量はともに増加し、重度慢性歯周炎ではともに減少し、歯周炎の重症化により、発現パターンが変化することが示された。

従来ヒト歯肉生検組織あるいは、培養細胞を用いた方法においては、健康歯肉と歯周炎歯肉あるいは、歯周炎の病態による hBD-2 の発現には、明確な関連性が認められず、その不均一性や歯周炎の重症度との関連性は不明であった。本論文では、ヒト歯肉に対する *P. g* 感染刺激による hBD-2 の反応を、よりヒト歯肉溝の環境に類似した条件下で比較できる *in vivo* モデルを用いて歯周炎の重症度と hBD-2 発現の関連性を評価した結果、hBD-2 および IL-1 β の発現パターンが、歯周炎の進行に影響を及ぼしている可能性を示唆したことは、新規性、

独創性があり、高く評価できる。また、今後、歯周炎の進行と予後、歯周治療後の治療反応性を予測するリスク判定マーカーとして hBD-2 および IL-1 β が有用である可能性があり、本研究の発展性が期待できる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、口頭試問を行ったところ十分な回答が得られたことを確認した。さらに、本論文によって得られた新しい知見は、今後の歯周炎の病態解明への貢献が期待でき、歯周病診断学の発展につながるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は、申請者が博士（歯学）の学位に十分に値するものと認めた。

本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2015年 8月 18日

主 査： 三辺 正人

副 査： 児玉 利朗

副 査： 山本 龍生

緒 言

ヒトの疾患を動物において再現し解析することは、病変の理解や臨床応用を検討するため一般的に行われている研究手法である。しかし、歯周病には臨床病態を反映した疾患モデル動物が存在しないため、ヒト組織を移植できる免疫不全マウスを用いることは、より生態を反映した結果が得られる有用な実験系である¹⁾。近年、ヒト白血病細胞を免疫不全マウスに移植し、多種類の抗癌剤を投与しスクリーニングに用いる方法や実際のヒトには行えない感染実験をヒト組織が移植された免疫不全マウスに行うヒト化マウスの報告がある²⁾。

これまでヒト口腔粘膜を免疫不全マウスに移植する試みは、Holmstrup ら³⁾のヒト口蓋粘膜をヌードマウス皮下に移植する研究があり、成功率も高いことが報告されている。しかし、この実験系では嚢胞状となり角化が著明となることから、3次元形態が実際の組織とは大きく異なる欠点が指摘されていた。そこで Tsukinoki ら⁴⁾は、皮膚の移植に適した免疫不全動物である BALB/c AJcl-*nu/scid* マウスに注目し3種類の方法によりヒト口腔粘膜の移植を試み、ヒト歯肉構造を保持した移植法を開発した。この移植法は、60日まではヒト正常歯肉と同様の構造を示し、80日で嚢胞化傾向が認められる。免疫組織化学的には80日間で被覆上皮と上皮結合組織にヒト形質が認められたが、血管内皮

細胞には CD34 陰性なことから毛細血管はマウス化している。しかし、マウス皮下内で毛細血管以外はヒト形質を保ち、形態的には歯肉と同様の構造を示すことから、マウス内でヒト歯肉組織が再現できるモデルとして報告している。さらに著者の共同研究者である To ら⁴⁾は、BALB/c AJcl-*nu/scid* マウスが日常的に供給されていないことから、市販されている BALB/c AJcl-*nu/nu* (ヌードマウス) と C.B-17/Icr-*scid/scid* Jcl (スキッドマウス) においても、Tsukinoki ら¹⁾の手法が適応できるか検討した後に、ヒト歯肉組織を移植し細菌感染実験を行った。To ら⁴⁾は、スキッドマウスよりヌードマウスの方が移植成功率の高いことを示し、さらに、2 週間の検索では、免疫組織化学的に血管内皮細胞も含めてヒトの形質が認められたことから、ヌードマウスにおいてもヒト歯肉組織の移植が可能であることを示した。また、移植前より移植後には炎症細胞がほとんど消失するが、ヒト正常組織のうち血球系は定着しにくいためと考えられ、組織学的な炎症反応は消退すると同時に形態的に非感染状態になる特徴がある実験系である。さらに To ら⁴⁾は、この実験系を用いて *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*) 感染実験を行い歯肉組織の反応として human β -defensin-2 (以下、hBD-2) の発現動態を検索した。

歯周病原菌が最初に接するのは、歯と遊離歯肉の間に存在する歯肉溝の上皮細胞である⁵⁾。歯肉溝上皮細胞は、病原微生物の侵入に対して物理的防御のバリ

アとして機能するだけでなく、さまざまな液性物質を産生することによって免疫応答を起し生体の防御反応を司っている⁶⁾。特に、初期の生体防御反応として天然の抗菌ペプチドである hBD の産生が挙げられる⁷⁾。抗菌ペプチドの主要なファミリーには defensin があり、これは正の電荷をもったアルギニン残基に富んでおり、特徴として 3 つの鎖内ジスルフィド結合をもつ 35-40 アミノ酸からなるタンパク質である。defensin は α ヘリックスまたは β シート構造を示し、酸性リン脂質が多く負に帯電している微生物の細胞膜と抗菌ペプチドは静電相互作用により強く結合する。ペプチドのらせん構造は細胞膜中の脂質と馴染み、細胞膜を突き抜けやすいため、抗菌ペプチドが大量に集積すると細胞膜に穴を開けて抗菌力を発揮する。抗菌ペプチドはこのようなメカニズムで細菌や真菌、エンベロープをもつウイルスなど幅広い抗菌活性を示す^{8,9)}。好中球が主として産生し小腸粘膜にも存在する α -defensin と上皮系細胞が産生し粘膜上皮に認められる β -defensin に分類される。また hBD は主に 1-4 に分類され、その中でも hBD-2 はグラム陽性菌よりグラム陰性菌に対してより強い抗菌作用を示す。一般的に hBD-2 は、微生物や Interleukin-1 β (以下、IL-1 β) のような炎症性サイトカインで上皮細胞が刺激されると誘導される¹⁰⁻¹²⁾。これまで hBD-2 には、歯肉の上皮細胞で発現し初期の感染防御機構として役割を果たしている可能性があることが報告されてきた¹³⁾。歯肉上皮細胞の培養液内に *P. gingivalis* を感染させると、

hBD-2 の発現が増加する¹⁴⁾。この hBD-2 の発現について To ら⁴⁾は、歯肉組織を移植したヌードマウス皮下に *P. gingivalis* 感染実験を行い、2 時間の時点で hBD-2 の遺伝子発現が非感染群と比較して高いレベルにあると同時に、免疫組織化学的に扁平上皮細胞の細胞膜に hBD-2 が局在することを報告した。即ち hBD-2 は、*P. gingivalis* 感染に対して初期防御に役割を果たしていることをヒト組織で初めて実験的に明らかにした。しかし、歯周病の重症度と hBD-2 の発現動態との関連については、これまで明らかにされておらず、興味ある研究対象である。

