

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	吉田 和真
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Reversible binding of heparin to high-dose LL37 eliminates its cytotoxicity with undiminished antimicrobial and LPS-neutralizing abilities (Heparin との可逆的な結合は抗菌活性および LPS 中和能を減弱することなく、高濃度 LL37 の細胞障害性を改善する)			
論文審査担当者			
主査	教授 寺山 隆司	印	
審査委員	教授 谷本 幸太郎		
審査委員	教授 藤井 万紀子		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯内疾患の主原因は細菌である。口腔内細菌や産生物が歯髄組織に侵入し、炎症を引き起こす。またマウスにおいて、リポ多糖（LPS）の歯髄への塗布によって根尖性歯周炎が惹起される。このように、LPS は歯内疾患発症の重要な因子であることから、抗菌活性に加えて LPS 中和能を有する薬剤は歯内治療への応用が期待される。</p> <p>LL37 は Cathelicidin family に属する陽性帯電の抗菌ペプチドで、陰性帯電の細菌細胞膜に誘引され、細胞膜に孔をあけることによって抗菌力を発揮する。抗菌活性に加え、LL37 は LPS 中和能を持つため、歯内疾患治療薬の候補であると考えられる。一方で、高濃度 LL37 は細胞障害性を示す。そのため、LL37 を歯内疾患治療薬として用いるために、抗菌活性と LPS 中和能を有しつつ、細胞障害性のない LL37 の開発が必要である。</p> <p>本研究では、LL37 が陰性荷電のグリコサミノグリカン（GAGs）と電気的に結合することに着目し、GAGs と LL37 の複合体を作製し、その複合体が歯内疾患治療薬として必要な活性を有しているかどうかを以下の方法で検討した。</p> <p>1. LL37 の抗菌活性：大腸菌を LL37 で刺激した後、寒天培地に播種し、コロニー形成単位（CFU）によって抗菌活性を調べた。2. LL37 の細胞障害様式：ヒト歯髄細胞、ヒト骨肉腫様細胞およびヒトマクロファージ様細胞を血清存在下で 24 時間培養し、引き続き、24 時間無血清条件下で培養した後、LL37 を加えた。添加 24 時間後、MTT, LDH, Caspase 3/7 の各 assay によって、細胞生存、細胞膜傷害性、アポトーシスを評価した。3. GAGs が LL37 に与える影響：LL37 と種々の GAGs, あるいは heparin-agarose beads を混和したものをそれぞれ GAG-LL37 複合体, heparin-LL37 agarose beads として実験に用い、抗菌活性と細胞障害性を調べた。4. GAGs, LL37 および LPS の会合：GAG-LL37 複合体を非変性・変性条件下で SDS-PAGE に展開し、ウエスタンブロッティング（WB）によって GAGs と LL37 の結合を調べた。また、heparin-LL37 agarose beads に LPS を加え、beads に残った LL37 の量を WB によって比較した。さらに、heparin または LL37 を固相化した固相法 assay によって LPS との会合を検討した。5. heparin-LL37 agarose beads の LPS 中和能：マクロファージ様細胞を LPS 単独または beads とともに刺激した際の炎症性サイトカイン発現を ELISA 法と RT-PCR 法によって調べた。</p> <p><結果>1. 1.0 μM 以上の LL37 で大腸菌の CFU は 0 になった。2. LL37 は濃度依存的に供試細胞の生存率を低下させ、LDH 放出量を増加させたが、アポトーシス活性を増加させなかったことから、LL37 の細胞障害性は細胞膜傷害に起因することが判明した。3. 供試した GAGs の中で heparin が最も有用であることが判明した。すなわち、口腔内細菌</p>			

菌である *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans* に対する抗菌活性を妨げず、細胞障害性を改善する heparin と LL37 の特定の混合比 (2~6 µg/ml heparin-10 µM LL37) が存在した。4. Heparin と LL37 は直接的に結合していた。LPS は、heparin ではなく LL37 と直接的に会合した。LPS との会合によって heparin-LL37 複合体は LL37 を遊離した。5. Heparin-LL37 agarose beads から遊離された LL37 は LPS (1 µg/ml) によって誘導される TNF-α 産生および *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* 遺伝子発現を抑制した。

以上の結果から、LL37 と可逆的に結合した heparin は LL37 の細胞障害性を低減し、抗菌活性と LPS 中和能を抑制しないことが明らかとなった。さらに、LL37 の細胞障害性低減は、高濃度投与を可能とすることから、より強い抗菌活性と LPS 中和能を発揮できると考えられた。このように、heparin-LL37 複合体は歯内疾患の感染と炎症制御に有用であることが示唆された。

本論文は、LL37 を heparin と結合させ、抗菌活性を維持しつつ、宿主細胞に対する細胞障害性を減弱させることを実証したものであり、将来的に歯内療法への応用について論じている。論文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 LL37 の臨床応用への可能性が認められた。

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あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	吉田 和真
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Reversible binding of heparin to high-dose LL37 eliminates its cytotoxicity with undiminished antimicrobial and LPS-neutralizing abilities （Heparin との可逆的な結合は抗菌活性および LPS 中和能を減弱することなく、高濃度 LL37 の細胞障害性を改善する）			
最終試験担当者			
主査	教授 寺山 隆司	印	
審査委員	教授 谷本 幸太郎		
審査委員	教授 藤井 万紀子		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年9月19日の第2回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月1日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
<ol style="list-style-type: none"> 1 実験に使用したヒト歯髄細胞の由来について 2 LL37 を Heparin に固定させる目的について 3 実験に使用した大腸菌への導入遺伝子について 4 LL37 の構造，細胞に対する作用，全身投与した場合の影響について 5 歯髄細胞とともにヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株を用いた理由について 6 LL37 と Heparin の至適混合比について 7 LL37 と Heparin-LL37 complex の抗菌作用と細胞障害性における作用の違いについて 8 LL37 の細胞障害性の細胞種による違いについて（細胞膜傷害とアポトーシス） 9 Heparin-LL37 complex の臨床応用について 			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			