

## 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 | 坂本 真一 |
| 学位授与の条件  | 学位規則第 4 条第 ① 2 項該当 |    |       |
| 論文題目<br><i>Porphyromonas gingivalis</i> 菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎関連肝癌の発生や進行を促進する   |                    |    |       |
| 論文審査担当者  |                    |    |       |
| 主査   | 教授 柴 秀樹            | 印  |       |
| 審査委員   | 教授 兼松 隆            |    |       |
| 審査委員   | 教授 吉子 裕二           |    |       |
| 〔論文審査の結果の要旨〕   |                    |    |       |
| <p>非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic Steatohepatitis; NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型の 1 つで、アルコール多飲、ウイルス感染や免疫学的異常などの要因が関わらないものと定義されている。NASH は進行性疾患でその 10~20% が肝硬変や肝癌に移行すると言われている。これまでに、高脂肪食 (high fat diet; HFD) 誘導 NASH マウスモデルを用い、<i>P.g.</i> 菌性感染が肝臓の脂肪沈着の程度を増強し、炎症細胞浸潤や線維化を促進することで NASH の病態を増悪させることが報告されている (Furusho H <i>et al.</i> 2013)。しかしながら <i>P.g.</i> の菌性感染と肝癌の発生や進行との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では、<i>P.g.</i> 菌性感染が NASH 関連肝癌の発生や進行に関与するかどうかを明らかにするため、以下の実験を行った。</p> <p><i>P.g.</i> 菌性感染が NASH 関連肝癌の発生や進行に及ぼす影響を明らかにするために、HFD 誘導 NASH 関連肝癌マウス (C57B1/6J) モデルを用いた検討を行った。このモデルでは、HFD を 60 週投与することにより約半数の動物に肝腫瘍が発生することが報告されている。本実験では、マウスに HFD を 8 週間投与し、その半数に <i>P.g.</i> を菌性感染させ (HFD-<i>P.g.</i> (+), HFD-<i>P.g.</i> (-))、60 週後の肝臓における腫瘍の発生状況を評価した。また、普通食 (CD) 飼育、<i>P.g.</i> 非感染マウス (CD-<i>P.g.</i> (-) 群) の肝臓を陰性コントロールとして評価した。その結果、感染 60 週において、HFD-<i>P.g.</i> (-) 群では 61.5%、CD-<i>P.g.</i> (-) 群では 11.1% に腫瘍が観察されたのに対し HFD-<i>P.g.</i> (+) 群では全例に腫瘍形成を認め、<i>P.g.</i> 菌性感染によって腫瘍の発生が有意に促進されていることが明らかになった。また、腫瘍の大きさや数について検討したところ、HFD-<i>P.g.</i> (+) 群では他群と比較し腫瘍径の有意な増大を認め、腫瘍の数も CD-<i>P.g.</i> (-) 群より有意に増加していた。さらに、組織学的解析では、腫瘍内に癌化を示すマウスの割合は CD-<i>P.g.</i> (-) 群では 0%、HFD-<i>P.g.</i> (-) 群では 7.7% であったのに対し、HFD-<i>P.g.</i> (+) 群では 33.3% と高値であり、<i>P.g.</i> 菌性感染によって癌の発生率も有意に高い値を示すことが明らかとなった。</p> <p>次に、<i>P.g.</i> 菌性感染が NASH 関連肝癌の発生や進行を促進する分子メカニズムを明らかにするために以下の検討を行った。</p> <p>1) <i>P.g.</i> 感染肝細胞、非感染肝細胞における網羅的プロテオーム解析による検討の結果、155 のタンパクが <i>P.g.</i> 感染肝細胞にのみ検出された。その発現量の多いタンパクに integrin <math>\beta 1</math> シグナル伝達分子で、肝癌発生や進行への関与が報告されている Focal adhesion kinase (FAK) が検出されたため、<i>P.g.</i> 感染肝細胞における integrin <math>\beta 1</math> シグナルタンパク発現をウエスタンブロット法にて確認した。<i>P.g.</i> 感染肝細胞では FAK, AKT, ERK のリン酸化亢進が認められ、FAK, AKT のリン酸化亢進は siRNA を用いた integrin <math>\beta 1</math> のノックダウン細胞では、抑制された。マウス肝組織において、同様に integrin <math>\beta 1</math> シグナルタンパク発現をウエスタンブロット法で調べたところ、HFD-<i>P.g.</i> (+) 群</p> |                    |    |       |

