

論文の内容の要旨

氏名：三宅希和

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：短鎖脂肪酸が誘導する歯肉上皮由来 Ca9-22 細胞の細胞死とダメージ関連分子パターンの放出には活性酸素種産生によるオートファジー亢進が関係する

成熟した歯垢中に存在する細菌は酪酸およびプロピオン酸などの高濃度の短鎖脂肪酸（short-chain fatty acids, SCFAs）を産生する。また、歯垢中の細菌は血液から供給される栄養素を代謝利用するため、歯肉溝付近の歯肉上皮は低栄養状態にあるうえに、常に細菌が産生する SCFAs の影響を受けている。酪酸は低血清条件下で歯肉上皮由来株化細胞の Ca9-22 細胞のオートファジー亢進と細胞死を誘導する。この酪酸によって誘導される細胞死の多くはネクローシス様の細胞膜の破壊を伴うことから、high-mobility group box 1 (HMGB1) や sin3A-associated protein 130 (SAP130) などのダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) の放出と関連すると考えられている。従って SCFAs 誘導性細胞死のメカニズムを明らかにすることは歯肉炎の発症機序を理解する上で重要と考える。Ca9-22 細胞における酪酸誘導性細胞死はオートファジーと関係している。例えば、オートファゴゾーム膜に集積する microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) のノックダウンは、オートファジーにともなう Ca9-22 細胞の酪酸誘導性細胞死を抑制する。また、オートファジーを促進する AMP-dependent kinase (AMPK) 活性の上昇が Ca9-22 細胞の酪酸誘導性細胞死を引き起こすと考えられている。一方、酪酸とプロピオン酸には histone deacetylase (HDAC) 活性を抑制する作用があり、ヒストン H3 のアセチル化亢進が Ca9-22 細胞の細胞死に重要である。このように、Ca9-22 細胞の酪酸誘導性の細胞死にはいくつかの因子が関係しているが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、Ca9-22 細胞における SCFAs 誘導性細胞死の分子メカニズムを明らかにするため、ROS 産生、オートファジー亢進、および DAMPs 放出との関係性について検討を加えた。

オートファジーの抑制を ATG5 の siRNA を細胞に導入して行い、その効果をウエスタンブロットで確認した。ATG5 をノックダウンした Ca9-22 細胞に 1%ウシ胎児血清の条件下で SCFAs を作用させ、48 時間後に細胞死を測定することで、SCFAs 誘導性細胞死におけるオートファジーの関与を調べた。細胞死の測定は SYTOX-green 色素を用いたインターカレート法で行った。ROS-assay kit によって ROS 産生を可視化し、その緑色蛍光強度を ImageJ で数値化することで ROS 産生量を調べた。還元剤である N-acetylcysteine (NAC) で ROS 活性を抑制し、SCFAs 誘導性細胞死における ROS の関与をインターカレート法で調べた。続いて、NAC で ROS 活性を抑制し、LC3B-I の LC3B-II への変換と LC3B-I の産生増加をウエスタンブロットで調べることで、SCFAs 誘導性オートファジー亢進における ROS の関与を検討した。さらに、ウエスタンブロットで培養上清に含まれる HMGB1 と SAP130 を検出することで DAMPs の放出を調べ、ROS との影響について検討した。

ATG5 の siRNA を導入した細胞の ATG5 発現は、ネガティブコントロールよりも低く、酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死を抑制した。酪酸およびプロピオン酸で処理した Ca9-22 細胞は、コントロールと比較して ROS 産生を増加させた。また、NAC による ROS の不活化は、酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死を阻害した。Ca9-22 細胞の酪酸およびプロピオン酸誘導性細胞死は、オートファジーの亢進と ROS の産生が必要なことから、NAC による ROS の不活化がオートファジーに与える影響について調べた。酪酸とプロピオン酸は Ca9-22 細胞の LC3B-I の LC3B-II への変換を促進し、さらに LC3B-I の産生を増加させた。しかし、NAC 処理による ROS の不活化は、酪酸およびプロピオン酸によって誘導された LC3B-I の LC3B-II への変換と LC3B-I 産生を減少させた。NAC 処理による ROS 活性の抑制が、酪酸とプロピオン酸によって誘導される Ca9-22 細胞からの HMGB1 と SAP130 の放出を減少させるかどうか調べた。その結果、酪酸およびプロピオン酸は HMGB1 と SAP130 の放出を促進したが、NAC による ROS 活性の抑制はそれらの放出を阻害した。イソ酪酸およびイソ吉草酸処理が Ca9-22 細胞の細胞死に与える影響と、細胞死へのオートファジーの関与について調べた結果、イソ酪酸とイソ吉草酸は Ca9-22 細胞の細胞死を誘導し、ATG5 のノックダウンによるオートファジーの抑制はイソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死を阻害した。イソ酪酸とイソ吉草酸の作用による細胞死に ROS 産生が関与しているかどうか調べた。イソ酪酸およびイソ吉草酸を作用させた Ca9-22 細胞は、

コントロールと比較して ROS 産生を増加させた。また、NAC による ROS 活性の抑制はイソ酪酸とイソ吉草酸誘導の細胞死を阻害した。イソ酪酸およびイソ吉草酸誘導性細胞死はオートファジーの亢進と ROS 産生を増加させたことから、NAC による ROS の不活化がオートファジーに与える影響について調べた。イソ酪酸およびイソ吉草酸は LC3B-I の LC3B-II への変換を促進し、LC3B-I の産生を増加させた。また、NAC による ROS 不活化はイソ酪酸とイソ吉草酸誘導性の LC3B-I から LC3B-II への変換と LC3B-I 産生を阻害した。

以上の結果から、ヒト歯肉上皮 Ca9-22 細胞の SCFAs 処理によって誘導される細胞死にはオートファジーが関係し、このオートファジーの亢進は ROS 産生が必要であることが明らかになった。また、DAMPs の放出には ROS が関与していることから、SCFAs が Ca9-22 細胞に作用することによって ROS 産生が誘導され、オートファジーが亢進し、細胞死と DAMPs 放出が起きると考えられた。