博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名	SUYONO Benso Sulijaya
学　　位	博　士（歯学）
学 位 記 番 号	新大院博（歯）第 443 号
学位授与の日付	令和元年 9 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博 士 論 文 名	The anti-inflammatory effect of 10-oxo-*trans*-11-Octadecenoic acid (KetoC) on RAW 264.7 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide （*Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激 RAW 264.7 細胞における新規機能性脂肪酸 KetoC の抗炎症作用）
論文審査委員	主査　教 授　多部田　康一 副査　教 授　山崎　和久 副査　教 授　寺尾　豊

博士論文の要旨

学位申請者 SUYONO Benso Sulijaya 氏より提出のあった主論文（英語）の要旨（和訳）は以下の通りである。

【背景】慢性炎症性疾患である歯周炎に対する治療として，炎症のコントロールに着目した新規の治療法への関心が高まっている。多価不飽和脂肪酸 10-オキソ-トランス-11-オクタデセン酸（10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid：KetoC）は，リノール酸がオレイン酸へと飽和化される過程で産生される中間体代謝産物であり，様々な生理作用を有することが近年明らかとなっている。本研究は，KetoC の抗炎症作用とその分子機構について *in vitro* において解析を行い，歯周炎治療への応用を検討した。

【方法】マクロファージ様細胞株 RAW264.7 を KetoC にて前処理後，主要な歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の内毒素（Lipopolysaccharide：LPS）にて刺激を行い，各種炎症性サイトカイン（Tumor necrosis factor：TNF-α，Interleukin-6：IL-6，Interleukin-1β：IL-1β）の遺伝子発現を qPCR 法，タンパク質発現を ELISA 法にて解析した。脂肪酸受容体として知られる G タンパク質共役受容体（G protein-coupled receptor：GPR）40 および GPR120 に対する特異的アンタゴニストを用いて炎症性サイトカイン産生への影響を検討した。また、炎症応答に関与する転写因子（Nuclear factor-kappa B：NF-κB）p65 のタンパク発現を Western Blotting 法にて解析した。

結果：LPS で刺激した RAW 264.7 細胞において，KetoC（5μmol/L）で前処置することにより，TNF-α，IL-6 の遺伝子発現およびタンパク発現，さらに IL -1β の遺伝子発現が有意に減少した。GPR120 の特異的アンタゴニストで前処置することで，KetoC による抗炎症作用が消失するとともに，NF-κB p65 タンパクの核内への移行も確認された。一方，GPR40 の特異的アンタゴニストではその傾向が認められなかった。

【結論】KetoC は炎症性細胞上の GPR120 受容体を介して，炎症性サイトカイン TNF-α，IL-6 および IL -1β の産生および NF-κB p65 タンパクの核内移行を抑制した。その詳細なメカニズムは更なる検討が必要であるが，歯周炎治療における KetoC 応用の可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性，研究背景に関しての試問を行った。

歯周病の病因論における細菌感染の役割について近年の知見については以下回答を得た。歯周疾患の進行においては，細菌因子の関与（Van Dyke, 2008）に加えて，炎症性サイトカインの過剰な生産が組織破壊の進行に関与することが明らかとされている（Bartold and Van Dyke, 2013;

Bartold and Van Dyke, 2017）。また，臨床研究において，歯周組織破壊の重症度に細菌の総数は相関せず, 宿主の免疫応答誘導能をもつ細菌が関与すると報告されており（Cekici, Kantarci, Hasturk and Van Dyke, 2014; Marsh, 2004; Sanz *et al*., 2017），Dysbiosis や酸化ストレスによっても歯周組織破壊が誘導されることが示唆される（H. Wang *et al*., 2014; Shi *et al*., 2015; Herrero *et al*., 2018）。近年，歯周病病因論において，多様な細菌の相乗作用や Dysbiosis が関与するという説が提唱されている。（Darveau, Hajishengallis, and Curtis, 2012; Hajishengallis and Lamont, 2012; Hajishengallis, 2015; Hajishengallis, Darveau and Curtis, 2012; Lamont and Hajishengallis, 2015）。バイオフィルムの組成や，細菌叢に対する宿主の反応性には個人差がある。したがって，歯周病原細菌は，現在想定されているよりもはるかに多様な細菌種が含まれる可能性が示唆される。つまり，歯周病は特異的な細菌による疾患ではなく，細菌が誘導する免疫応答の破綻に関連した疾患と考えられる。

