

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯学 )	氏名	吉本 哲也
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目			
The involvement of TGF- $\beta$ /smad2 signaling pathway in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> -induced apoptosis on human gingival epithelial cells. (TGF- $\beta$ /smad2 シグナル伝達経路と <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> が誘導するヒト歯肉上皮細胞におけるアポトーシスとの関連性)			
論文審査担当者			
主 査	教授 宿南 知佐	印	
審査委員	教授 高田 隆		
審査委員	教授 兼松 隆		
〔論文審査の要旨〕			
<p>歯周病は歯周病原菌によって引き起こされる細菌感染症である。歯肉接合上皮は歯周病原菌の侵襲に対する最前線に位置しており、歯周炎の発症に関与する重要な組織である。歯周病原菌が誘導する歯肉接合上皮細胞のアポトーシスはバリア機能を低下させ歯周炎の発症につながる。それゆえに、このアポトーシスを制御することは歯周病の新規の治療につながる可能性がある。Smad2 は TGF-<math>\beta</math>・receptor (TGF-<math>\beta</math>R) の重要な下流分子であり、胃上皮におけるアポトーシスに関与する。そこで本研究では、歯周病原菌が smad2 cascade を亢進することで歯肉接合上皮細胞のアポトーシスを増加させ、その結果歯周炎を発症しているのではないかと仮説を立て、歯周病原菌が誘導する歯肉接合上皮細胞のアポトーシスと smad2 との関連性、またその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p> <p>細胞はprimaryのヒト歯肉上皮細胞(HGECs)またcell line であるOBA9 cellsを用いた。細菌は ATCC より購入した <i>Porphyromonas gingivalis</i> strain W83 (<i>Pg</i>), <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> strain Y4 (<i>Aa</i>), <i>Fusobacterium nucleatum</i> 49256 (<i>Fn</i>), <i>Prevotella intermedia</i> 25611 (<i>Pi</i>), <i>Escheria coli</i> HB101 (<i>EC</i>) を <math>1 \times 10^7</math> cells/well で用いた。</p> <p>まず、これらの細菌が smad2 のリン酸化に与える影響を Western Blotting 法によって検討した。HGECs, OBA9 cells とともに smad2 のリン酸化は <i>Pg</i>, <i>Pi</i> の影響を受けなかった一方で、<i>Aa</i>, <i>Fn</i>, <i>EC</i> により上昇した。次に、歯周病原菌によって上昇した smad2 のリン酸化とアポトーシスとの関連性を検討するために、<i>Aa</i> と OBA9 cells を使用し実験を行った。まず、<i>Aa</i> が TGF-<math>\beta</math>・<math>\beta</math>型受容体 (TGF-<math>\beta</math>R1) を活性化するかどうか免疫沈降法を用い検討し</p>			

た。*Aa*は TGF- $\beta$ RI のセリン残基のリン酸化を刺激後 1 時間で有意に増加した。次に、*Aa*が上昇した smad2 のリン酸化が TGF- $\beta$ RI を介しているかどうかを調べるために SB431542 (TGF- $\beta$ RI 化学的阻害剤) また TGF- $\beta$ RI siRNA 遺伝子導入を用い阻害実験を行った。遺伝子導入効率は TGF- $\beta$ RI の mRNA レベル, protein レベルを Real-time PCR, Western Blotting 法にて確認した。SB431542, TGF- $\beta$ RI siRNA は *Aa*が上昇した smad2 のリン酸化を明らかに減弱した。これらのことから OBA9 cells において *Aa*は TGF- $\beta$ RI を介して smad2 のリン酸化を上昇することが示唆された。さらに *Aa* が引き起こすアポトーシスと TGF- $\beta$ RI/sm2 cascade との関連性を検討した。過去に、*Aa*が歯肉上皮細胞においてアポトーシスを誘導することが報告されている。OBA9 cells においても同様の結果が得られるか確認するために、*Aa*を OBA9 cells に刺激した後、cleaved caspase-3 の protein レベルを Western Blotting 法, アポトーシス陽性細胞数を TUNEL 法にて確認した。*Aa*は cleaved caspase-3 の protein レベルを上昇した。この結果と一致してアポトーシス陽性細胞を増加した。このアポトーシスと TGF- $\beta$ RI/sm2 cascade との関連性を調べるために、TGF- $\beta$ RI siRNA また smad2 siRNA 遺伝子導入を行った。*Aa*によって増加した cleaved caspase-3 またアポトーシス陽性細胞はこれらの siRNA 遺伝子導入により明らかに抑制された。以上の結果から、*Aa*が誘導するヒト歯肉接合上皮細胞のアポトーシスは TGF- $\beta$ RI/sm2 cascade によって制御されることが示唆された。

次に、*Aa*が TGF- $\beta$ RI/sm2 cascade をどのように活性化するかを検討するために、*Aa*の重要な外膜タンパクの一つである outer membrane protein 29 kDa (Omp29)に着目し、そのリコンビナントタンパクを精製し実験に使用した。まず Omp29 でも *Aa*と同様の結果が得られるか検討した所 Omp29 もまた TGF- $\beta$ RI/sm2 を介したアポトーシスが誘導された。歯周病患者の歯肉溝滲出液からは健常者と比較して有意に多くの TGF- $\beta$ 1が検出されるという過去の報告から、Omp29 刺激されたヒト歯肉接合上皮細胞は TGF- $\beta$ 1を産生することでオートクライン・パラクライン依存的に TGF- $\beta$ RI/sm2 cascade を介しアポトーシスが誘導されるのではないかと仮定した。そこで、Omp29 刺激後の TGF- $\beta$ 1の mRNA レベルを Real-time PCR を用い検討したが、優位な変化は認められなかった。一方で、Omp29 刺激後の上清中の TGF- $\beta$ 1を ELISA 法によって検出したところ有意に増加していた。さらに TGF- $\beta$ 1中和抗体、さらに TGF- $\beta$  II型受容体中和抗体の前処理によって Omp29 が上昇した smad2 のリン酸化は明らかに減弱していた。これらの結果から、Omp29 が誘導する歯肉上皮細胞のアポトーシスは TGF- $\beta$ 1依存性の smad2 シグナル伝達経路に関連することが示唆された。

以上結果から、本論文は *Aa* 刺激された歯肉上皮細胞のアポトーシスは TGF- $\beta$ RI/sm2 シグナル伝達経路によって制御されており、またこのアポトーシスは細胞外の TGF- $\beta$ 1が関与していることを示唆した。よって審査委員会委員全員は、本論文が著書に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。