

学位論文要約

氏名	大塚 麻衣
タイトル	Ameloblastin upregulated inflammatory response through the induction of IL-1 β in human macrophages

論文の要旨

【背景】アメロブラスチン (AMBN)はエナメルマトリクスタンパクの一つであり、歯の形成に重要な役割を担うことが知られている。近年の研究から、AMBNが歯髄炎の治癒促進や骨折の治癒促進など多彩な生理学的機能をもつ可能性が明らかになってきた。今回、我々は、Lipopolysaccharide (LPS)刺激したヒトマクロファージ様細胞における炎症性サイトカイン Interleukin-1 β (IL-1 β)産生に対するAMBNの影響について検証した。

【材料と方法】 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)処理によりマクロファージ様細胞へ分化誘導したヒト単球様細胞株 (U937細胞)を、*Escherichia coli*由来LPSとリコンビナントヒト AMBN (rhAMBN)で刺激し、real time RT-PCR法を用いてIL-1 β 遺伝子発現を解析した。各タンパク発現に関しては、Western blot法とELISA法を用いて解析を行った。また、TLR4とMyD88の会合に与えるAMBNの影響を、Co-immunoprecipitation法を用いて検証した。

【結果】LPS刺激U937細胞において、IL-1 β の遺伝子発現が上昇した。rhAMBN単独刺激ではIL-1 β の遺伝子発現に影響は認められなかったが、LPSとrhAMBNの同時刺激により、IL-1 β の遺伝子発現は顕著に増強した。Western blotの結果から、LPSとrhAMBNの同時刺激により、成熟型のmature IL-1 β の発現と活性化型caspase-1 p10の発現が上昇し、さらに、ELISAの結果から、細胞上清中のIL-1 β 産生量が有意に増加することが明らかになった。また、caspase-1阻害剤により、rhAMBNによるIL-1 β の発現増強作用は抑制された。Co-immunoprecipitationにおいて、LPSとrhAMBN同時刺激によるTLR4/MyD88の会合は亢進していたが、LPS刺激と比較して明瞭な差は認められなかった。細胞内シグナルにおいて、LPS刺激後0.5 hでERK1/2のリン酸化が上昇した。これに対し、LPSとrhAMBNの同時刺激により、ERK1/2のリン酸化が4 hまで持続した。そこで、ERK1/2阻害剤を使用すると、LPSとrhAMBNの同時刺激によるIL-1 β のタンパク発現は抑制された。

【考察】マクロファージにおけるmature IL-1 β の産生には、LPS誘導性IL-1 β precursorの発現とそれに続くcaspase-1によるプロセッシングという2段階のステップが必要であることが知られている。今回、我々は、rhAMBNがLPS誘導性IL-1 β の遺伝子発現を増強するとともに、活性化型caspase-1 p10の発現とmature IL-1 β の発現・細胞外分泌を増強し、LPS下流にあるERK1/2のリン酸化を長期化することを明らかにした。さらに、ERK1/2阻害剤およびcaspase-1阻害剤により、rhAMBNによるIL-1 β の増強作用は抑制されることが明らかになった。以上の結果より、rhAMBNがマクロファージにおいて、ERK1/2の長期リン酸化とcaspase-1の活性化を介して、LPS誘導性IL-1 β の産生を促進したが、このことはAMBNが、炎症応答を増強する生理学的機能をもつ可能性を示唆している。