

ふりがな氏名	えんよう 閔揚
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第1662号
学位授与の日付	令和5年12月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項に該当
学位論文題目	Muramyl Dipeptide (MDP) Regulates the Production of Matrix Metalloproteinase-3 by Human Dental Pulp Fibroblast-like Cells (ムラミルジペプチド (MDP) は、ヒト歯髄線維芽細胞様細胞におけるマトリックスメタロプロテイナーゼ-3の産生を調節する)
学位論文掲載誌	Nano Biomedicine 第15巻 第1号 令和5年6月
論文調査委員	主査 合田 征司 教授 副査 山本 一世 教授 副査 富永 和也 教授

### 論文内容要旨

自然免疫応答は、体の防御の最前線であり、齶蝕による歯髄の炎症調節において重要な役割を果たす。歯髄組織の主な構成要素である歯髄細胞は、パターン認識受容体 (PRR) を発現している。PRR は病原体関連分子パターン (PAMP) と呼ばれる微生物特異的分子を認識して自然免疫応答を惹起する。ヒト歯髄線維芽細胞様細胞 (hDPF) で構成的に発現されるヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン 2 (NOD2) は PRR の 1 種で、PAMPs の 1 種であるムラミルジペプチド (MDP) を感知する。マトリックスメタロプロテイナーゼ-3 (MMP-3) は、急性歯髄炎で豊富に発現し、抗炎症および再生因子として歯髄の治癒におけるメディエーターとして機能する。

本研究では、hDPF の MMP-3 産生における MDP の影響について検討した。

hDPF に 10  $\mu$ g/mL MDP 刺激を加えて 24 時間刺激した。刺激後、フローサイトメーターによる死細胞の測定を行うことで細胞毒性の検討を行った。また、同様の刺激を加えた後に細胞増殖試薬 WST-8 と反応させ細胞増殖能の検討も行った。その結果、MDP は、hDPF に対して細胞毒性がなく、増殖にも影響を与えないことを確認した。次に、hDPF を 12 well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells / well で播種し、各種濃度の MDP で 24 時間刺激した。刺激後に上清を濃縮してサンプルを作成し、MMP-3 の産生をウエスタンブロッティングにて確認した。その結果 MDP 刺激により、hDPF の MMP-3 産生は濃度依存的に増強し、そのピークは 10  $\mu$ g/mL であることを確認した。MMP-3 産生実験と同様に hDPF を播種し、10

$\mu\text{g/mL}$ MDPにて10分間刺激した。ERK1/2のリン酸化をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果MDP刺激は、無刺激のコントロールと比較してERK1/2のリン酸化レベルを増強することを確認した。

以上の結果から、MDP刺激がhDPFからのMMP-3産生を増強する可能性が示唆された。また、その作用のメカニズムにはERK1/2のリン酸化が関与している可能性が示唆された。

### 論文審査結果要旨

歯髄細胞は、パターン認識受容体（PRR）を発現しておりPRRは病原体関連分子パターン（PAMP）と呼ばれる微生物特異的分子を認識して自然免疫応答を惹起する。ヒト歯髄線維芽細胞様細胞（hDPF）で構成的に発現されるヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン2（NOD2）はPRRの1種で、PAMPsの1種であるムラミルジペプチド（MDP）を感知することにより、バクテリアからの歯髄免疫応答を引き起こすことが知られている。

本研究は、hDPFのマトリックスメタロプロテイナーゼ3（MMP-3）産生におけるMDPの影響について検討したものである。

その結果MDP刺激により、hDPFのMMP-3産生は濃度依存的に増強することを確認した。また、ウエスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達経路についての検討においては、MDP刺激が無刺激のコントロールと比較してERK1/2のリン酸化レベルを増強させるとの結果を得た。

以上の結果から、MDP刺激がhDPFからのMMP-3産生を増強する可能性を示唆したこと、またその作用のメカニズムにはERK1/2のリン酸化が関与している可能性を示唆した点において本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語1か国語（英語）について試問を行った結果、合格と認定した。