さらに歯周病は、様々な炎症性サイトカインが病変の進展に関与している¹⁵⁾。この炎症性サイトカインの 1 つである IL-1 は α と β に分類され、IL-1 α は恒常的に存在して日常起こる軽度の炎症に対応し、IL-1 β は感染などの緊急時に大量に産生される。IL-1 は単球やマクロファージが微生物、Lipopolysaccharide (LPS) などから刺激を受けて産生され、線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球を活性化しプロスタグランジン E₂ や破骨細胞分化因子などの発現を誘導し、歯槽骨に対する強い骨吸収作用と形成阻害作用を持っていることが報告されている¹⁶⁾。近年では、この IL-1 β が hBD-2 の発現に関与することが報告されている¹⁷⁾。

そこで、本研究では重症度別にヒト歯肉をヌードマウスに移植し *P. gingivalis* 感染を行い、hBD-2 およびその発現誘導因子である IL-1 β の発現動態

を検討し、歯肉組織の初期における反応性と歯周病の重症度との関連について
検討を行った。

材料および方法

1. ヒト歯肉組織の採取方法

本研究に用いた歯肉組織は、神奈川歯科大学附属横浜クリニックを受診した患者のうち、抜歯術や慢性歯周炎と診断され歯周外科手術を行った軽・中等度慢性歯周炎患者 21 名、重度慢性歯周炎患者 19 名より採取した。それ以外に 5 例を移植しているが、移植後に脱落したことから検索対象から外した。すべての患者は歯周基本治療を受けており、gingival index (GI) は 1-2 であった。歯周炎の重症度は日本歯周病学会のガイドライン¹⁸⁾に基づき、プロービングデプスとエックス線画像により分類した。軽・中等度慢性歯周炎では、プロービングデプス 6 mm 未満、骨吸収が歯根の長さの 1/2 未満の部位より採取した。重度慢性歯周炎では、プロービングデプス 7 mm 以上、骨吸収が歯根の長さ 1/2 以上の部位から採取した。なお、本研究は神奈川歯科大学倫理委員会の承認（第 183 番 20120301）を受けて行い、組織採取に際し患者に十分な説明を行い承諾の得られた症例を用いた。

2. 実験動物

免疫不全であるヌードマウス BALB/c AJcl-*nu/nu* マウス（日本クレア株式会

社、東京、日本)、オス 8 週齢 (体重 20–25 g) を用いた。マウスは無菌室内にて無菌アイソレーター内で滅菌した水と餌により飼育した。なお、本研究は神奈川歯科大学動物実験倫理委員会によって承認され、動物実験のためのガイドラインに従って行われた。

3. 免疫不全マウスへの歯肉移植方法

移植方法は、Tsukinoki ら¹⁾の方法を基に To ら⁴⁾の方法に従い行った。歯周外科手術または抜歯術の際に採取された歯肉は生理食塩水を含んだガーゼに包み 4°C で保存し、3 時間以内にクリーンベンチ内でマウスへ移植した。歯肉組織は、移植前に洗浄し、約 3×2 mm の大きさとなるようトリミングし、脂肪層や厚い結合組織がある場合は可及的に除去した。マウスにソムノペンチル[®] (ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg ; 共立製薬株式会社、東京、日本) を腹腔内注射し、全身麻酔下にてマウスの背部に切開を加え皮膚弁を形成した (図 1)。次に、移植片の結合組織側とヌードマウスの皮膚弁結合組織側が密着するように縫合し、皮膚弁を元の位置に復位させて縫合した。創部は消毒し、テガダーム (3M ジャパン株式会社、東京、日本) で保護した。

4. 感染実験方法

P. gingivalis ATCC 33277 は 5 mg/ml 酵母エキス、5 μ g/ml ヘミン、10 μ g/ml のビタミン K₁ を含む、BHI-Y-H-VK₁ 液体培地を用い、18 時間、37°C、嫌気下 (85% N₂、10%H₂、5%CO₂) にて培養された。感染群は移植 2 週間後のヌードマウスの背部に移植された歯肉組織下に *P. gingivalis* 培養菌液 1.0 mL (平均菌数 : 7.1 $\times 10^8$ CFU/ml) を注入し、曝露させた。一方、control 群として BHI-Y-H-VK₁ 液体培地 1.0 mL を同様に歯肉組織下に注入した。2 時間細菌に曝露させた後サンプリングを行った。

5. 病理組織学的検索

移植前および移植片の歯肉は、採取後に 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定され、オートキネットでパラフィンに置換後、パラフィンブロックを作製した。さらに 4 μ m に薄切し、通法に従い Hematoxylen-eosin 染色を行い病理組織学的な観察を行った。

6. total RNA 抽出・cDNA 合成・real-time PCR

約 3 \times 2 mm 大の移植歯肉片全量からホモジナイズして、total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン社、富山、日本) を用いてマニュアルの手順に従い抽出した。

RNA 濃度は、BioSpec-nano 分光光度計（株式会社島津製作所、京都、日本）を用いて測定した。cDNA は、cDNA 合成キット（Roche Diagnostics Ltd., Lewes, UK）を用いて total RNA から合成した。Real-time PCR は Light Cycler（Roche）を用いて行った。hBD-2 遺伝子配列を特異的に増幅するために使用したプライマー配列は、日本遺伝子研究所（宮城、日本）によって合成された 5'-TCT-TCT-CGT-TCC-TCT-TCA-TA-3'（forward） および 5'-TGT-TTA-TAC-CTT-CTA-GGG-CA-3'（reverse、PCR 産物：127 bp）を用いた。PCR による増幅反応は 95°C10 分 1 サイクル、95°C10 秒、58°C20 秒、72°C10 秒を 35 サイクルで行った。さらに、IL-1 β のヒト特異的な PCR 分析には Light Cycler Primerset（Search-LC, Heidelberg, Germany）を使用した。ハウスキーピングコントロールとして β -actin を用いて同様に PCR を行った。遺伝子発現は、各遺伝子 mRNA 量と β -actin の発現量の比として算出した。

7. 統計学的分析

軽・中等度慢性歯周炎群および重度慢性歯周炎群の hBD-2 および IL-1 β mRNA 量について感染群と control 群における発現の差の検定を Wilcoxon 符号付き順位検定にて比較した。

hBD-2 と IL-1 β の発現レベルの関連を Spearman の順位相関検定を用いて検討

した。

hBD-2 および IL-1 β mRNA 量は、感染群での増減を control (非感染)群を分母とし、増加率で算出した。さらに歯周病の重症度と hBD-2 および IL-1 β の発現パターンとの関係を検討するため、増加群および減少群の割合を算出し Fisher の直接確率法を用いて確認した。統計分析は IBM SPSS Statistics 22 (IBM Co., NY, USA) を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

