

氏名	中村 亜里紗		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5694号		
学位授与の日付	平成30年3月23日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	真菌二次代謝産物(+)-terrein が <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> 刺激時にヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響の解明		
論文審査委員	大原 直也 教授	仲野 道代 教授	江國 大輔 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病は、歯周病原細菌の感染によって発症する慢性感染症であり、細菌感染に伴う免疫応答によって歯周組織に炎症が惹起され、歯槽骨破壊を生じる炎症性疾患でもある。現行では、感染源除去を主体とした歯周治療が展開されているが、治癒過程は宿主に依存している。炎症の制御が可能となれば、感染の拡大を改善するだけでなく、組織の治癒を促進し恒常性を保つことにも繋がる。そのため、宿主の炎症反応を制御することにより歯周組織治癒や恒常性維持を良好に保つ治療法の開発に注目が集まっている。

歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が、歯肉組織の物理的バリアである歯肉上皮細胞 (human gingival epithelial cells : HGEs) に感染すると、歯周炎症が惹起される。侵襲を受けたHGEsは、抗菌ペプチド産生による殺菌に加え、細胞遊走因子インターロイキン8 (interleukin-8 : IL-8) などのケモカインを産生し、食細胞を引き寄せ、免疫を活性化させる。また、HGEsは、細胞間で生理活性物質を輸送させる細胞接着機構を有しており、細胞間接着因子として存在する zonula occludin-1 protein (ZO-1) とコネキシン (connexin : CX) は、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす。一方、Aaが細胞に付着・細胞内に侵入すると、細胞間接着因子が破壊・解離することによって炎症を惹起するという報告がある。そのため、Aaの感染を制御する薬剤等の研究が必要である。

今回申請者は、真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された低分子化合物(+)-terreinの効果に着目した。これまでの先行知見から、有機化学的に合成された(+)-terreinは抗炎症作用を有することから、HGEsの機能に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、未だ詳細は不明である。

本研究では、HGEsを用いて、(+)-terreinがAa刺激時に生じる炎症反応と細胞間接着機構に及ぼす影響の解明を図った。

【材料と方法】

1. 試薬 : (+)-terrein は L-酒石酸から合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。
2. 細菌の調製 : 細菌は、Aa Y4 株を使用し、37 °C、5 %炭酸ガス存在下で培養した後、波長 660 nm (A₆₆₀) の吸光度を測定し、1,710 × g で 4 °C、20 分間の遠心と洗浄後、100 °C、20 分の加熱処理を行い失活させた。細胞添加時には、菌濃度を multiplicity of infection (MOI) = 1-100 相当に調製して刺激した。
3. 細胞の培養と細胞傷害性の検討 : HGEs は primary human gingival epithelial cells, pooled を用い、100 units/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマイシンを含むメディアム (CnT-PR) を用いて、37 °C、5 %炭酸ガス存在下、95 %湿潤下で培養した。(+)-terrein が HGEs の細胞傷害性に及ぼす影響は、1 × 10⁴ cell/cm² の密度で播種し、(+)-terrein を 0-1,000 μM で添加し 24 時間培養後、MTS 法を利用し検討した。
4. 遺伝子発現の検出 : 12-well plate に 2.0 × 10⁵ cells/cm² (IL-8)、4.0 × 10⁵ cells/cm² (ZO-1, CX43) の細胞

密度で播種し、(+)-terrein (10 μ M) で30分間前処理後、加熱処理したAaをMOI=1-100相当の濃度で刺激した。刺激6時間後に全RNAを回収し、リアルタイムRT-PCR法でIL-8, ZO-1, CX43の遺伝子発現量を評価した。

