

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

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

葉山 朋美

(指導：松島 潔 教授)

要旨

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 Matrix metalloprotease 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がある。また歯髄細胞において 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, および plasmin は 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 を介した細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 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。

$[Ca^{2+}]_i$ は、細胞内蛍光プローブである Fura-2 を添加し、CAF-110 を用いた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 遺伝子発現量の変化を RT-PCR 法、定量 PCR 法、タンパク質量の変化を Western blot 法、培養上清中に放出された PGE₂ 量を ELISA 法にて検討した。

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 遺伝子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 antagonist である SCH79797 で抑制された。KLKB1 の添加により COX-2 タンパク質量も増加したが、SCH79797 で抑制された。KLKB1 の添加により培養上清中の PGE₂ 量は増加し、その効果は 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 遺伝子発現量を時間依存的に促進し、その効果は calcineurin antagonist 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 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。

緒言

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。炎症が極めて軽度で滲出液量の制御により防御反応がおきれば一過性のものとして治癒する。一方で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。すなわち歯髄は組織再生による治癒の望めない特殊な組織である。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。

歯髄に対するストレスは、interleukin (IL) -1β , tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ といった炎症性サイトカインや、cyclooxygenase (COX), prostaglandin (PG), の生産を誘発する¹⁾。炎症歯髄組織では IL-6, IL-8, IL-18 などの遺伝子発現が亢進され²⁾、ヒト歯髄培養細胞では IL- 1β が COX-2 を介して PGE₂ 産生を上昇させ³⁾、さらに IL- 1β や TNF- α が Matrix metalloproteases (MMPs) の発現を上昇させる^{4,5)} ことが知られている。また化膿性歯髄炎や壊死した歯髄組織ではコラゲナーゼやエステラーゼ活性が上昇し、細胞外基質の破壊が引き起こされている⁶⁾ ことから、歯髄の炎症においてサイトカインやプロテアーゼは重要な役割を担っている。

Protease Activated Receptors (PARs) 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り^{7,8)}、特に消化器系に広く分布され、様々な生理的プロセス⁹⁾ を管理する。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、活性化が起こる^{7,8)}。また、PARs はペプチド鎖の切断部位が多少前後しても同様に活性化されることが明らかになっている^{10,11)}。

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¹²⁾、またヒト上皮細胞では PAR-1, 2 を介して IL-6 産生量を促進させる¹³⁾。ヒト歯肉線維芽細胞では thrombin が PAR-1 を介して IL-6 遺伝子の発現量を促進させ、IL-6 産生量を促進し¹⁴⁾、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 PGE₂ 産生がおこるという報告^{15,16)}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¹⁷⁾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¹⁸⁾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¹⁹⁾という報告があり、歯髄における PARs の発現については議論の余地があるが、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²⁰⁾ 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 遺伝子発現量増加と PGE₂遊離を引き起こすことや 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を報告している。

一方で, 同じセリンプロテアーゼである Plasma kallikrein (KLKB1) は基質である kininogen を限定分解し kinin を産生する²¹⁾。kinin は恒常型の β 2 受容体や 誘導型の β 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^{22, 23)} 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。

血管平滑筋においては KLKB1 が PAR-1, 2 を活性化することによって Epidermal Growth Factor 受容体の発現に関与していること²⁴⁾, また 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²⁵⁾ 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思われる。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未だ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 および plasmin 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可能性があるかをヒト歯髄培養細胞を用いて検証を行った。

材料及び方法

1. 材料

牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS), alpha minimum essential medium (α -MEM), fungizone, trypsin は GIBCO BRL Life Technologies (Tokyo, Japan), kanamycin, penicilin G は明治製菓 (Tokyo, Japan), fura-2/AM は同仁化学社製 (Kumamoto, Japan), Recombinant Human Plasma Kallikrein/KLKB1 は R&D Systems (Minnesota, USA), PAR-1 agonist (SFLLRN) は Bachem AG (Bubendorf, Switzerland), [[4-(1-methylethyl) phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine dihydrochloride (SCH79797) は Tocris Bioscience (Michigan, USA), Human plasmin (recombinant, >95% pure) は Calbiochem (Darmstadt, Germany), FK506 は Wako (Osaka, Japan), PGE₂ enzyme immunoassay kit は Oxford Biomedical Research (Michigan, USA), 抗 NFATc1 抗体は ATGen (Seoul, Korea), 抗 NFATc2 抗体は Epitomics (California, USA), 抗 COX-2 抗体, 抗 NFATc3 抗体, 抗 NFATc4 抗体は Santa Cruz Biotechnology (California, USA), 抗 β -actin 抗体, HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA), HRP 標識抗体マウス IgG 抗体は Bio-Rad (Tokyo, Japan) のものを使用した。

2. 細胞培養

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認（承認番号:EC12-010号）に基づき、日本大学松戸歯学部附属病院に治療のため来院し、矯正治療により抜去された第三大臼歯からヒト歯髄を無菌的に取り出した。取り出した歯髄は、Somermanらの方法²⁶⁾に基づき、約2mm角に細切し、組織片を35mm culture dishに静置後、10%FCS, 100 µg/ml kanamycin, 100 µg/ml penicillin G, 0.3 µg/ml fungizoneを添加したα-MEMを用いて、37 °C, 5% CO₂, 95%気相下にてoutgrowthさせ、5~9代継代したものを実験に用いた。

3. 細胞内カルシウムイオン濃度（[Ca²⁺]_i）測定

[Ca²⁺]_i測定は、CAF-110型スペクトロメーター（日本分光社製, Tokyo, Japan）を使用し、340nmと380nmによる2波長励起により得られた蛍光強度比からGrynkiewiczら²⁷⁾の方法で濃度の算出を行った。13.5mmカバーガラスを敷いた35mm culture dish内でコンフルエントになるまで培養し、細胞内蛍光プローブである2mM fura-2/AMを添加後、α-MEM中で37 °C, 30分間インキュベートした。細胞が接着しているカバーガラスを専用ホルダーに装着後、カルシウム含有 Krebs-Ringer-Hepes 溶液（120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.96 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 0.2% glucose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES buffer pH 7.4）中に静置し、KLKB1添加後測定した。

4. total RNA 抽出

10 cm culture dish でコンフルエントになるまで培養後、KLKB1 または plasmin 添加 24 時間前に FCS を含まないα-MEM に交換した。KLKB1, または plasmin を添加し、一定時間経過後に RNeasy[®] Mini (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて細胞から total RNA の抽出を行った。

4-1. RT-PCR 法

total RNA, DNA primer, QIAGEN[®] One Step RT-PCR KIT (QIAGEN) を用いて TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Standard (TaKaRa, Tokyo, Japan) にて RT-PCR を行った。実験に使用したプライマーを Table 1 に示す。RT-PCR の反応条件は、50 °C で 30 分後、95 °C で 15 分を 1 cycle 行い cDNA を合成し、次いで DNA 変性を 94 °C で 30 秒、アニーリングを 55 °C で 30 秒、伸長反応を 72 °C で 30 秒行い、これを 1 cycle として COX-1 と COX-2 では 27 cycle, GAPDH では 24 cycle 行い、最終伸長反応を 72 °C で 10 分間行った。PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色後に確認した。得られたバンドの濃度および面積を画像編集ソフト Adobe Photoshop Elements 9 にて数値化し、GAPDH との対比值を算出した。

5. 定量 PCR 法

total RNA, DNA primer, One Step SYBR[®] Primescript[™] RT-PCR KIT II Perfect Real Time (TaKaRa) を用い, Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (TaKaRa) にて定量 PCR を行った. 実験に使用したプライマーを Table 2 に示す. 42 °C で 5 分, 95 °C で 10 秒で逆転写反応を行ったのち, 熱変性を 95 °C で 10 秒, アニールおよび伸長反応を 60 °C で 30 秒の 2 ステップ法で 50 cycle 行った. 定量方法は $\Delta \Delta Ct$ を用いた.