結果

1. 移植片の病理組織像

移植前の重度慢性歯周炎歯肉上皮は、軽度の錯角化と上皮突起の延長が認められた (図 2a)。びらんなどの上皮の欠損は認められない。さらに歯肉上皮下には、リンパ球および形質細胞からなる慢性炎症細胞浸潤が認められ、慢性歯肉炎を示す典型的な歯肉粘膜の組織像を呈した (図 2a)。軽・中等度慢性歯周炎歯肉においても同様の組織像を示した。一方、移植片の組織像は、移植前と同様の像を示すが上皮下の慢性炎症細胞浸潤はほとんど観察されず、線維化の進行が認められた (図 2b)。さらに感染後の移植片では、マウス由来の軽度の好中球浸潤を伴う症例も認めた。また、これらの組織学的所見は、過去の報告⁴⁾と同様に分化異常も認められなかった。

2. *P. gingivalis* 感染後の hBD-2 mRNA 発現

hBD-2 mRNA について融解曲線分析を行った。全ての試料において hBD-2 mRNA を示す単一の蛍光ピークが確認された。

軽・中等度慢性歯周炎群では、control 群と比較して感染群において hBD-2 遺伝子発現レベルが有意に増加した ($p=0.001$) (図 3a)。重度慢性歯周炎群 (図 3b) での発現レベルには有意な差を認めなかった。これらのことから、軽・中

軽度慢性歯周炎群と重度慢性歯周炎群では、感染後の hBD-2 遺伝子発現プロフィールが異なっていた。

3. *P. gingivalis* の感染後の IL-1 β mRNA の発現

軽・中程度慢性歯周炎群では、IL-1 β mRNA レベルは control 群と感染群の間に有意な差を認めなかった (図 4a)。重度慢性歯周炎群においても IL-1 β mRNA レベルに有意な差を認めなかった (図 4b)。軽・中程度慢性歯周炎群および重度慢性歯周炎群ともに、感染による IL-1 β mRNA の有意な増加は認められなかった。

4. hBD-2 および IL-1 β mRNA の相関

軽・中等度慢性歯周炎群において hBD-2 および IL-1 β mRNA の間では中等度の正の相関関係が認められた ($r=0.508$, $p=0.019$) が、重度慢性歯周炎群において hBD-2 および IL-1 β mRNA の間で相関関係を認めなかった ($r=0.176$, $p=0.566$)。hBD-2 および IL-1 β mRNA の関連性は、軽・中等度慢性歯周炎群と重度慢性歯周炎群では異なっており、軽・中等度慢性歯周炎群では中程度の正の相関関係が示された (図 5)。

5. 重症度の違いによる hBD-2 および IL-1 β mRNA 発現のパターン

mRNA 発現のパターンは、表 1 に示すように hBD-2 増加および IL-1 β 増加群 ($\uparrow\uparrow$)、hBD-2 増加および IL-1 β の減少群 ($\uparrow\downarrow$)、hBD-2 減少および IL-1 β 増加群 ($\downarrow\uparrow$)、hBD-2 減少および IL-1 β 減少群 ($\downarrow\downarrow$) の 4 つの群に分類された。図 6 には、各症例の増減の分布を示す。hBD-2 および IL-1 β がともに増加するパターンは、軽・中等度慢性歯周炎 12 例 (80%) と重度慢性歯周炎 3 例 (20%) に認められた。hBD-2 および IL-1 β がともに減少するパターンは、軽・中等度慢性歯周

炎 0 例(0%)と重度慢性歯周炎 10 例(10%)に認められた。それぞれの割合を算出した上で Fisher の直接確率法を用いて確認したところ、パターン毎に分布が有意に異なっていた ($p < 0.05$)。軽・中等度慢性歯周炎において、hBD-2 および IL-1 β がともに増加した ($\uparrow\uparrow$) が、重度慢性歯周炎では hBD-2 および IL-1 β 発現がともに減少した ($\downarrow\downarrow$)。

考察

本研究では、Tsukinoki ら¹⁾によって確立された *in vivo* モデルを基本に To ら⁴⁾が改良したヌードマウスの移植モデルを使用した。このモデルは、マウスにおけるヒト歯肉組織の3次元的再構築が得られるとともに、マウス皮下は嫌気的であることから、ヒト歯肉溝に類似する環境を再現することができる。また、マウスに移植したヒト歯肉組織は、基本治療後に歯肉の炎症が一部残存するが、移植後は口腔内と異なり口腔細菌の曝露の無い状態で維持される。この移植片は、ヒト形質を保存していることが報告されており⁴⁾、移植後2週間で組織学的に移植前の慢性炎症細胞は消失していた。この結果は、過去の報告と一致している⁴⁾。また、Dale ら¹⁹⁾によると歯肉における hBD-2 の免疫組織化学的局在は、角化を伴う上皮表層であるが、*in situ* hybridization による hBD-2 mRNA の局在は、棘細胞層と顆粒層に認められ、扁平上皮の分化状態により異なることが示されている。すなわち、歯肉扁平上皮の培養系では、培養条件にも依存するが、基本的には単一の性格を持つ細胞であり、培養細胞による hBD-2 の検討は生理的条件とは大きく異なる。したがって、本実験系における歯肉組織に対する *P. gingivalis* 刺激は、hBD-2 の反応を培養系より正確に反映すると考えられる。

そこで本研究では、臨床的に軽・中等度慢性歯周炎および重度慢性歯周炎と診断され、歯周基本治療後に採取された歯肉組織を用いて、*P. gingivalis*感染後の各疾患群における hBD-2 および IL-1 β 発現状態の特徴を明らかにした。

軽・中等度慢性歯周炎群において、非感染群と感染群で hBD-2 発現状態は、感染群で有意な増加を認めた。しかし、重度慢性歯周炎群において hBD-2 発現に有意差はなかった。Bissell ら²⁰⁾は、健康歯肉 20 例と中程度と重度の歯周炎歯肉が混在した 29 例の生検材料を用いて定量 PCR を行い hBD-2 の発現を解析している。解析の結果として hBD-2 の発現を、発現なし、低発現、高発現の 3 つに分けたところ、歯周炎歯肉は発現なしが 55.2%、低発現 31.0%、高発現 13.8%を示し hBD-2 の発現に不均一性があることを示している。また、健康歯肉の方が歯周炎歯肉より有意に hBD-2 が高い値を示した。Vardar ら²¹⁾は、健康歯肉 10 例、歯肉炎 8 例、歯周炎 9 例、侵襲性歯周炎 4 例の生検材料を用いて定量 PCR を行い hBD-2 の発現を解析している。この報告は、歯周炎を病態別に解析した初めての報告であり、歯肉炎と歯周炎の間には有意差は無いことを示した。また、歯周炎の重症度は不明であるが、健康歯肉と比較して歯周炎 5 例が高いレベルに、4 例が低いレベルにあることを示しており、Bissell らの結果と同様に不均一性があった。近年の報告として Wang ら²²⁾は、健康歯肉 29 症例、重症度不明の歯周炎歯肉 25 症例の生検材料を用いて hBD-2 の定量 PCR を行い発現を解

