

論文の内容の要旨

氏名：葉山 朋美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒト歯髄培養細胞における plasma kallikrein による Protease Activated Receptor-1 を介した炎症促進と plasmin による calcineurin を介した COX-2 発現

Plasma kallikrein (KLKB1)は基質である kininogen を限定分解し、生理活性ペプチド kinin を産生するセリンプロテアーゼの1つである。Kinin は急性炎症反応等に深く関わるメディエーターの1つであり、歯髄炎における発痛ばかりでなく血管拡張や血管透過性の亢進に関係あることは周知の如くである。また plasmin も細胞外基質成分の消化だけでなく前駆体 MMPs の活性化にも関与し、線維素溶解、炎症、組織修復にかかわる生理学的・病理学的にも重要なプロテアーゼである。

Protease activated receptors (PARs) は様々な組織に発現する受容体で、血管平滑筋においては KLKB1 が PARs を活性化することによって Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体の発現に関与しているという報告や、歯髄細胞において plasmin が PAR-1 活性化を介して炎症へ関与することを示唆する報告がある。KLKB1, plasmin とともに PARs を活性化させる報告があることから、我々はこれらが歯髄炎の進行にも関与していると考え、ヒト歯髄培養細胞を用いて、KLKB1 による PAR-1 を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および COX-2 発現と PGE₂ 産生、そして plasmin による calcineurin を介した COX-2 発現および PGE₂ 産生について検討した。

細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は、蛍光色素 Fura-2 を用い、CAF-110 より 2 波長蛍光測定法により測定した。ヒト歯髄培養細胞における cyclooxygenase (COX)-2 mRNA 発現量の変化を RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、タンパク質量の変化を Western blot 法、PGE₂ 量を EIA kit にて検討した。

ヒト歯髄培養細胞において、KLKB1 の添加により $[Ca^{2+}]_i$ は上昇した。また KLKB1 は COX-2 mRNA 発現量を濃度および時間依存的に促進し、その効果は PAR-1 阻害剤である SCH79797 で抑制された。KLKB1 の添加により COX-2 タンパク質発現量および培養上清中の PGE₂ 量も増加したが、SCH79797 で抑制された。

Plasmin の添加により時間依存的に培養上清中の PGE₂ 量は増加した。また plasmin は COX-2 mRNA 発現量を時間依存的に促進し、その効果は calcineurin 阻害剤である FK506 で抑制された。Plasmin の添加により核タンパク質画分中の転写因子 NFATc1 量が増加し、COX-2 タンパク質発現量も増加したが、いずれも FK506 で抑制された。PAR-1 活性化剤である SFLLRN でもほぼ同様の結果が得られた。

以上の結果から KLKB は PAR-1 を介して COX-2 mRNA 発現量、タンパク質量、PGE₂ 産生を促進することにより、歯髄炎を進行させる因子の1つではないかということが示唆された。また plasmin は PAR-1 を介して COX-2, PGE₂ を産生することで歯髄炎の進行に関与する可能性があり、またその細胞内シグナル伝達経路において calcineurin/NFATc1 経路が関与することが示唆された。