

学 位 論 文 審 査 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>学位論文審査は令和5年12月19日に実施された。まず論文提出者から学位論文の背景と目的について以下のように説明された。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ている。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なども有しており、ホメオスタシスを維持する要素としての側面も併せもっている。一方、LL-37 は DNA との結合能を有し、DNA を変性させて堆積させ、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 の有益性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ている。</p> <p>続いて研究方法と結果について以下の説明があった。まず歯垢検体を用いた抗 LL-37 抗体での蛍光免疫染色を施した。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。その結果、LL-37 は歯垢全体に普遍的にみとめられたが、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。この結果は LL-37 が歯垢中で細菌由来の DNA と結合している可能性を示すことから、次に <i>in vitro</i> 実験でこの仮説の検証を試みた。市販の合成 LL-37 ペプチドと、培養した <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg) ATCC 33277 株から抽出したゲノム DNA (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。次に、歯垢検体における DNA-LL-37 複合体の存在を確認するために PgDNA-LL-37 複合体に対する抗体をウサギポリクローナル抗体として作製した。この抗体を用いたところ、採取したすべての検体で DNA-LL-37 複合体の存在がみとめられた。さらに、LL-37 の抗菌活性は複合体形成に伴って消失すること、また、DNA-LL-37 複合体は DNase で処理しても分解されなくなることを <i>in vitro</i> 実験で見出した。また、DNA-LL-37 複合体の免疫刺激性についても検討し、マクロファージ様細胞における IL-1β 産生誘導能を調べたところ、DNA が由来する菌種によって活性が異なっており、特にグラム陰性菌種で強い活性がみとめられた。また、歯垢検体における IL-1β 量と DNA-LL-37 複合体量には相関関係がみとめられることが明らかになった。</p>	

続いて考察について以下の説明があった。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。

最後に結論は以下のように述べられた。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、とのことであった。

論文提出者の説明は学位論文の内容をよく反映しており、論文審査委員からの質問にも適切に答えることができていたことから、理解度は十分なものであったと判断される。学位論文は論述的に非常によく構成されており、得られた結果は結論を導くために十分な内容であり、また結論は研究目的が十分に果たされていることを示すものであった。歯垢が普遍的構成要素として DNA-LL-37 複合体という新規成分を含む発見をしたのは特筆すべき点であり、口腔科学の発展に貢献する重要な内容であると思われる。以上より論文審査委員は、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。