析した結果、健康歯肉と歯周炎歯肉に有意差がないことを示した。以上の一連の報告から、歯周炎の病態と hBD-2 の発現量に関連性が認められず、hBD-2 の発現の不均一性の理由は明らかにされていない。しかし、これまでの報告は歯周炎歯肉を重症度別に検討した試みがなく、著者のように重症度別に検討することで、これまでの報告に認められた不均一性も一定の傾向を示す可能性が考えられ興味深い。一方、*in vitro* 研究で培養歯肉上皮細胞に対して細菌刺激を加えると hBD-2 の発現が増加することが明らかになっている²³⁾。この反応は、細菌感染に対する宿主初期感染防御において重要な役割を果たしていると考えられてきた²⁴⁾。これらの結果は、病態や重症度の進展と相関し hBD-2 が増加することを予想させるが、前述したとおり生検標本での検討では、病態の進展が hBD-2 を常に増加させるという結果は得られていない。本研究により、細菌刺激に対する反応として hBD-2 が増加する点については、培養細胞での結果と一致している。特に 2 時間という早期に増加する点は、hBD-2 が細菌に対する初期防御機構の 1 つであるというこれまでの定説とも矛盾しない。しかしその反応性は、重症度により異なる結果を示しており、歯肉への細菌刺激に対する初期反応としての hBD-2 の発現動態が、重症度により異なる可能性を示唆した初めての研究である。

田口ら²³⁾は、重度歯周炎歯肉を用いてヒト歯肉上皮を培養し、培養液中に *P.*

gingivalis 添加後、ELISA による培養上清中の IL-1 β 蛋白は、3 時間から非添加群に比較して有意に増加し、48 時間では最も大きく差が生じる事を報告している。このように、反応時間は様々だが培養細胞レベルでは、*P. gingivalis* 刺激により IL-1 β 発現が増加するという報告が多い²⁵⁻²⁷⁾。同様に歯肉線維芽細胞も細菌刺激後に IL-1 β 発現が増加する^{28, 29)}。本検討では、IL-1 β の発現は感染刺激後統計学的に有意に増えていないが、軽・中等度慢性歯周炎において IL-1 β と hBD-2 の発現の間に正の相関を示しており、hBD-2 の発現は感染後に増加している。hBD-2 の発現は、Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) 及び Mitogen-activated Protein Kinase-1 (MAPK-1) 経路を介して、IL-1 β などの炎症誘発性サイトカインにより制御される³⁰⁻³²⁾。また、歯肉扁平上皮細胞および線維芽細胞中の hBD-2 発現は、IL-1 β によって増加することが報告されていることから、IL-1 β と hBD-2 の間には関連があることが示されている³³⁾。これらの報告から、重度慢性歯周炎群より軽・中等度慢性歯周炎群の方が IL-1 β による hBD-2 の発現誘導において、反応性が良い可能性が考えられる。本検討では反応時間が 2 時間であり、IL-1 β の量が初期から増加した場合には、hBD-2 の発現レベルも変化することも予想できることから、今後経時的変動を含めて、hBD-2 の発現メカニズムについて明らかにしていく必要がある。

Varder ら²¹⁾は、歯周炎 9 例について健康歯肉の hBD-2 の発現を 1 として増加

率を検討しており、本研究でも非感染群を 1 として感染群の増加率を算出し、hBD-2 および IL-1 β 発現パターンを検討した。その結果、軽・中等度慢性歯周炎と重度慢性歯周炎では発現パターンが異なっていた。軽・中等度慢性歯周炎群は、hBD-2 および IL-1 β 発現がともに増加している症例が多く、重度慢性歯周炎群と比較して分布に有意な差が認められた。また重度慢性歯周炎群は、hBD-2 および IL-1 β 発現がともに減少している症例が多く軽・中等度慢性歯周炎群と比較して分布に有意な差が認められた。このような重症度によるパターンの違いを生じさせる要因が、炎症の経過などの環境要因で生じたのか、元々の個人の形質に由来するのかは、本検討では明らかにできないが、hBD-2 および IL-1 β の発現パターンが歯周炎の各部位における病変の進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

今後は、hBD-2 および IL-1 β の発現パターンが歯周病の重症化を予測するパラメーターとしての有用性について臨床的な検討も行う予定である。

結論

本研究ではヒト歯肉を重症度別にヌードマウスに移植し *P. gingivalis* 感染を行い、hBD-2 およびその発現誘導因子である IL-1 β の発現動態を検討し、歯肉組織における反応性と歯周炎の重症度との関連について検討を行った。

1. 軽・中等度慢性歯周炎において、*P. gingivalis* 感染群では hBD-2 の発現が有意に増加 ($p=0.001$) したが、重度慢性歯周炎では有意な増加を認めなかった。

2. IL-1 β 発現は軽・中等度慢性歯周炎、重度慢性歯周炎ともに *P. gingivalis* 感染群で有意な差を認めなかった。

3. 軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL-1 β は中程度の正の相関関係 ($r=0.508$, $p<0.05$) を認めたが、重度慢性歯周炎では有意な相関関係を認めなかった。

4. 歯周病の重症度と発現パターンの分析より、軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL-1 β 発現がともに増加したが、重度慢性歯周炎では hBD-2 と IL-1 β 発現がともに減少した。

これらの結果より、慢性歯周炎の重症度の違いにより hBD-2 の初期における発現動態が異なることが示唆され、IL-1 β の発現と相関して歯周炎の進行に関与している可能性が考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を頂きました神奈川歯科大学大学院口腔科学講座環境病理学分野 槻木恵一教授に心より感謝致します。ならびに本研究を進めるにあたり、終始ご協力いただきました神奈川歯科大学大学院高度先進口腔医学講座 鎌田要平診療科講師、神奈川歯科大学大学院口腔科学講座唾液腺健康医学分野 東雅啓特任助教、中村葉子研究助手に深く感謝致します。また、多くの示唆を頂いた神奈川歯科大学大学院環境病理学講座教室員の皆様に深く感謝致します。最後に、実験の実施に際してご協力いただきました神奈川歯科大学附属横浜クリニックの皆様に厚くお礼申し上げます。

文献

1. Tsukinoki K, Miyoshi Y, Aoki T, Karakida K, Ohta Y, Kaneko A, Ueyama Y, Watanabe Y. *In vivo* experimental model of human gingival mucosa using immunodeficient mice. *J Periodontal Res* 42: 294-299, 2007.
2. 石川文彦. ヒト化マウスを用いたヒト免疫・疾患解析. *生化学* 84: 216-221, 2012.
3. Holmstrup P, Stoltze K, Bretlau P, Dabelsteen E. Human buccal mucosa transplants in nude mice. *Scand J Dent Res* 89: 89-96, 1981.
4. To M, Kamata Y, Saruta J, Shimizu T, Sato T, Kondo Y, Hayashi T, Hamada N, Tsukinoki K. Induction of β -defensin expression by *Porphyromonas gingivalis*-infected human gingival graft transplanted in *nu/nu* mouse subdermis. *Acta Histochem Cytochem* 46: 25-34, 2013.
5. 柴 秀樹. 歯肉炎発症における歯肉上皮細胞の役割に関する研究. *日歯周誌* 49: 111-119, 2007.
6. 石原裕一, 亀井英彦, 神谷洋介, 伊澤有郎, 水谷大樹, 鈴木万里代, 野口俊英, 三谷章雄. IL-1 ファミリーと IL-1 受容体: 歯周病疾患マーカーや治療薬としての可能性. *日歯周誌* 56: 272-280, 2014.

7. Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of β -defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol* 40: 179-184, 2007.
8. Peter Parham. 笹月健彦 監訳：審良静男, 竹内 理 翻訳；エッセンシャル免疫学, 第二版, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 29-66, 2010.
9. Kawashima R, Shimizu T, To M, Saruta J, Junbu Y, Kusama M, Tsukinoki K. Effects of stress on mouse β -defensin-3 expression in the upper digestive mucosa. *Yonsei Med J* 55: 387-394, 2014.
10. 富田哲治, 長瀬隆英. 生体防御機構としてのディフェンシン. *日本老年医学学会雑誌* 38: 440-443, 2001.
11. Jang BC, Lim KJ, Suh MH, Park JG, Suh SI. Dexamethasone suppresses interleukin-1 β -induced human β -defensin 2 mRNA expression: involvement of p38 MAPK, JNK, MKP-1, and NF- κ B transcriptional factor in A549 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 171-184, 2007.
12. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 7: 119-133, 2005.

13. 鎌田要平, 東 雅啓, 猿田樹理, 佐藤武則, 近藤裕介, 浜田信城, 槻木恵一. ヒト歯周炎歯肉 *in vivo* 再現モデルを用いた IL-1 β 発現についての解析. 神奈川歯学 46: 139-149, 2011.
14. Dommisch H, Reinartz M, Backhaus T, Dwschner J, Chung W, Jepsen S. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Periodontol 39: 913-922, 2012.
15. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. Periodontol 2000 40: 77-93, 2006.
16. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol 79: 1585-1591, 2008.
17. 寺田昌一郎, 田口洋一郎, 上田雅俊. ヒト歯肉上皮細胞における β -defensin-2 と IL-8 の発現に及ぼす IL-1 β の影響. 日歯保存誌 51: 16-23, 2008.
18. 日本歯周病学会編. 歯周病の検査・診断・治療計画の指針2008. 第1版, 医歯薬出版株式会社, 東京, 6-9, 2009.
19. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Robert F, Robinovitch M, O' Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. J Periodont Res 36: 285-294, 2001.

20. Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McCray, Jr BP, Guthmiller MJ. Expression of β -defensins in gingival health and in periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 33: 278-285, 2004.
21. Vardar-Sengul S, Demirci T, Sen BH, Erkizan V, Kurulgan E, Baylas H. Human β defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. *J Periodontal Res* 42: 429-437, 2007.
22. Wang P, Duan D, Zhou X, Li X, Yang J, Deng M, Xu Y. Relationship between expression of human gingival beta-defensins and levels of periodontopathogens in subgingival plaque. *J Periodontal Res* 50: 113-122, 2015.
23. Taguchi Y, Imai H. Expression of β -defensin-2 in human gingival epithelial cells in response to challenge with *Porphyromonas gingivalis* *in vitro*. *J Periodontal Res* 41: 334-339, 2006.
24. Dale BA, Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 30: 321-327, 2001.
25. Stathopou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Clin Periodontol* 37: 24-29, 2010.

26. Stathopou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol* 24: 11-17, 2009.
27. Eskin MA, BenakanakereMR, Rose BG, Zhang P, Zhao J, Stathopoulou P, Fujioka D, Kinane DF. Interleukin-1 β modulates proinflammatory cytokine production in human epithelial cells. *Infect Immun* 76: 2080-2089, 2008.
28. Brunner J, Scheres N, EI Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Crielaard W. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 10: 5, 2010.
29. Imatani T, Kato T, Okuda K. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16: 65-72, 2001.
30. Pahl R, Brunke G, Steubesand N, Schubert S, Boettner M, Wedel T, Juergensen C, Hampe J, Schaefer H, Zeissig S, Schreiber S, Rosenstiel P, Reiss K, Arlt A. IL-1 β and ADAM17 are central regulators of β -defensin expression *Candida* esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: 547-553, 2011.
31. Chung WO, Hansen SR, Rao D, Dale BA. Protease-activated receptor

signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J Immunol* 173: 5165–5170, 2004.

32. Chung WO, Dale BA. Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect Immun* 72: 352–358, 2004.

33. Liu J, Du X, Chen J, Hu L, Chen L. The induction expression of human β -defensins in gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol* 58: 1415–1421, 2013.

付図説明

図 1：移植方法と *P. gingivalis* 感染

マウスの背部に皮膚切開を加え、ヒト歯肉組織を移植した。2 週間後、*P. gingivalis* を歯肉移植部の皮下に接種した。

図 2：移植前歯肉および移植後歯肉における組織学的所見

図 2a は、移植前の歯肉。図 2b は、移植後の歯肉。移植前と比較して線維化が進行している。200 倍。HE 染色。

図 3a：軽・中等度慢性歯周炎における hBD-2 発現

軽・中等度慢性歯周炎において control 群と感染群で hBD-2 発現に有意な差 (* $p=0.001$, Wilcoxon 符号付き順位検定) を認める。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。n=21。

図 3b：重度慢性歯周炎における hBD-2 発現

重度慢性歯周炎において control 群と感染群で hBD-2 では有意な差が認められない ($p>0.05$, Wilcoxon 符号付き順位検定)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分

位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。n=19。

図 4a: 軽・中等度慢性歯周炎における IL-1 β 発現

軽・中等度慢性歯周炎において control 群と感染群で IL-1 β では有意な差が認められない ($p>0.05$, Wilcoxon 符号付き順位検定)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。n=21。

図 4b: 重度慢性歯周炎における IL-1 β 発現

重度慢性歯周炎において control 群と感染群で IL-1 β では有意な差が認められない ($p>0.05$, Wilcoxon 符号付き順位検定)。箱ひげ図は、中央値、第 1 四分位、第 3 四分位、最小値、最大値を示す。n=19。

図 5: 軽・中等度慢性歯周炎における hBD-2 と IL-1 β 発現の相関関係

軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL-1 β は中程度の正の相関関係が示された ($r=0.508$, $p<0.05$, Spearman の順位相関)。

表 1: hBD-2 と IL-1 β の重症度の違いによる発現パターン

軽・中等度慢性歯周炎において hBD-2 と IL-1 β 発現がともに増加したが、重

度慢性歯周炎において hBD-2 と IL-1 β 発現がともに減少した。増加群および減少群の割合を算出し Fisher の直接確率法を用いて確認した。

図 6 : hBD-2 と IL-1 β 発現の増加率の比較

軽・中等度慢性歯周炎と重度慢性歯周炎における hBD-2 と IL-1 β 発現の増加率を比較した。左から 21 例が軽・中等度慢性歯周炎と右から 19 例が重度慢性歯周炎。