P. gingivalis LPS は腸内細菌 LPS よりも弱い理由に関しての考察として以下回答を得た。*P. gingivalis* LPS によるサイトカイン産生誘導は，*Escherichia coli*（*E. coli*）と比較して弱いことが報告されている（Hirschfeld *et al*., 2001; Liu *et al*., 2008）。この理由として, Toll-like receptor（TLR）の活性化経路の違い，構造的相違による機能活性の違いによることが示唆される（Martin *et al*., 2001）。腸内細菌の LPS は，主に TLR4/MD-2 経路を介して宿主細胞を刺激することが知られている。一方で，*P. gingivalis* LPS は TLR2 と TLR4 を介して自然免疫応答を誘導することが知られておりシグナル経路が異なる（Hirschfeld *et al*., 2001; Martin *et al*., 2001; Coats *et al*.,2003）。また，*P. gingivalis* LPS の Lipid A 構造は *E. coli* LPS と構造的および機能的に異なり，分岐脂肪酸で構成され，腸内細菌の Lipid A よりも長い炭素鎖を有している（Aida *et al*., 1995）。さらに，*P. gingivalis* LPS と LPS 結合タンパク質への結合能力は, *E. coli* LPS と比較して 100 倍低い（Holt *et al*., 1999）。これらのことが *P. gingivalis* LPS は腸内細菌 LPS よりも弱い理由と考えられる。

KetoC に着目した理由，検討を行う合理性については，以下の回答を得た。歯周炎における病因論のパラダイムは，口腔細菌叢の Dysbiosis を原因とする炎症性組織破壊にシフトしてきている（Van Dyke, 2008; Bartold and Van Dyke, 2013）。さらに，歯肉炎から歯周炎への進行の背景においては炎症が重要であり, 歯周炎発症に占めるプラークの寄与はわずか 20%にとどまることが示唆されている（Bartold and Dyke, 2017）。このことから，炎症自体が歯周炎の病因において重要な役割を果たしていることが示唆され, 炎症の制御が歯周炎改善において効果的であると考えられる。

KetoC は比較的新しい生理活性脂肪酸であり，腸内細菌である *Lactobacillus plantarum* によってリノール酸から複数の飽和プロセスを経て生成される。この脂肪酸またはその誘導体の効果を探索する目的で行われた研究はほとんどなく, HepG2（ヒト肝癌由来細胞株）において, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 antioxidant-responsive elements（Nrf2-ARE）経路の活性化を介して KetoC が抗酸化作用を発揮することが報告されているものの（Furumoto *et al*., 2016），歯周炎における KetoC の抗炎症効果は不明である。

抗生物質や抗菌薬は，歯周治療において補助的に用いられている。しかしながら，薬剤耐性は世界的に問題となっている（Jepsen and Jepsen 2016）。加えて, 日本では急速な高齢化（Ouchi *et al*., 2017）に伴い，様々な全身疾患を有する高齢者や複数の薬剤を服用する易感染性宿主が増加している。こうした患者には観血的処置ができないケースが多々ある。それゆえ，侵襲を最小限とした歯周治療が奨励される。歯周治療における補助的な抗菌薬や抗炎症薬の代替として，KetoC は将来的に, 特に全身疾患関連性の歯周治療を補助する安全なコンパウンドとなりうると考えられる。

研究方法と論旨の展開についての試問を行った。

RAW 264.7 cell を使用した理由として以下回答を得た。RAW 264.7 はマウスマクロファージ様細胞株であり, 炎症について検証した多くの *in vitro* 研究において使用されている（Soromou *et al*., 2012; Tominari *et al*., 2012; Bognar *et al*., 2013; Lee *et al*., 2013; Choi *et al*., Sun *et al*., 2016; Bhattarai *et al*., 2017）。マクロファージは，感染に対する免疫応答の最前線で機能し（Duque and Descoteaux 2014），樹状細胞や好中球と並び，炎症誘導において重要な役割を担う自然免疫細胞である（Mogensen, 2009; Newton and Dixit, 2012）。TLR などのパターン認識受容体を発現し，病原体関連分子パターンや損傷関連分子パターンと呼ばれる多様な微生物由来構造を認識する（Takeuchi and Akira 2010）。マクロファージの活性化は，炎症性サイトカイン（インターロイキン（IL）-1,

IL-6，IL-12，TNF-α，ケモカイン）や，抗炎症性サイトカイン（IL-10 および IL-13）の産生を特徴とする表現型 M1 および M2 への分化を誘導する（Mosser, 2003; Wang *et al*., 2014）。つまり，細菌由来成分に鋭敏に反応し，炎症性サイトカイン産生を促進するという特徴をもつ。このことから，本研究において RAW 264.7 細胞を用い，炎症性サイトカインレベルを評価することで KetoC の有効性を検証した。

