

論文内容の要旨

論文提出者氏名 西垣 勝

論文題目

β -Cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligaments cells.

論文内容の要旨

【緒言】歯周病の原因は、細菌感染だけでなく、ブラキシズム・咬合性外傷などの非細菌感染であるメカニカルストレス (MS) も関与している。これらの原因により歯周組織を破壊する歯周病は発症すると考えられている。歯周組織の破壊を抑制するためには、歯周病の治療だけでなく予防も必要である。この予防には、細菌感染・非細菌感染により生じる歯根膜の炎症や骨吸収を抑制することにより成し遂げられる。この為、歯根膜の特性を解明することが肝要である。これまでにわれわれは、ヒト歯根膜 (h-PDL) 細胞が歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対して多くのサイトカインを産生し、歯根膜に影響を与えることを報告した。さらに、生理的咬合圧と同等の MS は、歯根膜に対してサイトカイン産生誘導能を有する。

β -クリプトキサントシン (以下、 β -cry) は野菜や果実の成分であるカルテノイドの一種である。 β -cry は歯槽骨吸収を抑制すると報告されているが、この分子メカニズムは未だ明らかではない。本研究において、我々は β -cry が h-PDL 細胞における骨吸収に関連するサイトカイン産生に与える影響について検討を加えた。

【材料と方法】 β -cry は、Uchiyama らの報告に従い、最終濃度を 1×10^{-7} mol/l に調整した。h-PDL 細胞は、便宜抜歯により得られた健康に正常に萌出した上顎智歯から採取した。初代培養後に 3 から 4 代継代したものを h-PDL 細胞とした。歯周病原菌は、偏性嫌気性グラム陰性桿菌 *P. gingivalis* ATCC 33277 を使用し、5% 羊血寒天培地 (ニッスイ, 東京) 上で嫌気培養、 1×10^6 CFU/ml に調整された。h-PDL 細胞は、静水圧負荷装置内に静置し、MS (1 ないし 6MPa, 60 分間) を負荷 (MS 群)、または、*P. gingivalis* 刺激 (細菌群) を行った。 β -cry は MS 群、細菌群ともに添加され、24 時間培養した。サイトカインの発現と産生量の検討は、インターロイキン (IL) -1 β , IL-6, IL-8, TNF- α (腫瘍壊死因子), オステオプロテグリン (OPG), NF κ B 活性化受容体リガンド (RANKL) に対して RT-PCR 法および ELISA を用いて分析した。また、倒立位相差顕微鏡を用いて、 β -cry 添加と β -cry 非添加

における MS 群および細菌群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

【結果】h-PDL 細胞に β -cry 添加後、IL-1 β , IL-6, IL-8, そして TNF- α mRNA の発現は認められなかったが、*P. gingivalis* 刺激後、これらサイトカイン mRNA の発現が認められた。一方で、6MPa の MS 負荷後、IL-6, IL-8 mRNA の発現が認められた。さらに、 β -cry 負荷により、*P. gingivalis* に対する h-PDL 細胞の IL-6, IL-8 産生量は有意に減少した。それ以上に、 β -cry が MS に対するそれらサイトカインの産生能を有意に減少させた。また、 β -cry は、h-PDL 細胞の形態学的な変化、variability に影響を与えなかった。RT-PCR を用いて、h-PDL 細胞に β -cry 添加後、RANKL と OPG mRNA 発現を調査し、 β -cry が骨吸収に与える影響に検討を加えた。その結果、RANKL mRNA 発現は認められなかったが、OPG mRNA 発現は認められた。また、ELISA を用いて、蛋白レベルで OPG 産生量を分析した。OPG の蛋白レベルは、6MPa の MS と同様に β -cry により有意に増強された。

【考察】本研究では、歯周病に対する β -cry の抗炎症効果に着目し、 β -cry が MS および歯周病原菌のサイトカイン産生に与える影響を比較検討した。本研究では、MS の負荷時間を 1 時間、MS の強さを生理的な咬合圧 (6.1 \pm 0.4MPa) に近似した 6MPa に設定した。本研究のような h-PDL 細胞に対して、生理的な咬合圧に匹敵する強さの MS を負荷した報告はみられない。また、h-PDL 細胞は、Scheres らの報告と同様に、歯周病原菌である *P. gingivalis* に対して炎症性サイトカインを産生した。次に、 β -cry が *P. gingivalis* や MS による IL-6 や IL-8 産生を有意に減少させた。これにより、 β -cry は歯周病に対する抗炎症作用があることが示唆された。また、本研究において、われわれは、 β -cry が RANKL ではなく OPG 産生を増強することを実証した。これらの結果より、 β -cry による歯周病における骨吸収予防が示唆された。

結論として、h-PDL 細胞において、 β -cry は MS や歯周病原菌による炎症性サイトカイン産生を調節した。さらに、 β -cry は、OPG 産生を増幅させた。これらの結果より、 β -cry は歯周病による骨吸収を予防することが示唆された。しかしながら、Yoshitake らの報告によれば、IL-6 が直接的に RANK シグナリング過程を制御することにより破骨細胞分化を抑制する。このように、破骨細胞生成に対して β -cry が影響を及ぼすことを明確にするさらなる研究が必要である。