6. Western Blot 法

コンフルエントになるまで 10 cm culture dish で培養後, KLKB1 または plasmin 添加 24 時間前に FCS を含まない α -MEM に交換した. KLKB1 および plasmin 作用後の歯髄培養細胞を 100 μ M Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.2 mM EGTA, 2 mM EDTA を含有する Cellytic M Cell lysis reagent (SIGMA ALDRICH, Tokyo, Japan) にて溶解した. また核タンパク質の抽出には NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) を用いた.

Bradford 法²⁸⁾ にて, タンパク質量の調整を施したのち sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (new England biolabs, Tokyo, Japan) を加え 5 分間煮沸した後, 15,000 rpm で 1 分間遠心分離した後の上清をサンプルとした. 7.5% の SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 用ゲル

(Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad) にて電気泳動後, 転写装置 (日本エイドー社, Tokyo, Japan) を使用してニトロセルロース膜 (Bio-Rad) へ転写した. その後 skim milk (Becton Dickinson, New Jersey, USA) にて室温で 30 分ブロッキングを行い, 一次抗体を室温で 2 時間振盪反応させ, 二次抗体を室温で 90 分間同様に反応させた. 一次抗体として抗 COX-2 抗体 (1/1,000), 抗 NFATc1 抗体 (1/1,000), 抗 NFATc2 抗体 (1/500), 抗 NFATc3 抗体 (1/1,000), 抗 NFATc4 抗体 (1/1,000), または抗 β -actin 抗体 (1/2,000) を供した. 二次抗体として, HRP 標識抗マウス IgG 抗体または HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を供した. ECL prime Western Blotting detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, England) を用いて化学発光を行い, X 線フィルム (Hyperfilm; GE Healthcare) 上に感光させて発現量を確認した.

7. PGE₂ 量計測

コンフルエントになるまで 35 mm culture dish で培養後, KLKB1 または plasmin 添加 24 時間前に FCS を含まない α -MEM に交換した. 培養上清中の PGE₂ の分泌量を Prostaglandin E₂ EIA kit を用いて波長 450 nm における吸光度を MTP-300 microplate Reader (CORONA ELECTRIC, Ibaragi, Japan) で測定した.

8. 検定

得られた測定値は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した. 有意差の検定には Tukey test を用い, 有意水準 1% および 5% で検定した.

結果

1. KLKB1

1-1) KLKB1 による細胞内カルシウムイオン濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の変化

ヒト歯髄培養細胞に, 1 $\mu\text{g/ml}$ KLKB1 を作用させると添加後からすみやかに $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し, 約 90 秒後で最大となりその後時間経過と共に緩やかに減少した (Fig. 1A). また, $[Ca^{2+}]_i$ は添加した KLKB1 の濃度に依存して上昇した (Fig. 1B).

1-2) KLKB1 による COX-2 遺伝子発現量の変化

1 時間 KLKB1 (0.01, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$) を作用させると COX-2 遺伝子発現量は濃度依存的に増加した (Fig. 2A, 2C). また, KLKB1 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) を作用させると COX-2 遺伝子発現量は時間依存的に増加し, 作用後 1 時間で最大に達し, 以後減少した (Fig. 2B, 2D).

1-3) KLKB1 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および COX-2 遺伝子発現量増加に与える SCH79797 の影響

PAR-1 antagonist である SCH79797 で 30 分前処理したヒト歯髄培養細胞では KLKB1 による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は SCH79797 の濃度依存的に抑制された (Fig. 3A, 3B). 同様に SCH79797 で 30 分前処理したヒト歯髄培養細胞では KLKB1 による COX-2 遺伝子発現量の増加が抑制され, その抑制効果は濃度依存的に抑制された (Fig. 4A, 4B).

1-4) KLKB1 による COX-2 タンパク質発現と SCH79797 の影響

KLKB1 (1 $\mu\text{g/ml}$) を 1 時間作用させると COX-2 タンパク質量は増加した. また SCH79797 で 30 分前処理したヒト歯髄培養細胞では KLKB1 による COX-2 タンパク質の増加が抑制された (Fig. 5).

1-5) KLKB1 による PGE₂ 産生と SCH79797 の影響

KLKB1 (1 $\mu\text{g/ml}$) を 1 時間作用させると培養上清中の PGE₂ 量は増加した. また SCH79797 により 30 分前処理した細胞に KLKB1 で刺激をすると, 培養上清中の PGE₂ 含有量は低く抑えられていた (Fig. 6).

2. plasmin

2-1) plasmin 刺激による PGE₂ 産生量の変化

100 nM plasmin を添加すると、ヒト歯髄培養上清中 PGE₂ 量は時間依存的に増加し、作用後 1 時間でほぼ最大値に達した (Fig. 7A) . また, PAR-1 agonist である SFLLRN (100 μM) を添加すると時間依存的に PGE₂ 量は増加し、作用後 1 時間で最大値に達しその後減少した. (Fig. 7B) .

2-2) plasmin 刺激による COX-2 遺伝子発現量の変化

Plasmin 刺激により時間依存的に COX-2 遺伝子発現量は作用後 1 時間で最大に達し、以後減少した (Fig. 8A, 8B) . 同様に SFLLRN 作用後, COX-2 遺伝子発現量は 0.5 時間で最大に達し、以後減少した (Fig. 8C, 8D) . COX-1 遺伝子発現量は plasmin または SFLLRN 刺激を行っても、共に発現量に大きな変化を認めなかった (Fig. 8A, 8C) .

2-3) COX-2 遺伝子発現に与える calcineurin の影響

plasmin または SFLLRN 刺激 6 時間前に Ca²⁺-calmodulin 依存性脱リン酸化酵素 (calcineurin; CN) の影響を確認するため, CN antagonist である FK506 (100 nM) で前処理を行った. 前処理したヒト歯髄培養細胞では前処理しない群と比較し, COX-2 遺伝子発現量の促進が抑制された (Fig. 9) . 一方で IL-1β による COX-2 遺伝子発現に対しては, FK506 は抑制効果を示さなかった. また FK506 単独では COX-2 遺伝子発現量をわずかに増強する傾向にあった。

2-4) COX-2 タンパク質発現に与える CN の影響

実験に供した濃度の plasmin, および SFLLRN は COX-2 タンパク質を促進したが, FK506 で前処理したヒト歯髄培養細胞では, それらの効果を抑制した (Fig. 10) . この結果は COX-2 遺伝子発現とほぼ同様の傾向を示す結果となった.

2-5) plasmin による転写因子 NFATc1 の核内移行

plasmin は作用 20 分で核内の NFATc1 タンパク質を増加させた (Fig. 11) . また, FK506 存在下では plasmin による核内 NFATc1 タンパク質量は減少した.