5. **タンパクの検出**：【Enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA】HGEsを 2×10^5 cells/cm²で播種し培養後、(+)-terrein (10 μ M) で30分間前処理し、加熱処理したAaをMOI=1-10相当の濃度で刺激した。刺激12時間後の培養上清を回収し、IL-8タンパク産生量をELISA法で検討した。【Western blotting：WB】12-well plateに 2.0×10^5 cells/cm² (リン酸化ERK1/2, p38MAPK), 4.0×10^5 cells/cm² (ZO-1, CX43)の細胞密度で播種し、(+)-terrein (10 μ M) で30分間前処理し、加熱処理したAaをMOI=10相当の濃度で刺激した。刺激から5分後(リン酸化ERK1/2, p38MAPK), 12時間後(ZO-1, CX43)に全細胞を回収し、細胞内シグナル伝達因子と細胞間接着因子のタンパク産生量をWB法で評価した。
6. **統計解析**：3群間以上の差の検定にはone-way analysis of variance (one-way ANOVA), 多重比較検定にはTukey/Kramer testを用いた。2群間の検定にはStudent's *t*-testを用いた。p値が0.05未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. HGEsにおける(+)-terreinの細胞傷害性：(+)-terreinは10 μ M以下では細胞傷害性がなかった。
2. Aaが誘導するIL-8発現と(+)-terreinの及ぼす影響：MOI=1-100相当のAa刺激により、HGEsは刺激6時間後のIL-8のmRNA発現量を増加させ(p<0.05), 刺激12時間後の上清中IL-8タンパクの量を増加させた(p<0.05)。一方、(+)-terrein (10 μ M)を添加すると、Aa刺激により亢進されたIL-8mRNA発現とタンパク産生は有意に抑制された(p<0.05)。
3. Aaが接着装置関連タンパク発現に与える影響と(+)-terreinの及ぼす影響：HGEsをAa(MOI=10相当)で刺激すると、刺激6時間後のZO-1およびCX43のmRNA発現は抑制され、刺激12時間後のタンパク発現は低下した(p<0.05)。一方、(+)-terreinを添加すると、Aa刺激時に誘導されるZO-1およびCX43のmRNAおよびタンパク発現低下は抑制された(p<0.05)。
4. HGEsにおけるAaが活性化するMAP Kinaseと(+)-terreinの及ぼす影響：HGEsをAa(MOI=10相当)で刺激すると、刺激5分後のERK1/2およびp38MAPKのリン酸化が亢進した(p<0.05)。一方、(+)-terreinを添加すると、ERK1/2およびp38MAPKのリン酸化は抑制された(p<0.05)。

【考察】

本研究において、(+)-terreinは、HGEsのAa刺激によって誘導されるIL-8の産生を抑制した。また、細胞間接着因子のZO-1とCX43のAa刺激に伴う発現低下を抑制した。さらに、細胞内シグナル伝達因子であるERK1/2とp38MAPKのリン酸化を抑制した。本結果から、(+)-terreinには、HGEsのバリア機能を強化することによって、感染制御および炎症の波及を抑制する効果を有する可能性が示唆された。

(+)-terreinは、歯周病発症初期に関与するとされるAa感染に対し、歯周組織の物理的バリアとして機能するHGEsの機能を制御して抗炎症効果を発揮する可能性がある。近年、歯周病は感染性疾患としての側面よりも、炎症性疾患としての側面に注目が集まっている。すなわち、歯周病原細菌が感染することによって惹起される宿主の炎症反応をいかに効率的に制御できるかが重要である。本研究において、(+)-terreinは、免疫担当細胞を炎症局所に誘導するIL-8の産生を抑制するだけでなく、TJやGJといった細胞間接着に関与するZO-1およびCX43の発現を制御し、細菌の組織内侵入を防げる可能性が示唆される。以上のように歯周病原細菌と初期に対峙するHGEsに対して(+)-terreinが及ぼす効果は高く、新たな歯周病治療薬として応用できる可能性が示唆される。

(+)-terreinは低分子化合物であり、受容体を介さずに細胞膜を通過して細胞内に作用する可能性が高い。そのため、(+)-terreinの標的分子はシグナル伝達分子(ERK1/2およびp38MAPK)に作用できる分子と推察されるが未だ不明である。そのため、今後分子レベルでのさらなる作用機序の検証が必要である。一方、(+)-terreinは有機化学的に合成可能であり、より副作用の少ない新規誘導体を合成することが可能である。そして、安価で簡便に内服可能な新規抗炎症薬への応用が可能と考える。

