

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	荒木 美穂
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 引頭 毅 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 友藤 孝明 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 川木 晴美
論 文 題 目	
抗菌ペプチド LL-37 が引き起こす歯垢中の口腔細菌由来 DNA の性質変化の解析	
<p>【目 的】</p> <p>抗菌ペプチド LL-37 は、人体における第一線の感染防御因子として重要な役割を担っており、上皮細胞や好中球、マクロファージなどの細胞から産生されている。口腔では唾液や歯肉溝滲出液の成分として供給され、また歯周組織の種々の細胞や遊出好中球からも産生される。LL-37 の抗微生物作用は、細菌や真菌の他、一部のウイルスに対しても発揮される。また、LL-37 は好中球の走化性因子としての作用や、炎症性サイトカイン産生の調節作用も有しており、炎症を制御してホメオスタシスを維持する要素としての側面ももっている。一方、LL-37 は DNA との結合能を有しており、DNA を変性させて堆積させることにより、自己免疫疾患を増悪させるなどの病因的作用を有することも報告されている。これまで多くの研究で口腔における LL-37 の役割が示されてきた一方、歯垢形成過程で LL-37 がどのような役割を果たすのかについて具体的な知見を示す報告は存在しない。そこで本研究では、歯垢検体を使用して歯垢形成における LL-37 の役割を解明することを目的とした。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>歯垢検体は健康な被検者 17 名 (4~56 歳) から歯肉縁上歯垢を採取した (倫理審査承認番号: 34022)。LL-37 は市販の合成ペプチドを用いた。培養した <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg) ATCC 33277 株から抽出したゲノム DNA (PgDNA) と LL-37 との結合能は、DNA 結合性蛍光物質の蛍光強度の測定ならびにアガロースゲル電気泳動により解析した。歯垢検体における LL-37 ならびに DNA の存在は、抗 LL-37 抗体ならびに Hoechst33342 を用いた蛍光免疫染色法で解析した。歯垢検体における DNA-LL-37 複合体の存在は、ウサギ免疫により樹立した抗 PgDNA-LL-37 複合体抗体を用いたドットブロットで解析した。歯垢検体における LL-37 ならびに DNA-LL-37 複合体の濃度は ELISA 法により測定した。PgDNA-LL-37 複合体の抗菌活性はディスク拡散法で調べた。DNase に対する PgDNA-LL-37 複合体の分解耐性は、DNA 結合性蛍光物質の蛍光強度の測定ならびにアガロースゲル電気泳動により解析した。ヒト単球系細胞株 THP-1 をマクロファージ様に分化させた付着細胞における IL-1β の産生量は ELISA 法で調べた。被験者から採取した歯垢検体における IL-1β 量も同様に測定し、PgDNA-LL-37 複合体量との相関関係を調べた。</p>	

【結 果】

歯垢検体で抗 LL-37 抗体を用いた蛍光免疫染色を施した結果、LL-37 は歯垢全体にみられたが、粘液状に濃縮された領域にもみとめられた。一方、DNA は好中球などの核とは明らかに異なる大きな塊として存在しており、LL-37 と DNA はこれらの領域で共局在していた。LL-37 と PgDNA を反応させると、速やかに結合し、粘性の析出物になることがわかった。PgDNA-LL-37 複合体に対する抗体を用いて歯垢検体における DNA-LL-37 複合体の存在を確認したところ、採取したすべての検体で存在がみとめられた。LL-37 は口腔細菌に対して抗菌活性を示すが、PgDNA-LL-37 複合体は抗菌活性を失っていた。PgDNA は DNase で処理すると速やかに分解されるが、PgDNA-LL-37 複合体は DNase で処理しても分解されなくなった。口腔細菌由来 DNA ならびに DNA-LL-37 複合体のマクロファージ様細胞における IL-1 β 産生誘導能は菌種によって異なっており、特にグラム陰性菌種で強い活性がみられた。また、歯垢検体における IL-1 β 量と DNA-LL-37 複合体量には相関関係がみとめられた。

【考 察】

本研究では歯垢検体の蛍光免疫染色により DNA の堆積を示す像とともに、DNA と LL-37 の共局在する様子を見出した。そこで LL-37 の役割を検証したところ、LL-37 は口腔細菌の DNA に結合し、複合体を形成する能力をもつことがわかった。LL-37 は DNA と結合することで抗菌活性を失い、LL-37 と結合した DNA は DNase による分解に抵抗するようになる。したがって歯垢表層では、細菌から放出された DNA に LL-37 が速やかに結合して分解耐性となり、これが徐々に拡散して粘性の析出物として堆積し歯垢マトリックスの一部になっていくと推測される。歯垢細菌は恒常的に LL-37 を含む自然免疫系の攻撃にさらされていることを考えれば、歯垢と宿主免疫間のインターフェースでは常にこのような反応が起こっていると想像される。また DNA-LL-37 複合体の炎症誘導能について検証し、細菌のゲノム DNA とそれらの複合体の活性は菌種によって異なる可能性を見出した。さらに、活性の高い DNA-LL-37 複合体が歯垢に堆積することで炎症が惹起される一因になると推測された。

【結 論】

本研究では、歯垢の形成過程における抗菌ペプチド LL-37 の役割について解明する目的で研究を行った。その結果、LL-37 は口腔細菌由来 DNA と結合すると複合体を形成し、歯垢に堆積させることがわかった。複合体を形成した LL-37 は抗菌活性を失い、また、複合体を形成した口腔細菌由来 DNA は DNase による分解に抵抗することがわかった。DNA-LL-37 複合体は IL-1 β 産生を介して炎症反応を誘導する能力を持つが、その能力は DNA が由来する細菌種によって異なることがわかった。これらの発見は、歯垢の生物学、歯周病の病因論などにおける新しい重要な知見を加える重要なものであると考えられる。