図 1: 移植方法と *P. gingivalis* 感染

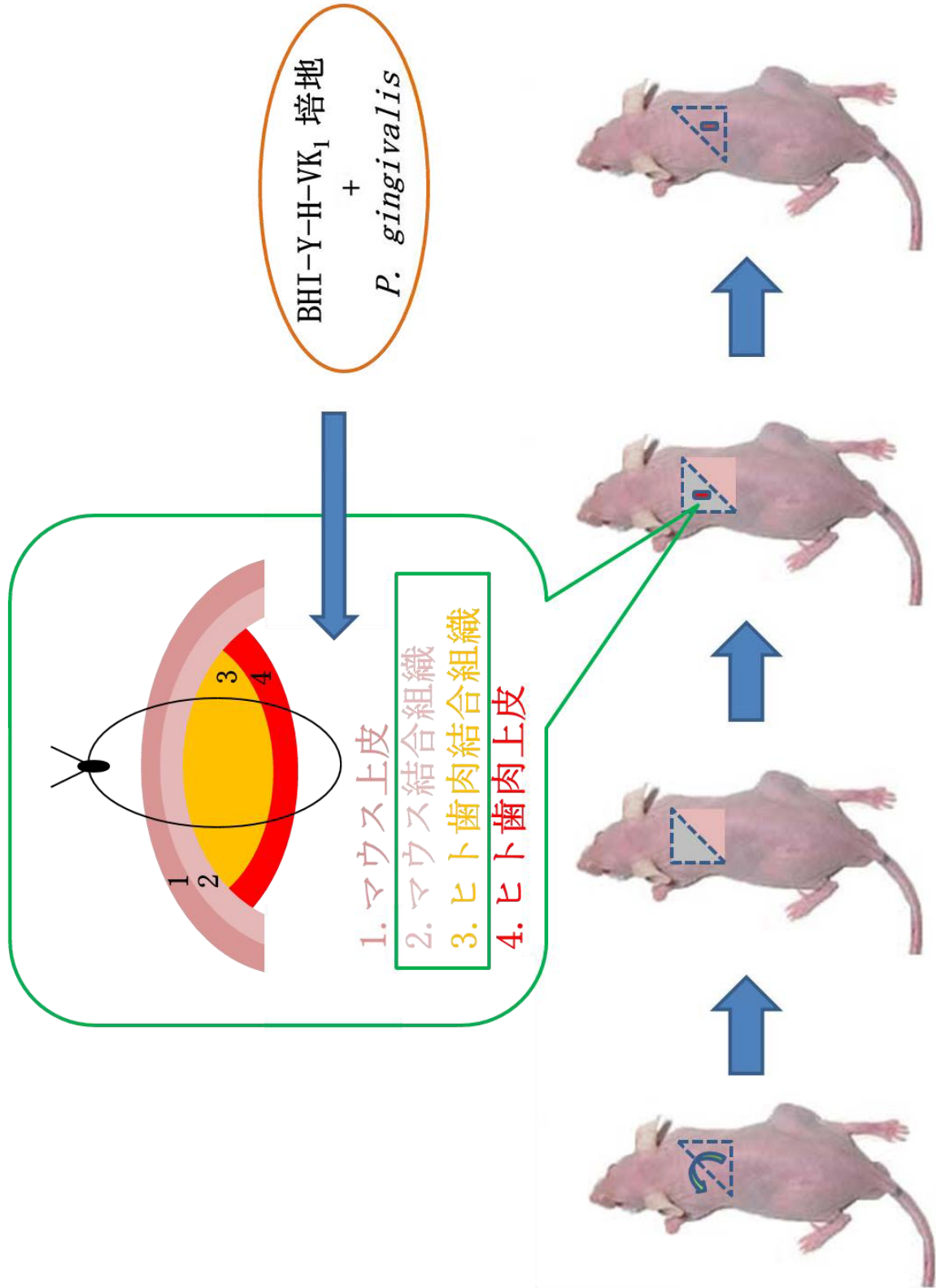
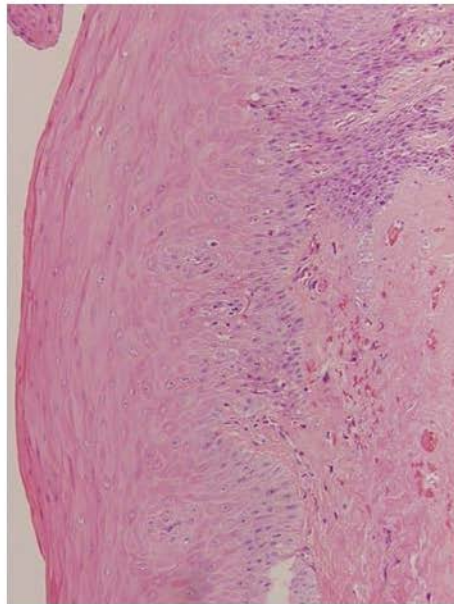
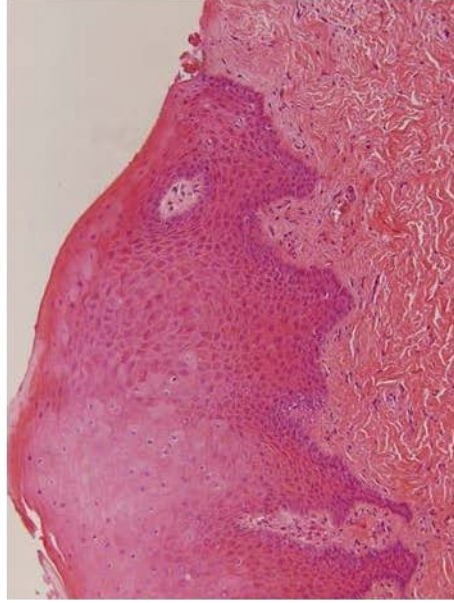


