

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	加藤 大喜
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
口腔粘膜上皮細胞の核酸認識と抗菌ペプチドの炎症応答活性化機構			
論文審査担当者			
主査教授	寺山 隆司	印	
審査委員 教授	二川 浩樹		
審査委員 准教授	飛梅 圭		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>口腔粘膜において感染や外傷，放射線治療などにより壊死した細胞から放出される核酸などの Damage-associated molecular patterns (DAMPs) が上皮細胞の受容体を活性化し，炎症応答を誘導することが報告されている。また，様々な種類の核酸が炎症性サイトカインやケモカインの発現に関与しているという報告もある。申請者らは以前，口腔粘膜細胞に核酸を添加することで IL-8 や CXCL10 などの炎症性サイトカインやケモカインの発現が増加することを報告している。このことは口腔粘膜上皮細胞には自己や非自己の核酸を認識し炎症応答を誘導する機構が存在することを示唆している。</p> <p>一方，37個のアミノ酸からなる Cathelicidin 型抗菌ペプチド LL-37 は細菌感染によって上皮細胞や好中球から産生され，唾液中にも存在している。強い抗菌作用を持つだけでなく，創傷治癒や血管新生など様々な生理活性をもつことが知られている。近年では，腸粘膜や皮膚などの炎症性疾患組織における LL-37 の発現の増加が報告されている。口腔領域での炎症性疾患においても健常組織と比較して慢性歯周炎の組織中に LL-37 が有意に発現しているという報告や，口腔扁平苔癬患者の唾液中の LL-37 がステロイド療法によって減少するという報告がある。これらのことから LL-37 は口腔粘膜における炎症応答に何らかの役割を担っていることが考えられる。しかしながら，口腔粘膜における LL-37 と核酸依存性の炎症誘導機構の関連については報告されていない。</p> <p>また，免疫組織化学染色によって LL-37 は様々な皮膚疾患組織や歯周疾患組織中で上皮細胞の細胞質に局在していることが確認されており，このことは細胞質内受容体と LL-37 が関連している可能性を示唆している。申請者らは口腔粘膜細胞にウイルス由来核酸を transfection reagent で導入することによって，細胞内受容体である Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) が核酸を認識し，Interferon regulatory factor 3 (IRF3) Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) 経路を介して IFN-β を誘導することで口腔粘膜の RNA ウイルス感染に対する防御応答を行っていることを報告している。この細胞質内受容体である RIG-I の発現が LL-37 などの抗菌ペプチドによって誘導されるという報告もあるが，細胞質内受容体と LL-37 による炎症応答の関連については未だ解明されていない。</p> <p>そこで本研究では，口腔粘膜上皮細胞の抗菌ペプチド LL-37 による核酸依存性炎症誘導機構と細胞質内受容体の関与を明らかにするため，まず不死化口腔粘膜上皮細胞 (RT7) の自己壊死画分 (Necrotic Cell Supernatants: NCS) を作製し単独添加あるいは LL-37 と同時添加することで，RT7 における炎症応答性遺伝子の発現について検討した。また，様々な構造を有した核酸と LL-37 を添加した際の核酸認識受容体の同定と炎症応答性遺伝子の発現誘導機構の検討を行った。</p> <p>結果を以下に示す。</p> <p>1. RT7 に自己壊死画分を添加することで白血球遊走因子である CXCL10 の発現が増加した。LL-37 は自己壊死画分で誘導された CXCL10 の発現をさらに増加させた。LL-37 誘導</p>			

性 CXCL10 の発現は二本鎖 RNA (dsRNA) 特異的分解酵素を加えることで抑制された。

2.LL-37 は dsRNA である Poly(I:C)や dsDNA である Poly(dA:dT)で誘導される炎症性サイトカインの発現を著しく増加させた。一方, LL-37 のスクランブルペプチドや, 他の抗菌ペプチドでは, 核酸誘導性の CXCL10 の発現に影響は認めなかった。

3.NF- κ B 阻害剤の処理は dsRNA と LL-37 で誘導される CXCL10 の発現を抑制した。また, LL-37 は dsRNA で誘導される NF- κ B のリン酸化を増加させた。

4.Binding assay によって LL-37 が dsRNA, dsDNA と結合親和性をもつことを確認した。Flow cytometry および蛍光顕微鏡によって LL-37 と核酸の複合体が上皮細胞内に導入されることが示唆された。添加により蛍光される細胞について確認した。LL-37 の核酸細胞内導入能は各種エンドサイトーシス阻害剤の中でもクラスリン・カベオラ依存型エンドサイトーシス阻害剤によって抑制されることが認められた。

5.蛍光顕微鏡によって, LL-37 で細胞内導入された核酸と細胞内受容体 RIG-I との結合が観察された。RIG-I のノックダウンにより NF- κ B のリン酸化が抑制され, LL-37 の核酸依存性炎症応答が抑制された。

以上の結果より下記のことが示唆された。1) 口腔粘膜上皮細胞において LL-37 は自己壊死画分中の dsRNA で誘導された CXCL10 の発現を増加させる。2) LL-37 の核酸誘導性の炎症応答に NF- κ B の活性化が関与する。3) LL-37 は核酸と結合しクラスリン・カベオラ依存型エンドサイトーシスによって核酸を細胞内に導入する。4) LL-37 によって細胞内に導入された核酸は細胞内受容体である RIG-I と結合することによって炎症応答が活性化される。

本研究によって抗菌ペプチド LL-37 が口腔粘膜上皮細胞の自己壊死などによって放出される核酸の認識による炎症応答を活性化し, 口腔粘膜の炎症促進に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本論文は, 生体内に存在する抗菌ペプチド LL-37 が核酸依存性の炎症誘導機構を活性化することを実証したものであり, 難治性の口腔粘膜疾患との関連について論じている。論文中に示されたデータは結論を導くために十分であると考えられ, また核酸依存性の炎症誘導機構の解明やその炎症応答を活性化する LL-37 の役割の検討は, 難治性の口腔粘膜疾患の病態把握など臨床応用への可能性が期待できる。

よって審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。