

別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	宗永 修一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> によって増悪した関節リウマチモデルマウスにおける補体因子 C5a を介した増悪メカニズムの解明			
論文審査担当者			
主査教授	谷本 幸太郎	印	
審査委員 教授	杉山 英二		
審査委員 准教授	宮内 睦美		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎は歯周病原細菌の感染によって引き起こされる慢性炎症である。近年、歯周炎と全身疾患との関連が多数報告されている。関節リウマチ (RA) は関節の腫脹、疼痛を伴う炎症性自己免疫疾患である。RA は peptidylarginine deiminase (PAD) で生成されたシトルリン化蛋白 (CP) と、特異的自己抗体である抗環状シトルリン化蛋白抗体 (ACPA) の出現を特徴とする。歯周病原細菌である <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg) は現在知られている細菌の中で唯一 PAD を持ち、CP 生成に関与するため、RA との関連が示唆されてきた。しかし、Pg は PAD 以外の病原因子を数多く有しており、他の因子が RA 増悪に関与している可能性もある。Pg の産生するプロテアーゼである gingipain は、補体因子 C5a の生成を介して補体経路の一部を調整し、免疫反応を制御することが報告されている。補体は宿主の防御機構において重要な役割を果たすが、過度な補体の活性化は炎症を増強し組織傷害を引き起こす。補体因子の中でも C5a の炎症誘導能力は高く、歯周炎と RA においても病態増悪に関与することも報告されている。そこで、本研究では Pg 口腔投与 RA モデルマウスならびに RA 患者血清を用いて、C5a に着目し、Pg 感染の関節リウマチ増悪メカニズムを検討した。</p> <p>Pg 口腔投与 RA モデルマウス確立には SKG マウスを用いた。SKG マウスに laminarin (LA) 10mg を腹腔投与し関節炎を誘導した。Pg W83 (ATCC から購入) 10<sup>8</sup>CFU を 2% carboxymethyl cellulose 含有 PBS 50μl に懸濁後、綿球に含ませ 3 日おきに口腔内に留置した。マウスは、対照群 (Ctrl 群)、LA 投与群 (LA 群)、Pg 投与群 (Pg 群)、Pg および LA 投与群 (Pg/LA 群) の 4 群に分け、実験開始 6 週後に解析した。歯周炎の評価項目である血清中の抗 Pg 抗体価ならびに歯槽骨吸収の程度は Pg 群、Pg/LA 群で有意に高かった。関節炎の程度は Arthritis Score (AS) で、足関節の炎症細胞浸潤ならびに軟骨破壊を組織学的観察で、骨破壊を micro-CT で、血清 IL-6 量、ACPA および MMP-3 量を ELISA で評価した。Pg/LA 群は他群と比較し、AS の有意な上昇、足関節の高度な炎症細胞浸潤および軟骨破壊、ならびに足関節を構成する距骨の骨破壊の亢進を認めた。また、血清中の IL-6 量、ACPA、および MMP-3 量は有意に高かった。以上のことから Pg 口腔投与によって</p>			

関節炎が増悪することが示唆された。

次に Pg 口腔投与 RA モデルマウスにおける C5a の発現を検討した。C5a 関連項目として肝臓での C5 mRNA 発現を qRT-PCR 法で、血清中の C5a 量を ELISA で、関節での C5a 産生を免疫染色法で評価した。Pg 群、Pg/LA 群では肝臓の C5 mRNA 発現は有意に高かった。また、血清中の C5a 量の増加を認めた。Pg/LA 群における AS ならびに血清中の抗 Pg 抗体価は血清 C5a 量と正の相関を認めた。関節での C5a 産生量は、Pg/LA 群は他群と比較し有意に高かった。また C5a は骨破壊部位に近接して存在していた。以上のことから Pg 感染によって C5a が血中ならびに関節局所で増加し、RA の増悪に関与していることが示唆された。

Pg 口腔投与 RA モデルマウスにおいて Pg/LA 群で骨破壊が亢進していたことから、C5a が骨破壊に関与していると仮説を立てた。それゆえ、C5a が破骨細胞分化に及ぼす影響を被験マウスから採取した血清を用いて検討した。SKG マウスの大腿骨から比重遠心法を用いて骨髄由来単球細胞画分を分離して、sRANKL 50 ng/ml と M-CSF 20 ng/ml を添加した  $\alpha$ -MEM 培地に被験マウスの血清を添加して培養した。破骨細胞分化は TRAP 染色法ならびに pit formation assay によって評価した。Pg/LA 群から採取した血清を添加すると骨吸収能を有した破骨細胞が多数誘導された。また抗 C5a 抗体添加によって骨吸収能を有した破骨細胞は有意に減少した。

広島大学病院リウマチ膠原病科を受診した RA 患者血清を用いて、種々の歯周病原細菌に対する血清抗体価と血清 C5a 量を ELISA で解析した。抗 Pg 抗体陽性患者群は陰性患者群と比較し血清 C5a 量が有意に高かった。他の歯周病原細菌に対する血清抗体陽性患者群と陰性患者群では血清 C5a 量の有意な差はなかった。Pg は他の歯周病原細菌と比較し C5a 産生に関与していることが示唆された。

以上の結果から本論文において Pg 感染によって増加した C5a が破骨細胞分化を促進することで関節炎の増悪に関与することが示唆された。本研究は歯周炎と RA の両疾患において C5a を標的とした新しい検査法や治療法の開発に貢献できる基礎研究である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が宗永 修一に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	宗永 修一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> によって増悪した関節リウマチモデルマウスにおける補体因子 C5a を介した増悪メカニズムの解明			
最終試験担当者			
主査教授	谷本 幸太郎	印	
審査委員 教授	杉山 英二		
審査委員 准教授	宮内 睦美		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
<p>上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 29 年 11 月 1 日の第 4 回広島大学研究科発表会 (歯学) 及び平成 30 年 2 月 1 日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 Pg 以外の歯周病原細菌を SKG マウスに投与した際の関節炎の状態について</li> <li>2 Pg 口腔投与モデルが腹腔投与モデルより優れていると考える理由について</li> <li>3 血清中および関節局所で増加した C5a の産生源について</li> <li>4 Pg 口腔投与 RA モデルマウスにおいて増加した C5a が全身および歯周組織に及ぼす影響について</li> <li>5 RA 患者の血清中 C5a 量と ACPA などの RA の臨床マーカーとの関連について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			