

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)	氏名	Khung Rathvisal
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
<p>An <i>in vitro</i> study on the usefulness of LL37 as a pulp capping material (覆髄剤としての LL37 の有用性に関する基礎的研究)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	高 田 隆	印
審査委員	教 授	香西克之	
審査委員	教 授	谷本幸太郎	
〔論文審査の要旨〕			
<p>覆髄法は、歯髄を保存する術式である。有髄歯は無髄歯と比較し、歯の健康寿命が長いことから、覆髄法は有用な歯内治療である。さらに、覆髄法は抜髄法と比較し、簡単、安価、短期間で行うことができる。しかしながら、現在臨床応用可能な覆髄剤は、細菌感染歯髄に用いた場合、歯髄保存の成功率が低い。したがって、覆髄の成功率を高め、歯髄を保存するためには、細菌の除去能、炎症の制御能、歯髄細胞の活性化能、および組織修復（再生）に不可欠な血管新生能を有する生物学的活性因子による覆髄法の開発が必要である。</p> <p>Cathelicidin ファミリーに属する 18 kDa cationic antimicrobial protein の C 末端側は LL37 と呼ばれる。LL37 は抗菌活性に加えて、LPS 中和作用やヒト皮膚由来上皮細胞のマイグレーション促進など多機能を有する。これまでに LL37 によるう蝕原因細菌に対する抗菌活性や歯髄細胞のマイグレーション促進能が示されている。LL37 を覆髄剤として臨床応用するためには、LL37 の歯髄細胞による血管新生と炎症の抑制（組織破壊抑制）作用をさらに明らかにする必要がある。</p> <p>本研究では、LL37 の覆髄剤としての臨床応用の可能性を検討するために、強力な血管新生因子として知られる血管内皮細胞増殖因子(VEGF)発現に及ぼす LL37 の影響、および炎症惹起に関わる細菌の主要構成成分であるペプチドグリカン(PGN)で刺激された歯髄細胞の組織破壊に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)発現に及ぼす LL37 の影響を調べた。</p>			

LL37 はペプチド合成し、実験に供した。歯髓細胞は、ヒト歯髓組織から組織遊出法によって分離し、6代継代細胞を用いた。

第一に、LL37 が HP cells の VEGF 発現に及ぼす影響を遺伝子およびタンパク質発現レベルで調べた。0 から 24 時間、HP cells に 10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 を作用させた時、3 時間で、VEGF mRNA 発現量が最も増加した。さらに、0.1 から 10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 (作用時間 3 時間) は濃度依存的に VEGF の mRNA 発現を促進した。タンパク質レベルでは、10 $\mu\text{g/ml}$ の LL37 は 24 時間まで時間依存的に培養上清中の VEGF 産生量を増加させた。引き続き、LL37 の VEGF 発現促進に関わる細胞内シグナル因子を探索するために、阻害剤の影響を検討した。ERK キナーゼ阻害剤 (50 μM PD98059) は LL37 によって誘導される VEGF 発現の促進を阻害した。一方、NF- κ B 阻害剤 (10 μM PDTC)、p38 阻害剤 (10 μM SB203580) および JNK 阻害剤 (10 μM SP600125) は、影響を及ぼさなかった。さらに、リン酸化 ERK1/2 発現を調べた結果、LL37 は刺激後 20 分で、リン酸化 ERK1/2 の量を最大に増加させ、この増加は ERK キナーゼ阻害剤によって抑制された。以上のことから、LL37 は ERK を活性化し、VEGF 発現を促進することが明らかとなった。LL37 は血管内皮細胞に直接作用し、血管新生を促進することから、歯髓組織においては、LL37 は血管内皮細胞への直接作用と歯髓細胞から産生された VEGF を介する間接作用によって、歯髓組織の血管新生に関わることが示唆された。

次に、PGN で刺激された HP cells の MMP-1, MMP-2 および MMP-3 mRNA 発現に及ぼす LL37 の影響を調べた。PGN (作用時間 0 から 24 時間) は各種 MMP の mRNA 発現を時間依存的に促進した。HP cells の LL37 による前処理は PGN による MMP-1, MMP-2 および MMP-3 の mRNA レベルの増加を抑制した。ERK キナーゼ阻害剤、p38 阻害剤および JNK 阻害剤も同様に抑制したが、3 つの阻害剤の中で、p38 阻害剤が最も強く抑制した。PGN は刺激後 30 分でリン酸化 p38 の量を最大に増加させた。LL37 は PGN によるリン酸化 p38 量の増加を抑制した。このように、LL37 は PGN によって誘導されたリン酸化 p38 量の増加を抑制することによって、MMP の発現を抑制することが明らかとなった。

これらの結果から、LL37 は歯髓組織において、血管新生促進と歯髓組織破壊抑制に関わることが示唆された。これまでに LL37 のう蝕原因細菌に対する抗菌活性や歯髓細胞の機能活性化作用が示されていることから、LL37 は細菌の除去能、炎症の制御能、歯髓細胞の活性化能、および血管新生能という覆髓剤として必要な性質を有していることが明らかとなった。以上、本論文によって、LL37 が生物学的活性因子を有する覆髓剤になりうる可能性が強く示されたことから、審査委員会委員全員は本論文が博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値があることを認めた。