

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 高橋 富久

（副査） 教授 米原 啓之

教授 鈴木 直人

教授 川戸 貴行

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短鎖脂肪酸（short-chain fatty acids, SCFAs）の影響を受けている。SCFAs の 1 つである酪酸は低血清条件下でヒト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シス様の細胞膜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）の放出と関係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。本研究では、Ca9-22 細胞の細胞死および DAMPs 放出時にみられる活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）産生とオートファジー亢進との関係性について検討した。

Autophagy-related gene 5 (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、酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、およびイソ吉草酸を 48 時間作用させ、誘導された細胞死とオートファジー亢進の関係について SYTOX-green 色素を用いたインターカレート法で確認した。ROS 産生は ROS-assay kit と ImageJ を使用することで数値化した。また、還元剤の N-acetylcysteine (NAC) で ROS を不活化させたときの細胞死と ROS 産生の関係をインターカレート法によって、microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) -I の発現と LC3B-II への変換、さらに NAC 存在下あるいは非存在下で、酪酸とプロピオン酸で処理した細胞の HMGB1 と SAP130 の発現をウェスタンブロットによって確認した。

その結果、以下の結論を得た。

1. ATG5 のノックダウンによって、SCFAs 誘導性細胞死が抑制された。
2. SCFAs は ROS 産生を促進し、NAC による ROS の不活化は SCFAs 誘導性細胞死を抑制した。
3. SCFAs はオートファジーを促進し、ROS の不活化によってオートファジーの抑制がみられた。
4. 酪酸およびプロピオン酸は HMGB1 と SAP130 の放出を増加させたが、ROS の不活化によってこれらの放出は減少した。

以上のように、本研究は Ca9-22 細胞の SCFAs 誘導性細胞死と DAMPs 放出には ROS 産生によるオートファジーの亢進が必要なことを示したものであり、この成果は細胞生物学および関連歯科医学の発展に寄与するものと考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 6 年 3 月 7 日