考察

炎症進展時には細胞外基質成分の合成と分解のバランスが崩れ、組織破壊が進行する。しかし plasmin や MMPs などによる細胞外基質の分解システムは、肉芽組織や上皮の形成など、創傷治癒における様々な炎症のステージにおいて重要な役割を有する²⁹⁾。歯髄における炎症は、特有の臨床症状や、不可逆的な経過をたどるといった特徴³⁰⁾がある一方、適度な炎症は第三象牙質を形成し、歯髄保護に働くという報告³¹⁾もあり討議され続けている。

ヒト歯髄培養細胞で MMP-3 は connective tissue growth factor/CCN family 2 の発現を促進し細胞遊走を促進する³²⁾。また MMP-3 は LPS 刺激により産生された IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 を抑制することから抗炎症作用を示す³³⁾という報告もあり、炎症による破壊と創傷治癒という一見対局した場面をスムーズに移行できるようにプロテアーゼの局在や産生量が調節されていると推察される。

本研究は、歯髄における炎症の進行と KLKB1 および plasmin の作用について検討を行い、その一端を解明することで歯髄炎の予防や進行抑制に応用できるのではないかと考えた。ヒト歯髄培養細胞において、KLKB1 は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、COX-2 遺伝子とそのタンパク質の発現量が増加し、そして PGE₂ 産生を促進し、その一連の経路として PAR-1 が関与していることを示唆した。また plasmin はそれらの伝達経路として CN/NFATc1 経路を介している可能性が高いことを示した。

セリンプロテアーゼである kallikrein は尿中の非透析性の血圧効果物質として発見³⁴⁾され、その後研究が進み kallikrein family が報告され、膵臓、腎臓、唾液腺、汗腺などで産生される kallikrein は tissue kallikrein と命名されている^{35,36)}。一方、KLKB1 は肝臓で不活性化である prekallikrein として生成され、血液循環されることで生体内に分布される³⁷⁾。血管内皮細胞の損傷によって活性化された第XIIa 因子により不活性の状態から活性化され KLKB1 となる³⁸⁾。歯髄組織は神経と共に多くの毛細血管が存在するため、これらの反応が歯髄組織内でも起こると考えられる。これまでに kallikrein family は血小板や白血球に対する作用³⁹⁾、プラスミノゲンの活性化⁴⁰⁾、プロエンケファリンやプロレニンの活性化⁴¹⁾、C3 の分解⁴²⁾ など様々な作用が報告されており、また特に重要な役割として高分子 kininogen から炎症誘発性ペプチドである bradykinin を生産すること⁴³⁾が知られている。血管平滑筋細胞において、KLKB1 は PAR-1, 2 を介して A Disintegrin And Metalloproteas-17 を活性化させ TNF- α を分泌させることが報告されており²⁴⁾、kallikrein family は kinin 産生経路とは別のメカニズム、つまり PARs を経由してシグナル伝達を惹起することが報告された^{44,45,46)}。

PARs は活性化することで $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが知られており、現在までに4つの subtype, すなわち PAR-1, 2, 3, 4 が発見され、生体内のさまざまな組織で確認されている^{7,8)}。ヒト歯髄培養細胞における PARs の発現は種々報告があるが、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するのは PAR-1 agonist の SFLLRN のみであるという報告²⁰⁾から $[Ca^{2+}]_i$ の変化は PAR-1 活性化の指標の一つとなると考えられる。

本研究にてヒト歯髄培養細胞を KLKB1 で刺激することで $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、刺激後2分でピークに達し、その後ゆるやかに減少していった。また PAR-1 antagonist である SCH79797 で前処理を行う

と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はみられなかった. このことにより KLKB1 が PAR-1 を活性化することで $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することを明らかにした.

PARs 活性化は膵癌細胞株 (Panc1, T3M4, 3xPC3, MIAPaca2)⁴⁷⁾・腸の内皮細胞株(Caco-2)⁴⁸⁾・胃癌細胞株 (MKN-48)⁴⁹⁾ といった様々な細胞株で COX-2 を発現させることからヒト歯髄培養細胞においても PARs の活性化を介して COX が発現すると仮定し, KLKB1 および plasmin による COX-2 の遺伝子およびタンパク質発現について検討した.

ヒト歯髄培養細胞を KLKB1 で刺激すると COX-2 の遺伝子発現量とタンパク質量が増加したが, SCH79797 による前処理により, 両者の発現は抑制された. 本研究により KLKB1 が PAR-1 を活性化し, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が引き起こされた結果, COX-2 を発現させたことが推察された. Plasmin と SFLLRN は共に時間依存的に COX-2 遺伝子発現を促進したが, 発現量がピークに達する時間がやや異なる結果となった (Fig. 8). Blackburn ら⁵⁰⁾ は, thrombin と MMP-1 はともに血管内皮細胞で PAR-1 を介して MAPK のリン酸化を促進するが, MMP-1 のほうが遅れることから, 異なるシグナル経路を介する可能性を示唆している. Kamio ら²⁰⁾ は plasmin と SFLLRN の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響を検討し, plasmin は SFLLRN より遅れてピークに達することを報告しており, 発現のピークが異なる結果となったのは, PAR-1 活性化時における切断の有無による時間的差異が $[Ca^{2+}]_i$ のピークのずれを生じさせ, 発現時間に影響を与え, COX-2 遺伝子の発現時間が異なることが推察されている.

PGE₂ はアラキドン酸から COX によって産生されるケミカルメディエーターで, 血管透過性の亢進や発痛作用を有した炎症初期に活躍するきわめて重要な因子のひとつである. 細菌の細胞壁構成成分であるペプチドグリカンヒト歯髄培養細胞において濃度依存的に PGE₂ 量を増加させること⁵¹⁾ や, 歯髄炎の進行に伴い歯髄組織中に PGE₂ 量が増加すること⁵²⁾, Bradykinin や炎症性サイトカインの IL-1 β , TNF- α が歯髄細胞で PGE₂ 産生を促進すること⁴⁾ からも, PGE₂ が歯髄炎においても重要な役割を担っていることが推察される. 低濃度 PGE₂ 量は修復象牙質の形成に関わる³⁰⁾ こともあり, PGE₂ 産生量を制御することは歯髄炎の進展を左右するといえる.

本研究において KLKB1 はヒト歯髄培養細胞で PGE₂ 量を増加させ, SCH79797 による前処理では PGE₂ 量の増加を抑制した. すなわち KLKB1 は PAR-1 活性化により発現した COX-2 を介して PGE₂ を産生すると考えられる. また plasmin と PAR-1 agonist である SFLLRN は, ヒト歯髄培養細胞で時間依存的に PGE₂ 量を増加させ, 作用 1 時間で最大に達した. Kamio ら²⁰⁾ は, plasmin が PAR-1 を介して作用 10 分で培養上清中に PGE₂ が放出されることを報告した. 本研究で認められた時間依存的効果は細胞における COX の産生とそれに伴う PGE₂ であり, plasmin は PGE₂ を細胞質中から遊離させ, さらに COX-2 合成から産生すると推察される.

本研究では, ヒト歯髄培養細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の結果生じた COX-2 発現に CN が関与していることを CN antagonist である FK506 を用いて明らかにした (Fig. 9). CN は触媒サブユニット (CnA) および調節サブユニット (CnB) で構成され, Ca²⁺ および calmodulin が結合して自己抑制ドメインが

活性中心から外れることで触媒活性を発揮する⁵³⁾。FK506は細胞内でFK506-binding proteinと複合体を形成し、CNと結合することで阻害効果をもたらす⁵⁴⁾。FK506は単独でCOX-2遺伝子発現を促進することが歯肉線維芽細胞で報告されたが⁵⁵⁾、本研究でもその傾向はわずかに認められた。CNの標的タンパク質としては転写因子NFATが最も研究が進んでおり、今回の結果ではCa²⁺/CN/NFATc1経路がCOX-2発現に加担している可能性が示唆された。CN/NFAT経路を介したCOX-2発現は、ヒト臍帯静脈内皮由来細胞でvascular endothelial growth factor⁵⁶⁾が、大腸癌由来細胞⁵⁷⁾ではphorbol ester (PMA)による作用などが報告され、炎症だけでなく癌の進行への関与を示唆している。これらの報告はNFATc1, NFATc2という組織・器官によるisoformの分布の相違はあるが、いずれもCNによって活性化される点で共通である。今回、核内NFATc1のタンパク質量をWestern blot法にて示したが、ヒト歯髓培養細胞におけるほかのisoformの存在も確認しNFATc1の発現量が最も多かった(データ未掲載)。いずれにしても、NFATのDNA結合活性を検討し明らかにする必要があると考えられる。

