

## 論文審査の結果の要旨

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 cyclooxygenase-2 発現

審査委員：(主査) 教授 小方 頼昌

(副査) 教授 平塚 浩一

(副査) 教授 吉垣 純子

(副査) 教授 松島 潔

歯髄は細胞、細胞外基質、脈管、神経から構成される疎線維性結合組織であり、機械的、熱的、化学的、細菌学的刺激に対して炎症が生じる。閉鎖的空間である歯髄内では側副循環が存在しないため、炎症が進行すると循環障害に陥りやすく、歯髄壊死がおこる。歯髄の生死はその歯の寿命に大きく関与しているのは臨床上周知の事実であるが、歯髄の炎症時における細胞機能的な特徴については不明な点が多く残されている。

Protease Activated Receptor (PAR) s は元々 thrombin の受容体として発見され、これまでに 4 種の subtype が明らかになっている。PARs は 7 回の細胞膜貫通構造をもつポリペプチドからなる G タンパク質共役型受容体である。特定のプロテアーゼは PARs の細胞外 N 末端側ペプチド鎖の特定部位を切断する。そして、露出した受容体活性化配列がリガンドとなって受容体自身の別の部位に結合し、活性化がおこる。*Porphyromonas gingivalis* 由来の gingipain-R はマウス肺線維芽細胞において PAR-1, 4 を介し、血小板の細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の上昇を誘発させ、ヒト歯肉線維芽細胞では thrombin が PAR-1 を介して IL-6 遺伝子発現を促進させ、IL-6 産生量を促進し、さらに、筋線維芽細胞と心筋細胞において thrombin が PAR-1 を活性化させ、濃度・時間依存的に COX-2 遺伝子発現とタンパク質発現を促進し、その結果 PGE<sub>2</sub> 産生がおこるといふ報告があることから PAR-1 の活性化は炎症の促進に関わっているといえる。

歯髄においては、歯髄培養細胞で PAR-1, 3, 4 が発現するという報告がある一方で、う蝕に罹患した歯髄の培養細胞では健常のものに比べ PAR-2 が上昇する。また PAR-2 agonist が神経ペプチドであるサブスタンス P や calcitonin gene-related peptide を遊離するという報告があり、歯髄において、PARs 活性化と歯髄炎は何らかの関係があると推察される。Kamio らは歯髄では恒常的に PAR-1, 2, 4 が発現し PAR-1 の活性化が IL-8 遺伝子発現促進と PGE<sub>2</sub> 遊離を引き起こすこと、そして PAR-1 活性化に plasmin も関わり、それが歯髄炎の一端を担っている可能性について報告している。

Plasma kallikrein (KLKB1) は基質である kininogen を限定分解し kinin を産生する。kinin は恒常型の  $\beta_2$  受容体や誘導型の  $\beta_1$  受容体に作用し、血管透過性亢進、白血球遊走作用、平滑筋収縮、血管拡張、浮腫、腎尿管細管でのナトリウム排泄等を引き起こすことから、急性炎症反応や高血圧発症、発痛等に深く関わるメディエーターの 1 つであり、kallikrein-kinin 系の制御は抗炎症作用につながる

と考えられる。kallikrein family である kallikrein-6 が PAR-1, 2 を介して神経変性に関与するという報告もあり, kallikrein family のプロテアーゼ活性が PARs に働きシグナル伝達を引き起こす可能性があり, 歯髄も例外ではないと考えられた。また, KLKB1 は plasmin の前駆体である plasminogen の活性化にも関与する。すなわち KLKB1 による制御は KLKB1-kinin 系だけでなく PAR 活性化, plasmin-PAR 活性化のコントロールにまで関わる可能性があるが明確になっていない。そこで本研究では炎症時に増加した KLKB1 が, PARs の活性化に関与することで歯髄炎の増悪に働いていると仮定し, ヒト歯髄培養細胞を用いて KLKB1 による PAR-1 の活性化と炎症への関与と plasmin による PAR-1 活性化を介した炎症の進展について検討した。

本研究では, 以下の結果を得た。

- ① 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。
- ② KLKB1 は COX-2 遺伝子発現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。
- ③ KLKB1 の添加により COX-2 タンパク質発現も増加したが, SCH79797 で抑制された。KLKB1 の添加により培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は増加し, その効果は SCH79797 で抑制された。
- ④ plasmin の添加により時間依存的に培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量は増加した。
- ⑤ plasmin は COX-2 遺伝子発現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。
- ⑥ 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 タンパク質発現も増加したが, いずれも FK506 で抑制された。
- ⑦ 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, KLKB1 は基質を分解し kinin を産生させるだけでなく, PAR-1 を介して COX-2 遺伝子発現, タンパク質発現および PGE<sub>2</sub> 産生を促進することにより, 歯髄炎の進行に関わる因子の 1 つであることが示唆された。また plasmin は PAR-1 を介して COX-2, PGE<sub>2</sub> 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。これらの結果は, 歯髄における炎症の進展の一部を明らかにし, 新たな歯髄炎治療の開発に貢献するところは大きい。

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

平成28年1月28日