図 2:移植前歯肉および移植後歯肉における組織学的所見



(a) 移植前歯肉



(b) 移植後歯肉

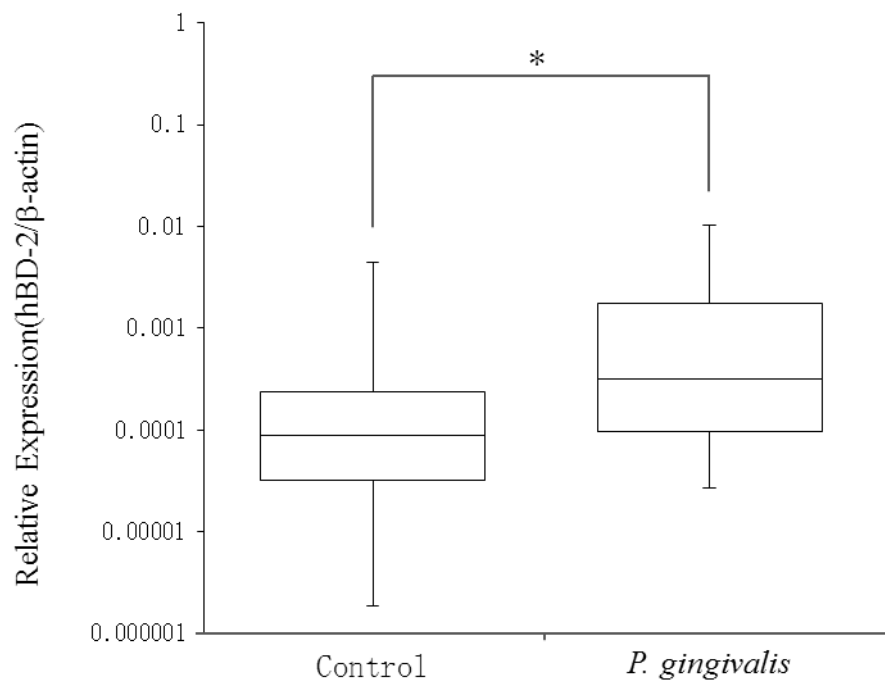


図 3a: 軽・中等度慢性歯周炎におけるhBD-2発現

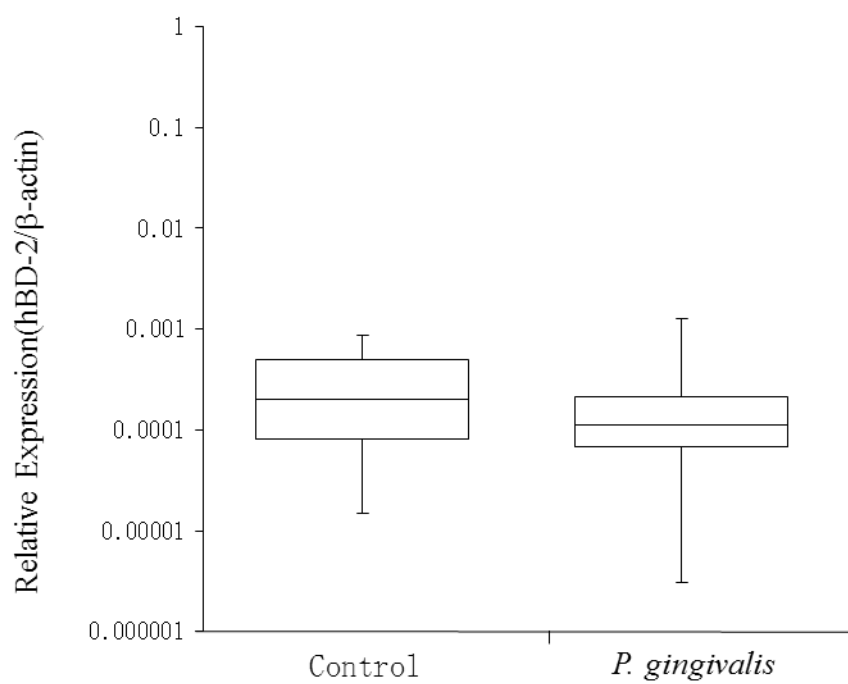


図 3b: 重度慢性歯周炎におけるhBD-2発現

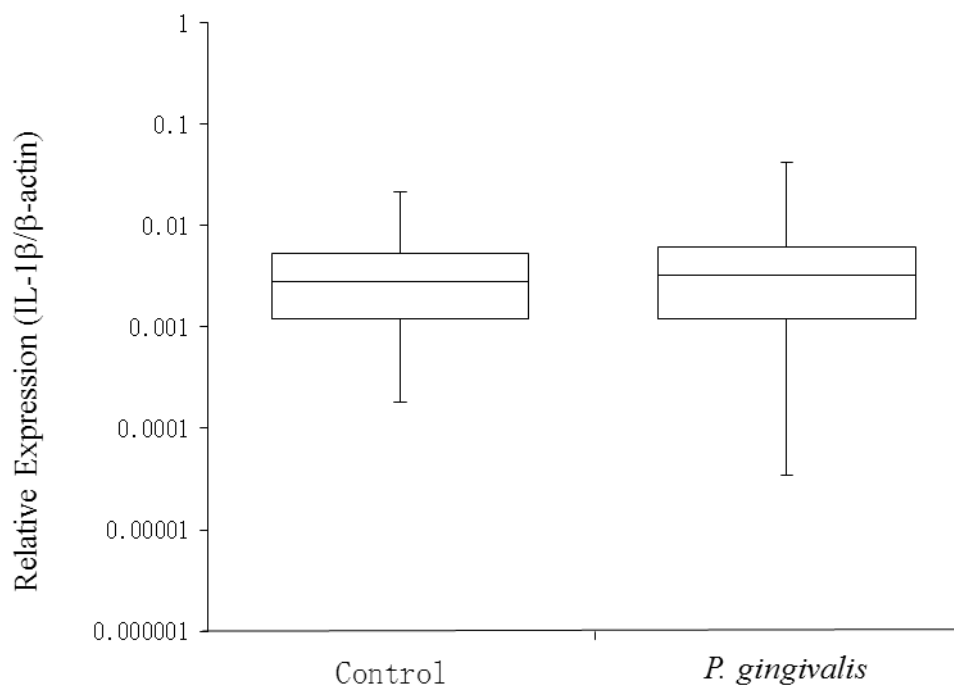


図 4a: 軽・中等度慢性歯周炎におけるIL-1 β 発現

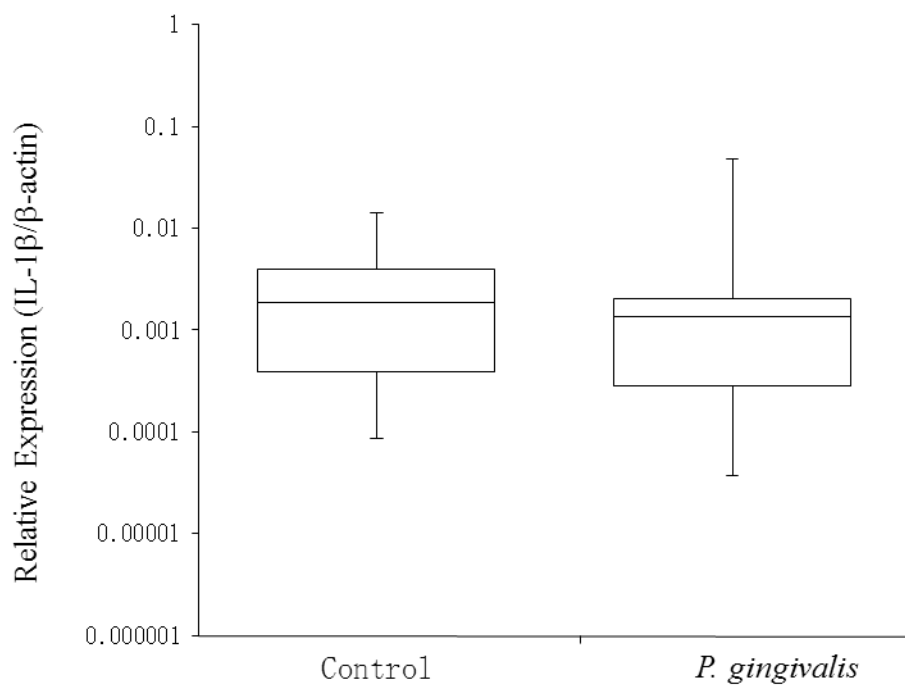


図 4b: 重度慢性歯周炎におけるIL-1β発現

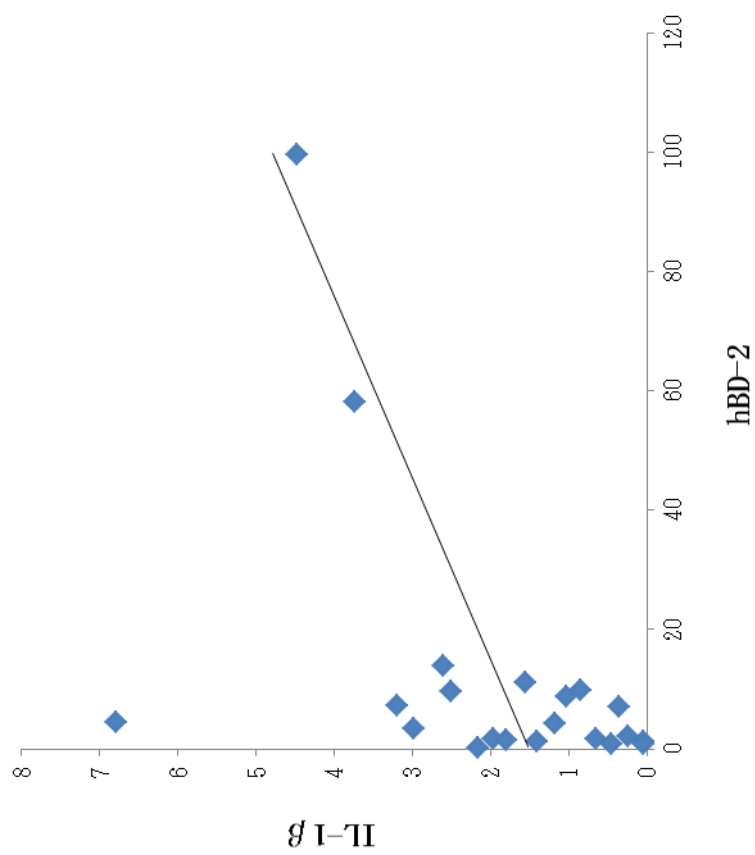


表 1: hBD-2 と IL-1 β の重症度の違いによる発現パターン

	Expression patterns of hBD-2 and IL-1 β after the stimulation	Total			