本研究により、KLKB1およびplasminがヒト歯髓培養細胞においてPAR-1の活性化、[Ca²⁺]_iの上昇を引き起こした結果、COX-2を発現し、PGE₂を産生することを明らかにした。またplasminはCOX-2発現、およびPGE₂産生においてCNの活性化、NFATc1の脱リン酸化による核内移行を経ていることを判明した。ここまでの結果からKLKB1もplasmin同様CN/NFATc1経路にて、COX-2の発現およびPGE₂産生を誘導する可能性がある。また、KLKB1はplasminを活性化する⁴⁰⁾ことから、COX-2発現とPGE₂産生において相乗作用の働きを持つと推察される。COX-2発現はPAR-1の発現に依存すると考えられるため、PAR-1発現に関与する因子を検索することが今後の研究には重要であると思われる。これらのPAR-1を介する機構の解明は歯髓炎増悪の原因究明の一助となり、抗炎症、そして修復象牙質形成という歯髓保護につながり、保存治療の拡大へとつながると示唆される。

本論文は、“Kallikrein promotes inflammation in human dental pulp cells via protease-activated receptor-1” (Journal of Cellular Biochemistry 掲載予定) および“ヒト歯髓培養細胞におけるplasminによるcalcineurinを介したCOX-2発現”(日本歯科保存学会誌 掲載)を参考論文とし、まとめ論文としたものである。

參考論文

- 1) Selzer S, Bender IB (eds) : The dental pulp : biologic considerations in dental procedures, Philadelphia : JB Lippincott Company, 1984.
- 2) Zehnder M, Delaleu N, Du Y and Bickel M, et al. : Cytokine gene expression--part of host defense in pulpitis, *Cytokine*: 22, 84-88, 2003.
- 3) Chang MC, Chen YJ, Tai TF, et al. : Cytokine-induced prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 expression in dental pulp cells: downstream calcium signalling via activation of prostaglandin EP receptor, *Int Endod J*, 39: 819-826, 2006.
- 4) O'Boskey FJ Jr, Panagakos FS: Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture, *J Endod*, 24: 7-10, 1998.
- 5) Ahn SJ, Rhim EM, Kim JY, et al. : Tumor necrosis factor- α induces matrix metalloproteinases-3, -10, and -13 in human periodontal ligament cells, *J Periodontal*, 85: 490-497, 2014.
- 6) Morand MA, Schilder H, Blondin J, et al. : Collagenolytic and elastinolytic activities from diseased human dental pulps, *J Endod*, 24: 156-160, 1981.
- 7) Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors, *Nature*, 407: 258-264, 2000.
- 8) Trejo J: Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking, *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 437-442, 2003.
- 9) Kawabata A: Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors, *Life Sci*, 74: 247-254, 2003.
- 10) Trivedi V, Boire A, Tchernychev B, et al. : Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site, *Cell*, 137: 332-343, 2009.
- 11) Jaffré F, Friedman AE, Hu Z, et al. : β -adrenergic receptor stimulation transactivates protease-activated receptor 1 via matrix metalloproteinase 13 in cardiac cells, *Circulation*, 125: 2993-3003, 2012.
- 12) Afrodite Loubakos, YuPing Yuan, Alison L. Jenkins et al. : Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity, *Blood*, 97: 3790-3797, 2001.
- 13) Afrodite Loubakos, Jan Potempa, James Travis, et al. : Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion, *Infect. Immun*, 69: 5121-5130, 2001.
- 14) Tanaka N, Morita T, Nezu A, et al. : Signaling mechanisms involved in protease activated receptor-1-mediated interleukin-6 production by human gingival fibroblasts, *J Pharmacol Exp Ther*, 311: 778-786, 2004.
- 15) Seymour ML, Zaidi NF, Hollenberg MD, et al. : PAR1-dependent and independent increases in COX-2

and PGE2 in human colonic myofibroblasts stimulated by thrombin, *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C1185-C1192, 2003.

- 16) Chien PT, Hsieh HL, Chi PL, et al. : PAR1-dependent COX-2/PGE2 production contributes to cell proliferation via EP2 receptors in primary human cardiomyocytes, *Br J Pharmacol*, 171: 4504-4519, 2014.
- 17) Gruber R, Jindra C, Kandler B, et al. : Proliferation of dental pulp fibroblasts in response to thrombin involves mitogen-activated protein kinase signaling, *Int Endod J*, 37: 145-150, 2004.
- 18) Lundy FT, About I, Curtis TM, et al. : PAR-2 regulates dental pulp inflammation associated with caries, *J Dent Res*, 89: 684-688, 2010.
- 19) Tancharoen S, Sarker KP, Imamura T, et al. : Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling, *J Immunol*, 174: 5796-5804, 2005.
- 20) Kamio N, Hashizume H, Nakao S, et al. : Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp, *Biochem Pharmacol*, 75: 1974-1980, 2008.
- 21) Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, et al. : Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution, *J Biol Chem*, 260: 8610-8617, 1985.
- 22) 大石幸子: カリクレイン-キニン系 その基礎と臨床, *日本臨床雑誌*, : 36, 30-40, 1978.
- 23) Francel PC: Bradykinin and neuronal injury, *J Neurotrauma* 9 Suppl, 1:S27-S45, 1992.
- 24) Rany T, Abdallah, Joo-Seob Keum, Mi-Hye Le, et al. : Plasma Kallikrein Promotes Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Signaling in Vascular Smooth Muscle through Direct Activation of Protease-activated Receptors, *J Biol Chem*, 285: 35206-35215, 2010.
- 25) Yoon H, Radulovic M, Wu J, et al. : Kallikrein 6 signals through PAR1 and PAR2 to promote neuron injury and exacerbate glutamate neurotoxicity, *J Neurochem*, 127: 283-298, 2013.
- 26) Somerman MJ1, Archer SY, Imm GR, et al. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro, *J Dent Res*, 67: 66-70, 1988
- 27) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*, 260: 3440-50, 1985.
- 28) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.
- 29) Xiao Y, Li H, Bunn C, et al. : The expression of plasminogen activator system in a rat model of periodontal wound healing, *J Periodontol*, 72: 849-857, 2001.
- 30) Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R: Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation, *Int Endod J*, 46: 573-580, 2013.
- 31) 坂本 真樹, 塩沢 督, 松島 潔ほか: ヒト歯髄細胞における Prostaglandin E₂ の硬組織形成促進作

- 用, 日歯保存誌, 46: 445-450, 2003.
- 32) Muromachi K, Kamio N, Narita T, et al. : MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration, *J Cell Biochem*, 113: 1348-1358, 2012.
 - 33) 瀧本晃陽, 川島伸之, 鈴木規元ほか; LPS 刺激下における炎症性メディエーター産生に対する MMP-3 の影響, *日本歯科保存学雑誌*, 55: 202-210, 2012.
 - 34) Frey EK: Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit, *Arch Klin Chir*, 142: 663-669, 1926.
 - 35) Kalinska M, Meyer-Hoffert U, Kantyka T, et al. : Kallikreins - The melting pot of activity and function, *Biochimie*, doi:10.1016/j.biochi.09.023, 2015.
 - 36) Yousef GM, Diamandis EP: The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease, *Endocr Rev*, 22: 184-204, 2001.
 - 37) Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP: Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 4179-83, 1976.
 - 38) Schmaier AH: Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system, *Int Immunopharmacol*, 8:161-165, 2008.
 - 39) Cassaro CM, Sampaio MU, Maeda NY, et al. : Human plasma kallikrein: effect on the induced platelet aggregation, *Thromb Res*, 48: 81-87, 1987.
 - 40) Miles LA, Greengard JS, Griffin JH: A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen, *Thromb Res*, 4: 407-17, 1983.
 - 41) Metters KM, Rossier J, Paquin J, et al. : Selective cleavage of proenkephalin-derived peptides (less than 23,300 daltons) by plasma kallikrein, *J Biol Chem*, 263: 12543-12553, 1988.
 - 42) Hayashi J, Salomon DR, Hugli TE: Elevated kallikrein activity in plasma from stable liver transplant recipients, *Int Immunopharmacol*, 2: 1667-1680, 2002.
 - 43) Sainz IM, Pixley RA, Colman RW: Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology, *Thromb Haemost*, 98: 77-83, 2007.
 - 44) Ramsay AJ, Dong Y, Hunt ML, et al. : Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs) , KLK4 and PAR-2 are co-expressed during prostate cancer progression, *J Biol Chem*, 283: 12293-12304, 2008.
 - 45) Mize GJ, Wang W, Takayama TK: Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2, *Mol Cancer Res*, 6: 1043-1051, 2008.
 - 46) Burda JE, Radulovic M, Yoon H, et al. : Critical role for PAR1 in kallikrein 6-mediated