で FAK、AKT、ERK の活性化傾向を示した。これらの結果から、肝細胞に *P.g.* が感染すると integrin  $\beta 1$  経路の活性化を介して肝癌の発生や進行に関与する可能性が示唆された。

- 2) integrin  $\beta 1$  シグナルが肝細胞の増殖、アポトーシス、遊走に及ぼす影響を明らかにするために、*P.g.* 感染ならびに非感染肝細胞の細胞数を計測するとともに、ドキシソルビシン (DOX) の誘導するアポトーシス関連因子発現に対する *P.g.* 感染の影響をウエスタンブロット法にて検討した。遊走能については wound healing assay を用いて検討した。その結果、*P.g.* 感染によって増殖能が有意に上昇し、DOX の誘導する PARP や caspase-3 の切断阻害によってアポトーシスが抑制され、さらに遊走能が有意に上昇することが示された。また、これらの *P.g.* 感染による影響は integrin  $\beta 1$  のノックダウンにより抑制された。
- 3) NASH 関連肝癌発生には慢性炎症、特に炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の関与が示唆されているため、*P.g.* 菌性感染による NASH 関連肝癌の発生や進行の促進における TNF- $\alpha$  の関与を調べた。非結節部から抽出した組織溶解液を用い、ウエスタンブロット法にて TNF- $\alpha$  発現を確認したところ、HFD-*P.g.* (+) 群で TNF- $\alpha$  の著明な発現上昇が観察された。免疫組織化学的に、HFD-*P.g.* (+) では HFD-*P.g.* (-) 群に比べて、crown-like structure (CLS : 細胞死に陥った脂肪細胞を炎症促進性マクロファージが取り囲み、貪食・処理する組織学的構造) が増加し、多くが強い TNF- $\alpha$  陽性を示した。さらに、ヒトマクロファージ細胞株 (THP-1) を用いた ELISA では、*P.g.* 感染により THP-1 細胞からの TNF- $\alpha$  の産生が有意に増加した。*P.g.* 感染により CLS を構成するマクロファージ から過剰に産生された TNF- $\alpha$  が NASH 関連肝癌の発生や進行に関わると考えられた。

以上の結果より、*P.g.* 菌性感染は integrin  $\beta 1$  経路の活性化による細胞増殖、抗アポトーシス、細胞遊走能の上昇に加え、*P.g.* 感染による CLS を構成するマクロファージからの TNF- $\alpha$  産経路の活性化を介して、NASH 関連肝癌の発生や進行を促進することが明らかとなり、NASH 関連肝癌の予防や進行抑制における *P.g.* を標的とした歯科治療の有用性が示唆される。

以上の結果から、本論文は *P.g.* の NASH 関連肝癌の発生や進行への関与を裏付ける基礎的なデータを提供し、病理学ならびに臨床医学の発展に寄与するところが大きいと高く評価される。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    | 坂本 真一 |
| 学位授与の条件  | 学位規則第4条第①・2項該当 |       |       |
| 論文題目<br><i>Porphyromonas gingivalis</i> 菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎関連肝癌の発生や進行を促進する   |                |       |       |
| 最終試験担当者  |                |       |       |
| 主査   | 教授             | 柴 秀樹  | 印     |
| 審査委員   | 教授             | 兼松 隆  |       |
| 審査委員   | 教授             | 吉子 裕二 |       |
| 〔最終試験の結果の要旨〕   |                |       |       |
| 判定合格   |                |       |       |
| <p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月19日の第6回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月4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。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P.g.</i>)感染 HFD 摂餌マウスモデルにおける肝臓癌発症以外での表現型（体重変化・脂肪蓄積・他の発癌）について</li> <li>2. <i>P.g.</i>菌性感染による肝組織での TNF-<math>\alpha</math> 産生メカニズムについて</li> <li>3. integrin <math>\beta</math> 1 経路に着目した理由について</li> <li>4. in vitro での <i>P.g.</i>/integrin <math>\beta</math> 1 刺激による細胞内シグナル変化が <i>P.g.</i>感染 HFD 摂餌マウスモデル (in vivo) で再現できるかについて</li> <li>5. プロテオーム解析と in vivo のデータとのギャップの解釈について</li> <li>6. siRNA のオフターゲット効果について</li> </ol> <p>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。</p> |                |       |       |