			$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\downarrow / \downarrow\uparrow$	$\downarrow\downarrow$
Slight-to-moderate chronic periodontitis group	N	12	9	0	21
	%	80.0%	60.0%	0.0%	52.5%
Severe chronic periodontitis group	N	3	6	10	19
	%	20.0%	40.0%	100.0%	47.5%
Total	N	15	15	10	40
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

軽・中等度慢性歯周炎においてhBD-2 と IL-1 β 発現がともに増加($\uparrow\uparrow$)したが、
 重度慢性歯周炎においてhBD-2 と IL-1 β 発現がともに減少($\downarrow\downarrow$)した。

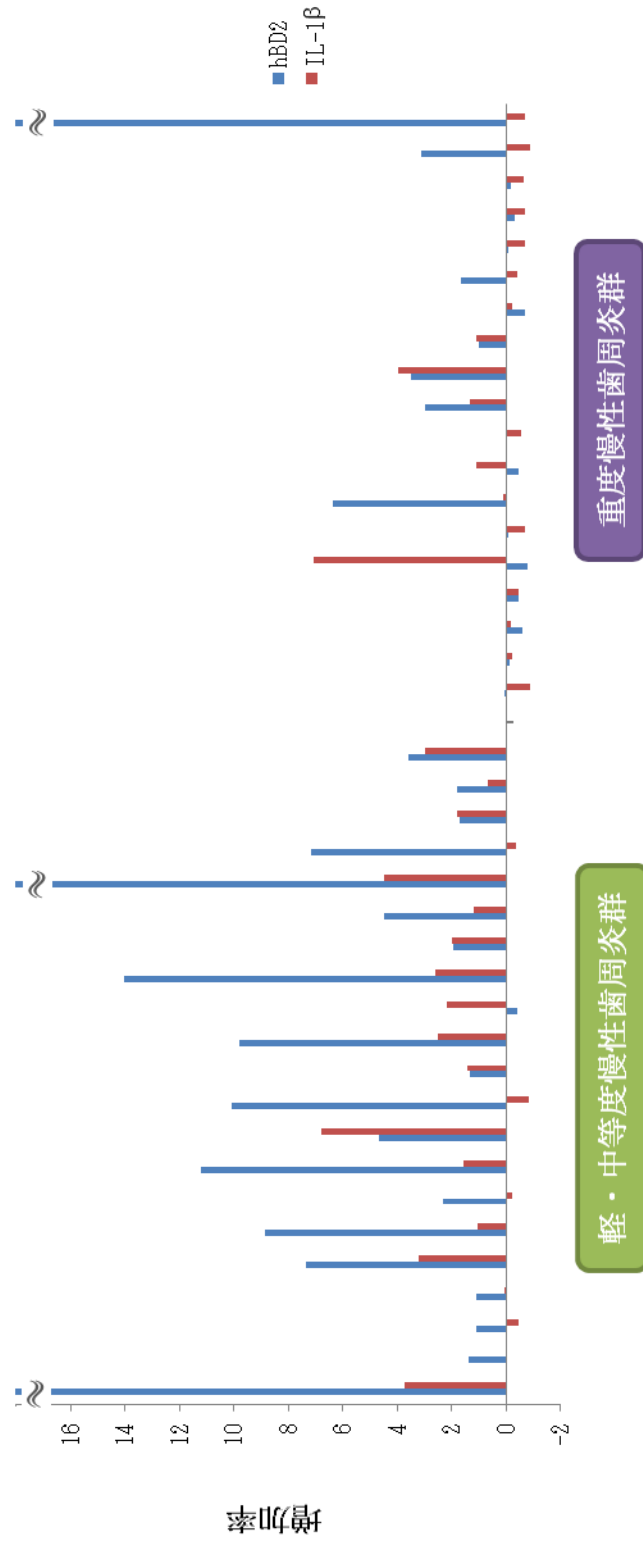


図 6: hBD-2 と IL-1β 発現の増加率の比較