- oligodendroglipathy, *Glia*, 61: 1456-1470, 2013.
- 47) Yada K, Shibata K, Matsumoto T, Ohta M, Yokoyama S, and Kitano S: Protease-Activated Receptor-2 regulates cell proliferation and enhances cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells. *J Sug. Oncol.* 89: 79-85, 2005.
- 48) Hirota CL, Moreau F, Iablokov V, et al. : Epidermal growth factor receptor transactivation is required for proteinase-activated receptor-2-induced COX-2 expression in intestinal epithelial cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303:G111-G119, 2012.
- 49) Zhang C, Gao GR, Lv CG, et al. : Protease-activated receptor-2 induces expression of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 via the mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells, *Oncol Rep* 28: 1917-1923, 2012.
- 50) Blackburn JS, Brinckerhoff CE: Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via PAR-1 and promote angiogenesis, *Am J Pathol*, 173: 1736-46, 2008.
- 51) 松島 潔, 細谷史規, 大林英美ほか: う蝕病巣内細菌ペプチドグリカンによる歯髓細胞のプロスタグランジン E₂ 産生能に及ぼす影響, *日歯保存誌*, 38: 1333-1338, 1995.
- 52) Nakanishi T, Matsuo T, Ebisu S: Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps, *J Endot*, 21: 131-6, 1995.
- 53) Klee CB, Crouch TH, Krinks MH: Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system, *Proc Natl Acad Sci, U S A*, 76: 6270-6273, 1979.
- 54) Rumi-Masante J, Rusinga FI, Lester TE, et al. : Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin, *J Mol Biol*, 415: 307-317, 2012.
- 55) 中尾寿美: ヒト歯肉線維芽細胞におけるシクロスポリン A によるプロスタグランジン E₂ 産生, *日大口腔科学*, 35: 168-173, 2010.
- 56) Hernández GL, Volpert OV, Iñiguez MA, et al. : Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2, *J Exp Med*, 19: 607-620, 2001.
- 57) Duque J, Fresno M, Iñiguez MA: Expression and function of the nuclear factor of activated T cells in colon carcinoma cells: involvement in the regulation of cyclooxygenase-2, *J Biol Chem*, 280: 8686-8689, 2005.

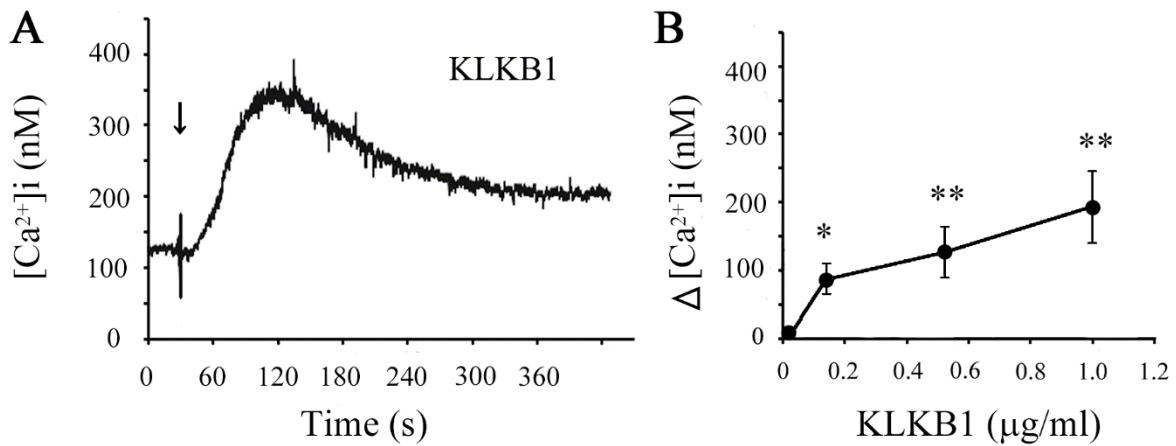


Fig. 1 Kallikrein (KLKB1) increases intracellular Ca²⁺ in human dental pulp cells. (A) Ca²⁺ mobilization in human dental pulp cells loaded with Fura-2 and stimulated with 1 μg/mL KLKB1 at the time point marked with an arrow. This result is representative of three independent experiments. (B) Dose-dependent increase in intracellular Ca²⁺. The baseline level in control cells (before stimulation) was subtracted from the KLKB1-induced peak Ca²⁺ value. Values are means ± SEM from three independent experiments. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01 versus control.

