

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	中西 惇
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Anti-inflammatory effects of phosphophoryn (象牙質基質タンパク質 phosphophoryn の抗炎症機能)			
論文審査担当者			
主査	教授	香西 克之	印
審査委員	教授	杉田 誠	
審査委員	准教授	宮内 睦美	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>齲蝕，アブフラクション等，歯の硬組織疾患によってエナメル質，象牙質が欠損し象牙質表層が口腔内に露出すると，象牙細管を通じて歯髄組織が口腔内常在細菌および温熱刺激などにさらされる。しかしながら，これらの刺激に曝露された歯髄において，歯髄炎が必ずしも発症するとは限らず，自発痛や冷温水痛などの症状がない状態で経過をたどることが臨床的に多く認められる。このことは，反応性象牙質形成による歯髄組織の物理的保護のみならず，初期炎症反応を抑制する因子が歯髄組織や象牙質内に存在することを意味する。</p> <p>Phosphophoryn (PP) はプロテアーゼによる Dentin sialophosphoprotein の分解によって生じる象牙質や歯髄組織に最も多量に存在する非コラーゲンタンパク質である。PP はセリン-セリン-アスパラギン酸 (serine/asparatic acid rich repeats: SDrr) の長い繰り返し配列を含み，この配列中のセリンが高度にリン酸化修飾を受けることから象牙質の石灰化に中心的な役割を果たしている。そこで，象牙芽細胞から分泌され，象牙質と歯髄組織の細胞外基質中に存在する PP が硬組織形成に加えて，抗炎症作用によって歯髄組織の恒常性維持を担う炎症抑制因子であると仮説し，PP の抗炎症作用を明らかにする本研究を着想した。</p> <p>PPとして，組み換え PP (rPP) を用いた。rPP の精製は，6xHis タグ付き組み換えタンパク発現用 293EBNA 細胞から回収した培養上清中から液体クロマトグラフィー AKTA10S システムを併用した陰イオンクロマトグラフィーおよび his-tag アフィニティークラムを用いて行った。ステインズオール染色から，本研究で精製した組み換え PP は従来法で精製したものと比較し高純度であることが判明した。</p> <p>引き続き，LPS 誘導性 <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> 炎症モデルを用いて rPP の抗炎症作用を明らかにするために，精製した rPP を用いて，以下の 1. から 4. について検討した。</p> <p>1. LPS 刺激マクロファージに対する rPP の抗炎症作用：マクロファージ様細胞へ分化誘導した THP-1 細胞を 10% FBS 存在培地で 24 時間培養した後，無血清培地に変更し，10 ng/ml の LPS と 0.1-1μM の rPP を添加した。24 時間後に細胞から mRNA，培養上清，を回収し，TNF-α，IL-1β，IL-8 の各種炎症性サイトカイン遺伝子発現をリアルタイム PCR，培養上清中の TNF-α 量を ELISA 法によって測定した。rPP は LPS によって亢進した各種炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制し，また，LPS による TNF-α 量の増加を有意に減少させた。</p> <p>2. rPP による LPS 活性の抑制機構：rPP の THP-1 細胞内外の局在を rPP 投与 0.5-12 時間後に，抗 PP 抗体を用いた Western Blotting 法によって調べた。また，ビオチン化 LPS を用いた solid phase binding assay によって，LPS と rPP の直接的相互作用を解析した。さらに，投与された rPP と LPS 受容体である TLR4 の細胞膜上の局在を蛍光免疫染色で調べた。rPP は細胞ライセート分画で検出され，そのシグナルは時間依存的に増強した。また solid phase binding assay は rPP と LPS との直接的な結合作用を示した。rPP は THP-1 細胞の細胞膜近傍に局在しその一部は TLR4 と共局在を示す像が観察された。</p>			

3. 敗血症モデルマウスにおける rPP の抗炎症作用: 6-8 週齢の C57BL/6JJcl マウスの腹腔内に rPP 0.1 μ mol/kg を投与した。1 時間後に D-Galactosamine (D-GalN) 800mg/kg, LPS 1 μ g/kg を腹腔内投与し敗血症を惹起させ、致死率を経時的に計測した。さらに、投与後 7.5 時間に安楽死させたマウスから肝臓を摘出し、組織学的に観察するとともに、各種炎症関連サイトカイン (*TNF- α* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-1 β*) の mRNA 発現を調べた。rPP 前投与は D-GalN/LPS 誘導性の致死率を有意に抑制した。rPP 投与群において D-GalN/LPS 投与による肝臓の鬱血、肥大所見および、H-E 染色から肝小葉の細胞配列の崩壊が改善されていた。また、rPP 投与は D-GalN/LPS 投与により亢進した肝臓中の各種炎症関連サイトカイン遺伝子発現を有意に抑制した。

4. rPP の抗炎症機能領域の探索: SDrr 長を種々の長さに短縮した改変型 rPP を用いて、SDrr 長が PP の炎症抑制効果に及ぼす影響を検討した。*in vivo* 炎症モデルにおける致死率は SDrr の長さに依存し改善したが、*in vitro* 炎症モデルにおいては SDrr の長さは抗炎症作用に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、PP が抗炎症作用を有していることが明らかとなったことから、PP は抗炎症作用と硬組織誘導能によって歯髓の恒常性維持に関与していることが示唆された。この二つの作用を有する PP は覆髓剤としての有用性が期待される。さらに、PP が生体内において炎症制御因子として機能している可能性が示唆された。

本論文は象牙質基質タンパク質である PP が、象牙質形成作用に加えて、抗炎症作用を有していることを初めて明らかにした。このように、PP は歯髓保存に必要な二つの作用を有する歯髓炎治療薬のシーズ候補であり、実用化が期待できることから、歯内療法学の発展に多に寄与すると考えられ、高く評価される。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が中西 惇に博士（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	中西 惇
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Anti-inflammatory effects of phosphophoryn (象牙質基質タンパク質 phosphophoryn の抗炎症機能)			
最終試験担当者			
主査	教授	香西 克之	印
審査委員	教授	杉田 誠	
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30年9月19日の第2回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月6日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試験を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 組み換え Phosphophoryn(PP)と LPS との結合様式と TLR4 との共局在の意義について 2 PP の持つ抗炎症作用以外の機能について 3 敗血症モデルにおける肝組織の経時的病態変化と HBGM1 発現細胞について 4 組み換え PP の抗炎症機能領域について 5 SDrr の長さ抗炎症機能の関係において <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> で discrepancy を生じる理由について 6 組み換え PP の歯科領域における臨床応用について <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>			