

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	山田 桜
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Development of novel peptide drug against bone destructive diseases (骨破壊性病変に対する新規ペプチド薬の開発)			
論文審査担当者			
主査教授 吉子 裕二		印	
審査委員 教授 津賀 一弘			
審査委員 教授 高田 隆			
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯周炎や関節リウマチでは、炎症局所に破骨細胞が出現し、骨破壊性病変を認める。その結果、歯の脱落や関節の変形が起こり、QOL の著しい低下をきたす。近年、この骨破壊性病変に対し、原因除去療法、サイトカイン療法等、様々な治療法が提案されているものの、いまだ満足できる結果は得られていない。鉄結合性ミルクタンパク質であるラクトフェリン (LF) は母乳、特に初乳に高濃度に含まれており、抗菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などの多彩な機能を有する。申請者のグループは、ウシ LF (bLF) が TRAF6 と結合し、NF-κB ならびに MAPK 経路を阻害することで lipopolysaccharide (LPS) 誘導性の炎症性サイトカインの産生と破骨細胞形成を強く抑制することを報告した。また、bLF のプロテアーゼ消化により得られたペプチドフラグメントの解析から、TRAF6 に結合すると思われる複数のペプチド配列を同定した (未発表)。そこで、本研究では、bLF 由来の TRAF6 結合ペプチド 3 種 (bLF-p1、bLF-p2、bLF-p3) を合成し、それらの抗炎症作用および破骨細胞形成阻害作用を評価し、歯周病による骨破壊性病変に対するペプチド医薬としての可能性を検討した。</p> <p>1. In vitro におけるペプチドの作用</p> <p>1) LPS 誘導性炎症性サイトカインの産生に対するペプチドの影響 Phorbol myristate acetate 処理ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 およびマウス骨髄ストローマ細胞株 ST2 を用い、大腸菌由来 LPS 刺激下の炎症性サイトカインの発現に対する 3 種のペプチドの影響を bLF と比較した。bLF-p2 および bLF-p3 の前処理 (0.02、0.2、2μg/ml) は bLF (1、10、100μg/ml) と比較して同程度 (モル比) に <i>TNFA/Tnfa</i>、<i>IL1B/Il1b</i> および <i>IL6/Il6</i> mRNA レベル、TNFα、IL1β、IL6 の分泌量を抑制したが、bLF-p1 は抑制効果を示さなかった。したがって、以後の検討には bLF-p2 および bLF-p3 を用いることとした。</p> <p>2) LPS 誘導破骨細胞形成に対する bLF-p2 と bLF-p3 の影響 ST2 細胞を LPS で刺激すると、RANKL の発現レベルが上昇し、OPG (TNFRSF11B) は抑制される。そこで、同条件で bLF-p2、bLF-p3 または bLF を前処理したところ、いずれも <i>Rankl</i> mRNA レベルならびに RANKL の分泌量を抑制し、<i>Tnfrsf11b</i> mRNA レベルを回復させた。同様に、これらのペプチド/タンパク質は ST2 細胞とマウス骨髄由来マクロファージの共培養において LPS 依存性の破骨細胞形成を抑制した。さらに、bLF-p2 および bLF-p3 は ST2 細胞において、LPS 刺激による JNK、p38、p65 のリン酸化を阻害した。FITC 標識した bLF-p2 (bLF-p2-FITC) を ST2 細胞に添加すると、細胞内への取り込みに加え、TRAF6 との結合が確認された。</p> <p>3) RANKL 誘導性破骨細胞分化に対する bLF-p2 と bLF-p3 の影響 破骨細胞前駆細胞株 RAW-D を用い、RANKL 刺激下の破骨細胞分化に対する bLF-p2 あ</p>			

るいは bLF-p3 の影響を検討したところ、いずれも破骨細胞の形成を抑制した。これと一致し、破骨細胞分化マーカーである *Oscar*、*Ctsk*、*Acp5*、*Nfatc1* の mRNA レベルが抑制された。また、RAW-D 細胞においても bLF-p2-FITC が TRAF6 と結合することを確認した。

2. LPS 誘導性歯周病モデルにおける bLF-p2 および bLF-p3 の作用

ラット上顎臼歯口蓋側の歯肉縁上に LPS を浸漬した綿栓を 1 時間静置し、口蓋側歯周組織に炎症性変化ならびにそれに伴う骨吸収を誘導した。ペプチドは LPS 投与前に歯肉溝に少量ずつ滴下した（総投与量 24 μ g）。LPS のみを投与した群（LPS 群）では、3 日後に組織学的に歯槽骨歯根膜面の骨吸収像が見られた。また、歯根膜の免疫染色により LPS 投与 3 時間後に TNF- α 、3 日目に RANKL の染色強度が上昇し、OPG の染色レベルが減少した。bLF-p2 と bLF-p3 投与は TNF α 、RANKL の染色強度を低下させ、一方 OPG の染色強度が上昇した。さらに bLF-p2 および bLF-p3 を投与した群では、3 日目の歯槽骨歯根膜面における CTSK 陽性細胞の数が LPS 群よりも少数であった。また、LPS 投与 2 日後の歯肉組織において、ペプチド投与群はいずれも *Tnfa* mRNA レベルが低値を示し、*Il1b*、*Il6* も低レベルの傾向を示した。

以上のように、本論文では、bLF に由来する新規ペプチド bLF-p2 および bLF-p3 がマクロファージ、骨髄ストローマ細胞における炎症性サイトカインの分泌を抑制すること、あるいは骨髄ストローマ細胞の RANKL の発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制することを見出した。同ペプチドは細胞内に取込まれた後、TRAF6 に結合し、下流のシグナル伝達を阻害することを示した。また、同ペプチドは LPS 刺激マウス歯周病モデルの病態発症を抑制することを証明した。これらのことは bLF 由来のペプチドが骨破壊性病変に有効なペプチド医薬の創薬に発展する可能性を示唆している。

よって審査委員会委員全員は、本論文が山田桜に博士（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	山田 桜
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Development of novel peptide drug against bone destructive diseases (骨破壊性病変に対する新規ペプチド薬の開発)			
最終試験担当者			
主査教授 吉子 裕二		印	
審査委員 教授 津賀 一弘			
審査委員 教授 高田 隆			
〔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 13 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"> 1 ペプチドの構造の特異性あるいは相同性について 2 ペプチドの標的分子である TRAF6 について 3 ペプチドの実験における投与方法と臨床応用について 4 生理的骨代謝と病的骨代謝の違いについて 5 ペプチドの細胞内挙動と LF との比較について 6 ペプチドの細胞内への取り込み様式について <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>			