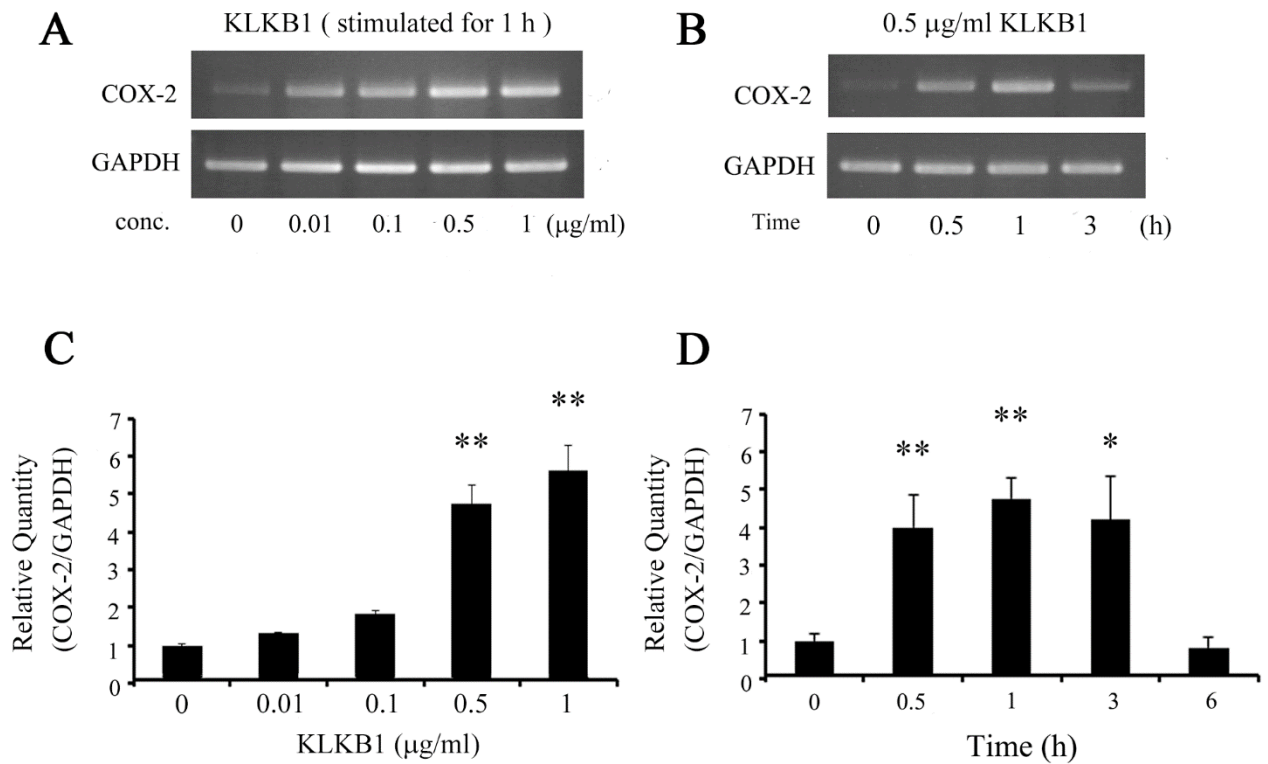


Fig. 2 KLKB1-dependent expression of COX-2 mRNA. (A) Cells were stimulated for 60 min with the indicated doses of KLKB1, and the expression of COX-2 and GAPDH was assessed by RT-PCR and agarose gel electrophoresis. (B) The expression of COX-2 and GAPDH was assessed by RT-PCR and agarose gel electrophoresis in dental pulp cells treated with 0.5 µg/mL KLKB1 for the indicated times. (C) Human dental pulp cells were stimulated for 60 min with increasing concentrations of KLKB1, and the expression of COX-2 was quantified by real-time RT-PCR, normalized to GAPDH, and reported relative to the expression level in untreated cells. Values are the means \pm SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ versus untreated cells. (D) COX-2 expression, as measured by real-time RT-PCR, in cells treated with KLKB1 for various times. Expression was normalized to GAPDH and reported relative to the expression in unstimulated cells. Values are means \pm SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ versus the expression in unstimulated cells (0 min).

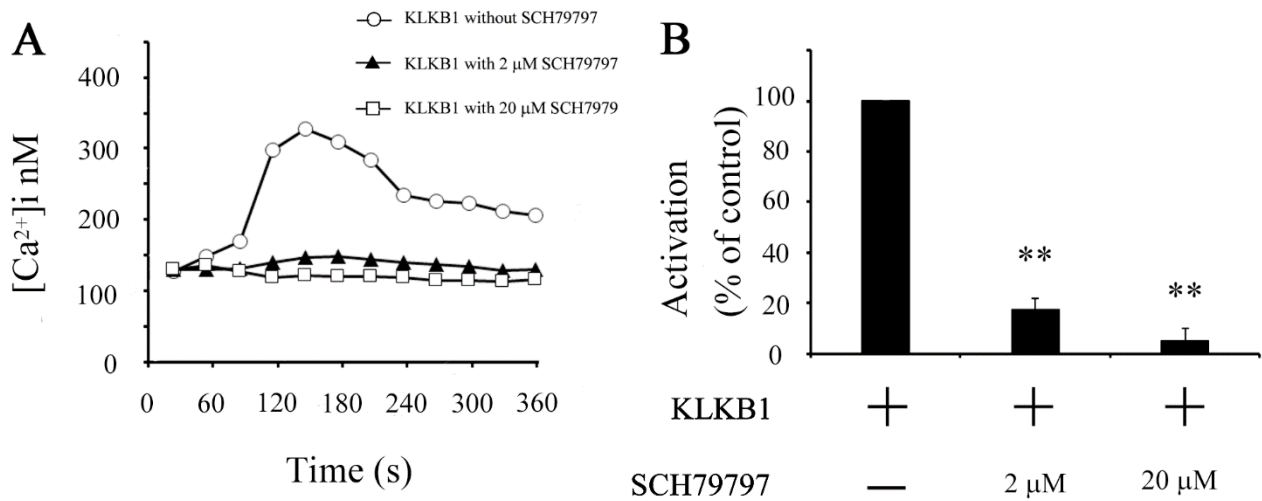


Fig. 3 SCH79797 inhibits KLKB1-induced increases in intracellular Ca^{2+} . (A) Representative time course and (B) quantification of Ca^{2+} mobilization in dental pulp cells loaded with Fura-2, treated for 30 min with or without SCH79797 (2 and 20 μM), and stimulated with KLKB1. SCH79797 is an antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1). Values in (B) are means \pm SEM from three independent experiments. **, $P < 0.01$ versus control.

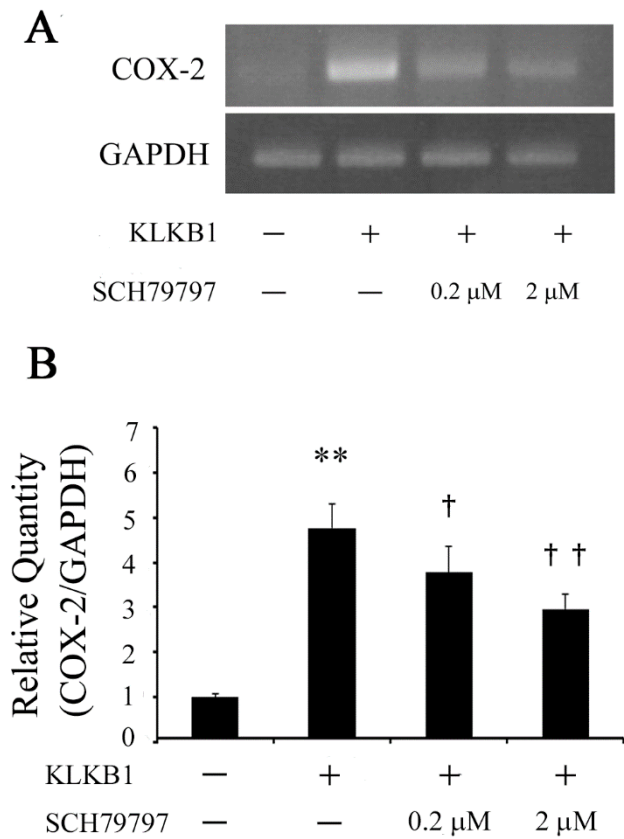


Fig. 4 SCH79797 inhibits KLKB1-dependent COX-2 mRNA expression. Human dental pulp cells were pre-incubated for 30 min with or without SCH79797 (0.2 and 2 μM) and stimulated with KLKB1. COX-2 and GAPDH expression levels were assessed by (A) RT-PCR and agarose gel electrophoresis and (B) by real-time RT-PCR. In (B), COX-2 expression was normalized to GAPDH and reported relative to the expression in unstimulated cells. Values are means ± SEM of three independent experiments. **, $P < 0.01$ versus unstimulated cells; †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$ versus cells stimulated with KLKB1 in the absence of SCH79797.

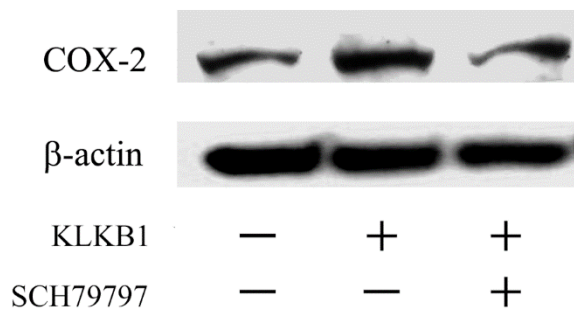


Fig. 5 Inhibition of KLKB1-dependent COX-2 protein expression by SCH79797. Human dental pulp cells were exposed for 30 min to SCH79797 and then treated for 1 h with KLKB1. Cytoplasmic extracts were assayed for COX-2 and β -actin by western blotting.

