

ふりがな 氏名	もうたん 毛丹
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 996 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Role of the nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 pathway in the development of periodontitis (歯周炎の発症におけるヌクレオチド結合性多量体ドメイン 1 経路の役割)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Biosciences 第 66 巻 第 号 令和 6 年 月
論文調査委員	主査 合田 征司 教授 副査 沖永 敏則 教授 副査 橋本 典也 教授

論文内容要旨

細菌のペプチドグリカンの構造である γ -D-グルタミル-メソ-ジアミノピメリン酸 (iE-DAP) のレセプターであるヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン 1 (NOD1) は、自然免疫を制御する役割を担っている。iE-DAP は、免疫応答において重要な働きをする転写因子 NF- κ B の活性化を誘導することで様々なサイトカインや抗菌ペプチドの発現を誘導し、自然免疫の活性化に働く事が知られている。しかしながら、ヒト歯肉上皮細胞に対する iE-DAP の影響についてはほとんど知られていない。

本研究ではヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 のサイトカイン産生に対する iE-DAP の影響について検討を行った。

Ca9-22 を 96 well plate に 1.0×10^4 cells / well で播種し、iE-DAP (10 ug/ml) で 24 時間刺激した。刺激後に上清を回収し、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α および GM-CSF の分泌量を ELISA にて確認した。その結果、iE-DAP は IL-8 の分泌を誘導したが、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α および GM-CSF の分泌を誘導しなかった。iE-DAP によって誘導された IL-8 の分泌誘導は、p38 MAPK 阻害剤と ERK1/2 阻害剤 (U0126) によって抑制された。Ca9-22 を 12 well plate に 2.0×10^5 cells / well で播種し、iE-DAP (10ug/ml) で 24 時間刺激した。刺激後に NOD1、IL-1 β 、p38 MAPK、ERK1/2、JNK、IKB- α および NF- κ B p65 をウエスタンブロッティングにて確認した。その結果、iE-DAP は Ca9-22 細胞における NOD1 受容体の発現を誘導した。iE-DAP はプロ IL-1 β のタンパク質発現を引き起こすが細胞外への分泌は行わなかった。また、iE-DAP 刺激後、JNK のリン酸化は変化しなかったが、p38 MAPK と ERK1/2 のリン酸化は増加し、IKB- α の分解も促進した。NF- κ B p65 のリン酸化は変化しなかったが、核内のリン酸化 NF-

kB p65 は増加した。

以上の結果から、iE-DAP はヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 において IL-8 産生を誘導することが示唆された。また、その作用のメカニズムには p38 MAPK と 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

細菌のペプチドグリカンの構造である γ -D-グルタミル-メソ-ジアミノピメリン酸 (iE-DAP) のレセプターであるヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン 1 (NOD1) は、自然免疫を制御する役割を担っている。iE-DAP は、免疫応答において重要な働きをする転写因子 NF- κ B の活性化を誘導することで様々なサイトカインや抗菌ペプチドの発現を誘導し、自然免疫の活性化に働く事が知られている。しかし、ヒト歯肉上皮細胞に対する iE-DAP の影響についてはほとんど知られていない。本論文は、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 のサイトカイン産生に対する iE-DAP の影響について検討したものである。

Ca9-22 細胞における iE-DAP 受容体 NOD1 の発現を調べるため、Western blot 法を行ったところ、iE-DAP の刺激は受容体 NOD1 の発現を増加させたことを確認している。また iE-DAP 刺激後のサイトカインの分泌を検討するため、ELISA 法によりサイトカインの分泌の検討を行ったところ、iE-DAP 刺激による IL-8 の分泌を増加させたが、IL-6、TNF- α 、GM-CSF、IL-1 β の分泌には影響を与えないことが分かった。IL-1 β の分泌に関与する ATP と LPS、PMA をポジティブコントロールとして、Ca9-22 細胞を iE-DAP で刺激したときの IL-1 β の分泌についてさらに検討したところ、いずれの刺激でも Ca9-22 細胞では IL-1 β の分泌を誘導させないことが分かった。加えて、細胞質内におけるプロ IL-1 β の発現を確認したところ、iE-DAP 刺激による pro-IL-1 β の発現を増加させた。さらに、iE-DAP が IL-8 分泌を誘導するシグナル伝達機構をさらに調べるため、p38、ERK1/2 および JNK のリン酸化についても Western blot 法により検討を行った。その結果、iE-DAP 刺激により p38 と ERK1/2 リン酸化が増大したが、JNK のリン酸化は増加させないがわかった。iE-DAP 誘導性の IL-8 分泌に p38 および ERK1/2 経路が関与していることをさらに確認するため、p38MAPK と ERK1/2 の阻害剤を用いて検討した。iE-DAP によって、IL-8 の分泌量は上昇したが、その上昇は阻害剤を添加することで減弱したことを確認している。iE-DAP で細胞質内の NF- κ B と I κ B- α のタンパク質についても Western blot 法により検討している。細胞質内の NF- κ B p65 のリン酸化レベルは減弱し、I κ B- α タンパク質量は減少したことを確認している。核内の NF- κ B p65 リン酸化についても検討を行ったところ、核内の NF- κ B p65 のリン酸化レベルは増強したことを確認している。

実験結果より、NOD1 は p38 MAPK および ERK1/2 経路を通じて、慢性歯周炎における自然免疫の役割を担っていることが解明された。iE-DAP 刺激によって、NF- κ B p65 が活性化し、核内に移行することで、IL-8 の転写活性を促進した可能性が示唆された。本論文は、慢性歯周炎発症時の自然防御機構に関する新たな知見を提供するとともに、慢性歯周炎の治療および予防のための分子標的を明らかにしたものである。

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。