P. gingivalis LPS を使用した理由，生菌を用いない理由として以下回答を得た。今回行った *in vitro* の研究では炎症誘導に *P. gingivalis* LPS を使用したが，その後行った *in vivo* 研究にて，生菌の *P. gingivalis* を使用したマウス口腔感染モデルにおける検討が行われた（Sulijaya, Yamada-Hara, et al. 2019）。LPS は *P. gingivalis* の病原因子のひとつとして歯周組織破壊に影響することが知られている（How *et al*., 2016）。また，歯周組織において，*P. gingivalis* は上皮組織にのみ存在し，結合組織まで浸潤しないことが報告されている（Guido *et al.*, 2012）。これらの報告より，LPS，ジンジパイン，線毛，コラゲナーゼなどの *P. gingivalis* の細菌産物が歯周組織の深部に局在する細胞の炎症を誘導している可能性が示唆されることから，今回の研究では結合組織深部にも存在しているマクロファージの LPS に対する応答性を検討した。

生菌の *P. gingivalis* 刺激では，LPS 刺激と比較して，マクロファージにおける IL-6 と TNF-α の遺伝子発現が増加することがこれまでに報告されている（Zhou *et al.*, 2005）。また，*P. gingivalis* の膜小胞刺激では，生菌の *P. gingivalis* 刺激と比較してマクロファージにおける TNF-α，IL-6，IL-12p70, IL-10, IFN-β の遺伝子発現レベルが増加したという報告もある（Fleetwood *et al.*, 2017）。これらの報告より，生菌を用いた *P. gingivalis* 刺激ではサイトカイン産生に違いが生じ，LPS 刺激を行った今回の実験結果と異なる遺伝子発現を示すと考えられる。

LPS 刺激により IL-1β の産生が観察されない事象への考察として以下の回答を得た。今回の実験結果より，*P. gingivalis* LPS 刺激による TNF-α，IL-6，IL-1β の遺伝子発現の増加が認められたが，タンパクレベルは IL-1β の産生に変動が認められなかった。同様の実験系において再現性を確認している。マクロファージの IL-1β 産生には，インフラマソーム活性が必要であり，つまり TLR リガンド刺激単独で IL-1β を産生せず，ATP やナイジェリシンを添加することで， IL-1β 産生を誘導することができる（Yan *et al.*, 2013; Aoki-Nonaka *et al.*, 2019）。今回の実験系においては，添加物質と KetoC の交差反応が結果に影響を与える可能性を考慮するため検証実験を行っていない。

In vitro において，KetoC は NF-κB p65 シグナル経路に対する抑制作用が弱いにも関わらず，炎症性サイトカインの発現を有意に抑制することの考察として以下の回答を得た。KetoC が炎症性サイトカイン産生において有意な抑制効果を示したが，Nuclear factor-κB（NF-κB）p65 の核内移行に対する阻害効果は有意ではなく，傾向を示すにとどまった。NF-κB シグナル伝達は KetoC の抗炎症機能を部分的に制御していると考えられる。NF-κB の他には，Mitogen activated protein kinase（MAPK）シグナル伝達が関与する可能性が最も高いと考える。MAPK p38 は，炎症性メディエーター TNF-α，IL-6，IL-1β） の産生や活性化に加え，白血球の遊走や活性化の制御においても広く研究されている（Kaminska, 2005; Cuadrado and Nebreda, 2010; Kim and Choi, 2010; Gao *et al.*, 2012; Arthur and Ley, 2013）。マクロファージにおける細菌 LPS 誘導性の炎症において，KetoC が Extracellular signal regulated kinase（ERK）, p38, および NF-κB のリン酸化を介して TNF-α 産生を抑制することが報告される（Yang *et al.*, 2017）。一方で，本研究では，マクロファージの炎症を誘導するために *P. gingivalis* LPS を用い，NF-κB p65 の抑制傾向を示した。これらのことから，KetoC の抗炎症作用は NF-κB および MAPK 経路を介する可能性が示唆される。

KetoC による抗炎症作用は GPR120 を介した反応であることが示されているが，KetoC と *P. gingivalis* LPS が直接的に反応して LPS 活性を抑制している可能性についての問いに以下の回答を得た。*P. gingivalis* LPS の Lipid A として知られる疎水性ドメインと長鎖脂肪酸である KetoC の相互作用の可能性から，これら 2 つの脂質間の相互作用を避ける目的で，*P. gingivalis* LPS による細胞刺激に先立って，KetoC を 30 分間事前インキュベートする方法を用いた。その効果が不十分であれば，KetoC と *P. gingivalis* LPS の相互作用が，*P. gingivalis* LPS による炎症応答誘導を抑制している可能性がある。これを検証するためには，*P. gingivalis* LPS 刺激および KetoC 処理のタイムポイントを変えた追加実験が必要と考える。または直接的な相互作用または結合活性に