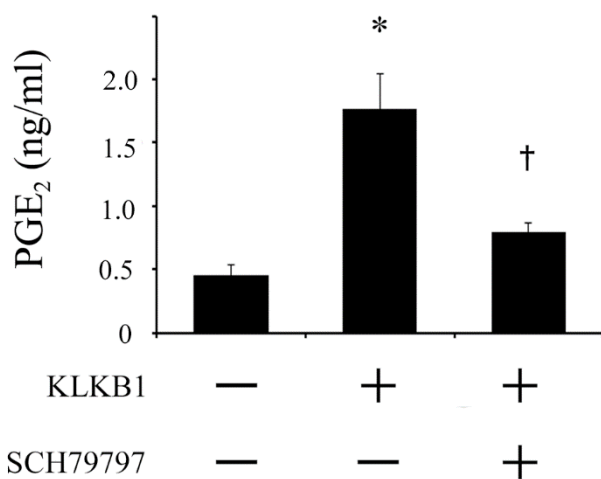


Fig. 6 KLKB1-induced prostaglandin E₂ release in the absence or presence of SCH79797. Human dental pulp cells were treated with or without 2 μ M SCH79797 for 30 min and stimulated with 1 μ g/mL KLKB1 for 1 h. Prostaglandin E₂ release into the medium was determined by enzyme-linked immunoassay. Values are means \pm SEM three independent experiments. *, $P < 0.05$ versus unstimulated cells; †, $P < 0.05$ versus cells stimulated with KLKB1 in the absence of SCH79797.

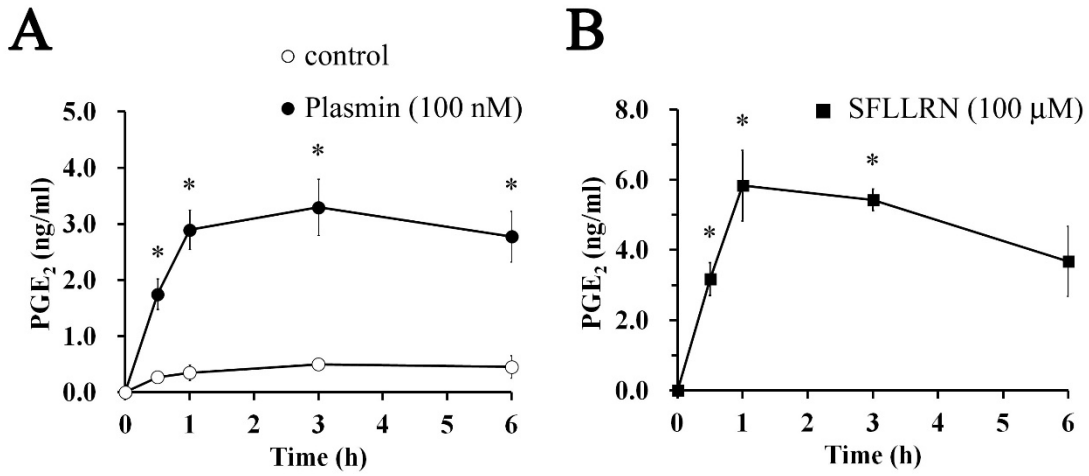


Fig. 7 Time-dependent plasmin-induced release of prostaglandin E₂. (A) Human dental pulp cells were stimulated with (●) or without (○) 100 nM plasmin. Media were collected at the indicated times. (B) Human dental pulp cells were stimulated with (■) 100 μM SFLLRN. At the end of incubation, PGE₂ levels in the media were measured by an enzyme-linked immunoassay. Values are mean ± SEM of four independent experiments. **P* < 0.05 versus control.

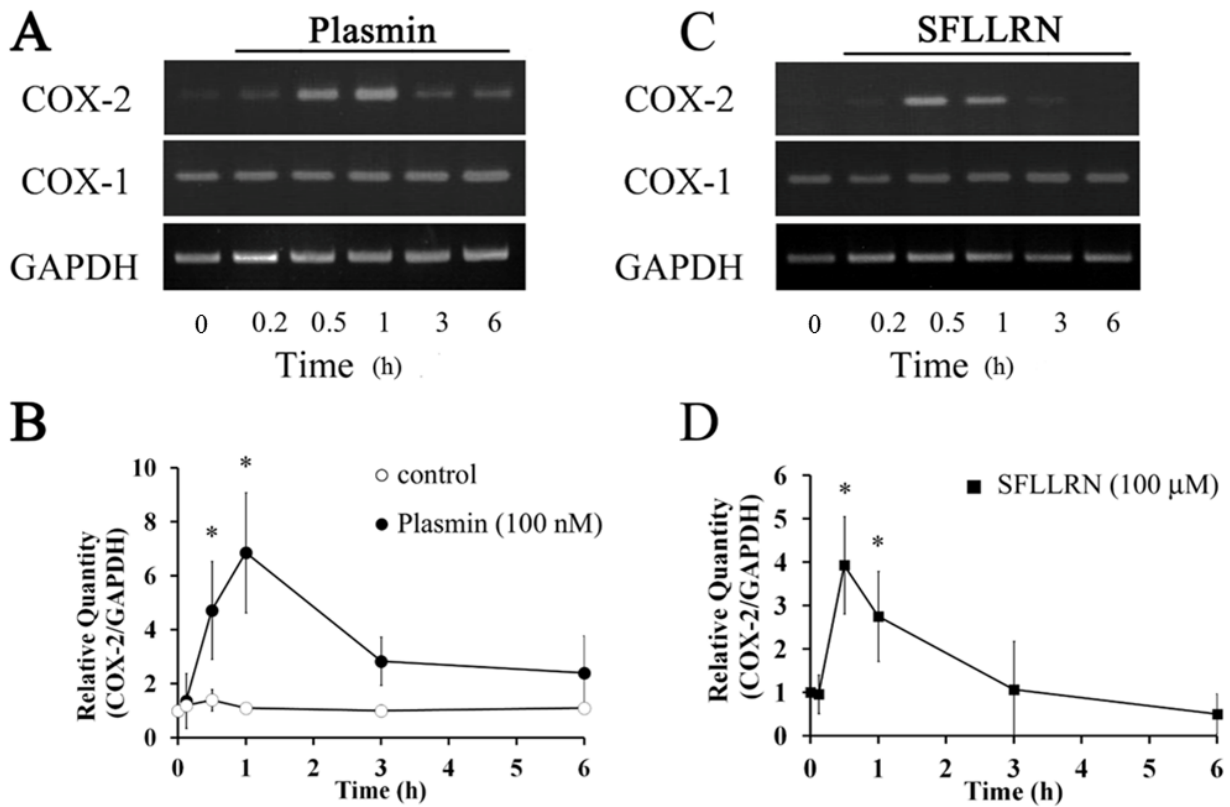


Fig. 8 Plasmin-induced expression of COX-2 mRNA. Total RNA was isolated from human dental pulp cells treated with 100 nM plasmin (A, B) or 100 μM SFLLRN (C, D) for the indicated times. (A, C) The mRNA levels of COX-2, COX-1, and GAPDH were assessed by RT-PCR. PCR products for COX-2, COX-1, and GAPDH were detected (310 bp, 289 bp, and 318 bp, respectively). (B, D) COX-2 expression was calculated as the ratio of COX-2 to GAPDH and was normalized against expression levels at 0 min of stimulation. Values are means ± SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus control.