【結論】

(+)-terrein は HGEs において、Aa 誘導性 IL-8 の産生を抑制し、さらに細胞間接着因子の ZO-1、CX43 の Aa 誘導性発現低下を抑制することで、抗炎症効果を発揮する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周病は、歯周病原細菌の感染によって発症する感染症であり、細菌感染に伴う免疫応答によって歯周組織に炎症が惹起され、歯槽骨破壊を生じる炎症性疾患でもある。近年、感染源除去を主体とした歯周病治療から、宿主の炎症反応を制御することによって歯周組織の治癒や恒常性を保つ治療法の開発に注目が集まっている。

歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が、歯周組織に感染すると歯周炎症が惹起される。歯肉上皮細胞 (human gingival epithelial cells : HGEs) は、侵襲してきた Aa に対して、抗菌ペプチド産生による殺菌に加えて、細胞遊走因子であるインターロイキン 8 (IL-8) などのケモカインを産生し、貪食細胞を引き寄せ免疫を活性化させる。また、HGEs は、細胞間で生理活性物質を輸送させる細胞接着機構を有しており、HGEs の細胞間接着因子として存在する zonula occludin-1 protein (ZO-1) と connexin (CX) は、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす。一方、Aa が細胞に付着・細胞内に侵入すると、細胞間接着機構が破壊・解離することによって炎症を惹起するという報告がある。そのため、Aa の感染を制御しうる薬剤等の研究が必要である。

本研究では、真菌 *Aspergillus terreus* から分離された二次代謝産物である低分子化合物 (+)-terrein の抗炎症効果に着目した。そして、HGEs を用いて、有機化学的に合成した (+)-terrein が Aa 刺激時に生じる炎症反応と細胞間接着機構に及ぼす影響の解明を図った。得られた結果は以下の通りである。

- 1) HGEs における (+)-terrein の細胞傷害性 : (+)-terrein は 10 μ M 以下では細胞傷害性がなかった。
- 2) Aa が誘導する IL-8 発現と (+)-terrein の及ぼす影響 : multiplicity of infection (MOI) = 1-100 相当の加熱処理した Aa の刺激により、HGEs は、刺激 6 時間後の IL-8 の mRNA 発現量を増加させ、刺激 12 時間後の上清中の IL-8 タンパク量を増加させた。(+)-terrein (10 μ M) を添加すると、Aa 刺激によって亢進された IL-8 mRNA 発現及びタンパク産生は抑制された。
- 3) Aa が ZO-1 と CX43 の発現に与える影響と (+)-terrein の及ぼす影響 : HGEs を Aa (MOI=10 相当) で刺激すると、刺激 6 時間後の ZO-1 と CX43 の mRNA 発現量は低下し、刺激 12 時間後のタンパク量も低下した。(+)-terrein (10 μ M) を添加すると、Aa 刺激による ZO-1 と CX43 の mRNA 発現及びタンパク産生の低下を有意に抑制した。
- 4) Aa が活性化する mitogen-activated protein kinase (MAPK) と (+)-terrein の及ぼす影響 : HGEs を Aa (MOI=10 相当) で刺激すると、刺激 5 分後の Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 と p38 MAPK のリン酸化を亢進した。(+)-terrein (10 μ M) を添加すると、Aa 刺激による ERK 1/2 と p38 MAPK のリン酸化は有意に抑制された。

以上のことから、(+)-terrein は、ERK 1/2 や p38 MAPK を介する Aa 誘導性の IL-8 産生を抑制することで抗炎症作用を発揮する可能性が示唆された。また、(+)-terrein は Aa 侵襲による ZO-1 と CX43 の発現低下を抑制することで細胞の恒常性を維持し、歯周病原細菌の組織内侵襲を防ぐ可能性が示唆された。

本研究で得られた結果は、有機化学的に合成された (+)-terrein の HGEs に対する Aa 侵襲に伴う宿主防御反応を制御する薬理作用機序解明の一助となり、今後の新たな歯科治療法の開発・発展に貢献するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認めた。