ついて検証が必要である。

KetoC 投与によって，マウス口腔内の *P. gingivalis* が減少したことにより Ligature による歯槽骨吸収を抑制したとの考察についての妥当性にについて以下の回答を得た。KetoC 投与が *P. gingivalis* 量を減少させるだけでなく，マウス口腔内の全細菌量を低下させること報告した（Sulijaya, Yamada-Hara, *et al.*, 2019）。*P. gingivalis* は Dysbiosis を誘発するキーストーン病原体である（Hajishengallis *et al.*, 2011; Darveau *et al.*, 2012）。したがって，分類学的な存在比率や，宿主の発現プロファイルにおける細菌多様性を解析することに加え，メタゲノムおよびメタトランスクリプトーム解析によりマイクロバイオームの組成とその変動を解明することで，さらなる考察が可能と考える。一方で，これまでの我々の研究で，腸内細菌叢の変化が口腔細菌と歯周組織の反応に影響を与える可能性がある。投与した KetoC が *P. gingivalis* による腸内細菌の Dysbiosis を改善し，全身的な炎症の軽減，代謝物の負の影響の改善に作用した可能性がある。

In vitro における検証で，AZM をポジティブコントロールとして用いた理由について以下の回答を得た。アジスロマイシン（AZM）は，マクロライド系抗生物質であり，歯周病原細菌を含む幅広い菌種に対して抗菌効果を有し（Hirsch *et al.*, 2012），日本で一般的に使用されている（Yashima *et al.*, 2009）。臨床研究において，歯周治療における補助的な AZM 使用の有効性が実証されている（Smith *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2008）。さらに，*in vitro* においては，*P. gingivalis* に対して AZM（0.5-1 μg/mL）が強力な殺菌効果を発揮することが報告されている（Izutani *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013）。歯周治療の補助として用いる際の AZM 量（500 mg/day，3 日間）を考慮し，我々の *in vitro* における検証においては，0.5 μg/mL を採用した。その結果，AZM は *P. gingivalis* に対するポジティブコントロールとして有効な最も強い抗菌活性を示した。この研究で使用される可能性のあるもう一つのポジティブコントロールは，ミノサイクリンである。ミノサイクリンは，テトラサイクリンの半合成誘導体であり，広範な抗菌スペクトルを示すことが知られている（O’Connor *et al.*, 2012）。ミノサイクリンは，細菌のコラゲナーゼ作用を直接阻害することにより有効性が示されている（Ryan ME, 2000）。

本研究の学術的意義に関しての試問と評価を行った。

新規性及び独自性として，*P. gingivalis* LPS によりマクロファージに誘導される炎症応答が KetoC により抑制されることを初めて明らかにした。さらに KetoC は *P. gingivalis* に対して抗菌作用を持ち，マウス歯周病モデルにおいて歯槽骨吸収を抑制することを明らかにした。（副論文，Sulijaya *et al.*, 2019）。この検討においては KetoC が GPR120 に結合することにより炎症性サイトカインの産生が抑制されていることが示唆された。歯周病病因論におけるキーストン細菌としての *P. gingivalis* の役割を考えると（Darveau *et al.*, 2012），KetoC は *P. gingivalis* により誘導される Dysbiosis の状態を改善しているものと考察される。

今後の見通しと本研究の位置づけとして，以下回答を得た。KetoC について，抗炎症作用（Sulijaya *et al.*, 2018），抗菌作用（Sulijaya, Yamada-Hara, *et al.*, 2019）を明らかにした。近年は口腔－腸管における細菌叢の変化に対する KetoC の効果についても検討を行っている。これまでのところ，*in vivo* において，*P. gingivalis* によって誘導される腸管内の細菌叢の変化に対し，KetoC の投与が細菌叢の回復を促すことを確認している。これらの知見から，KetoC が口腔内においてだけでなく全身的に有効な効果をもたらすと考えている。将来的には，宿主修飾療法への KetoC の臨床的な応用を目標としている。加えて，体内における薬物動態とその副作用の検討を含め，デリバリーシステムや KetoC 濃度の適正化について更なる研究が必要と考えている。

学位申請者 SUYONO Benso Sulijaya 氏より提出のあった主論文をもとに上記事項のように審査を実施し，博士学位論文として適切かつ十分であることから合格と判定致しました。

以上