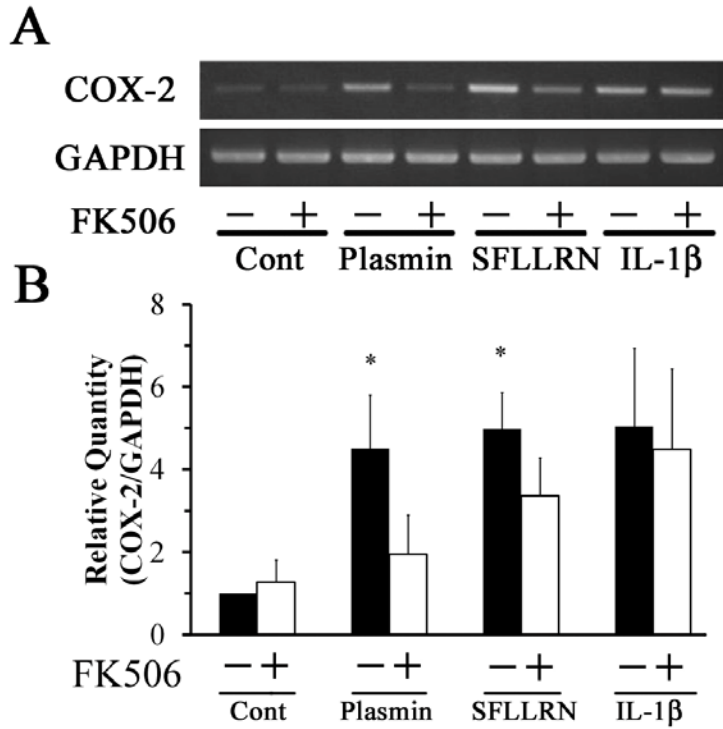


Fig. 9 Inhibition of plasmin-induced COX-2 mRNA expression by the calcineurin inhibitor FK506. Human dental pulp cells were preincubated in the absence or presence of 100 nM FK506 for 6 h. (A) The levels of COX-2 or GAPDH mRNA were assessed by RT-PCR, and PCR products for COX-2 and GAPDH were detected (310 bp and 318 bp, respectively). (B) COX-2 expression was calculated as the ratio of COX-2 to GAPDH and was normalized against the control. Values are means \pm SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus control.

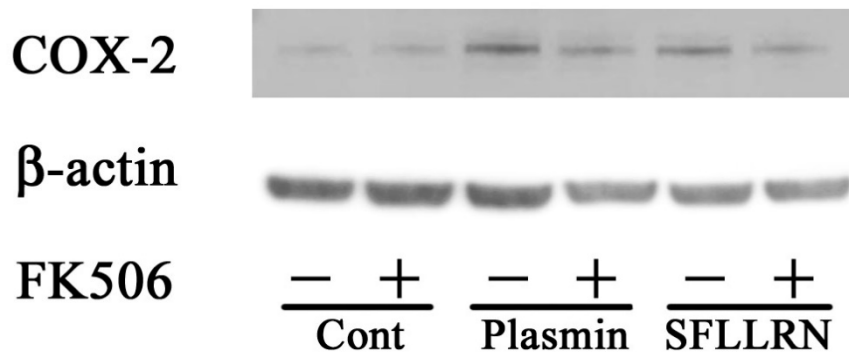


Fig. 10 Inhibition of plasmin-induced COX-2 protein expression by the calcineurin inhibitor FK506. Human dental pulp cells were treated with or without (cont) plasmin for 1 h. FK506 (100 nM) was added 6 h before stimulation. (A) Cytoplasmic extracts were prepared and assayed for COX-2 by western blotting using a COX-2-specific antibody. (B) The relative COX-2 expression level was calculated as the ratio of COX-2 to β -actin and normalized against the control. Values are means \pm SEM of three independent experiments. * $P < 0.05$ versus control.

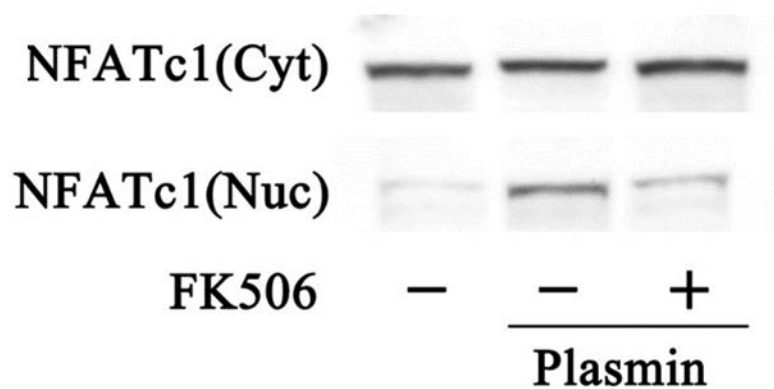


Fig. 11 Plasmin-induced translocation of NFATc1 protein from the cytosol to the nucleus. Human dental pulp cells were treated with or without (cont) plasmin for 20 min. FK506 (100 nM) was added 6 h before stimulation. The NFATc1 protein levels in the cytosol (Cyt) and nuclear (Nuc) extracts were detected by western blotting using an NFATc1-specific antibody.

Table 1 Primers for RT-PCR

Gene	Sequence	Product size (bp)
<i>COX-2</i>	Forward 5'-ATGAGATTGTGGAAAAATTGCT-3'	310
	Reverse 5'-GATCATCTCTGCCTGAGTATC-3'	
<i>COX-1</i>	Forward 5'-AGAACCGCAAGAGGTTTGGC-3'	289
	Reverse 5'-GCCGTCTTGACAATGTTAAAGC-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-ATCACCATCTTCCAGGAG-3'	318
	Reverse 5'-ATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

Table 2 Primers for Q-RT-PCR

Gene	sequence	Product size (bp)
<i>COX-2</i>	Forward 5'-CTGTAACCAAGATGGATGCAAAGA-3'	195
	Revers 5'-GTCAGTGACAATGAGATGTGGAA-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	138
	Revers 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

Plasma kallikrein promotes inflammation via PAR-1 activation and plasmin-induced COX-2 expression via calcineurin activation in human dental pulp

Tomomi Hayama

Department of Endodontics

Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key words: plasma kallikrein, plasmin, protease activated receptor-1, inflammation, dental pulp cells

ABSTRACT

Plasma kallikrein (KLKB1), a serine protease, cleaves high-molecular weight kininogen to produce bradykinin, a potent vasodilator and pro-inflammatory peptide. In addition, KLKB1 activates plasminogen and other leukocyte and blood coagulation factors and processes pro-enkephalin, prorenin, and C3. KLKB1 has also been shown to cleave protease-activated receptors (PARs) in vascular smooth muscle cells to regulate the expression of epidermal growth factor receptor.

PARs are widely distributed, especially throughout the alimentary system, and regulate various physiological processes, including exocrine secretion from the salivary, or gastric gland, pancreatic exocrine cell, motility of gastrointestinal smooth muscles, cytoprotection of gastric mucosa, and suppression of visceral pain. In addition, PAR activation triggers inflammatory responses. For example, PAR-1 also stimulates the expression of cyclooxygenase (COX) -2 and prostaglandin (PG) E₂ in myofibroblasts and cardiomyocytes.

Plasmin, a serine protease, is involved in degradation of the extracellular matrix either directly, or indirectly through activation of metalloproteases and other zymogens. Plasmin has been demonstrated to activate cell signaling, suggesting that it may also participate in the inflammatory response. Plasmin activates PAR-1 to stimulate the expression of IL-8 and release of PGE₂.

In this study, we investigated KLKB1-dependent inflammation and activation of PAR-1 in cultured human dental pulp cells. Moreover, plasmin participates in COX-2 expression and PGE₂ secretion through calcineurin activation in cultured human dental pulp cells.

These cells responded to KLKB1 stimulation by increasing intracellular Ca²⁺, upregulating COX2, and secreting prostaglandin E₂. Remarkably, SCH79797, an antagonist of PAR-1, blocked these effects. When the cells were stimulated by plasmin, PGE₂ release was clearly increased in a time-dependent manner. COX-2 mRNA and protein expression, and NFATc1 nuclear translocation were markedly enhanced by plasmin. However, in the presence of the calcineurin antagonist FK506, these effects were suppressed. Stimulation of the cells with the PAR-1 agonist SFLLRN yielded similar results as observed with plasmin treatment.

Thus, these data indicate that KLKB1 induces inflammatory reactions via PAR-1, and plasmin is involved in COX-2 production and PGE₂ secretion via calcineurin activation in the human dental pulp.