

論文審査の結果の要旨

氏名：佐 田 英 理

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Usefulness of recombinant His-ppIL- α and its specific Ab for the analysis of ppIL-1 α function

（ppIL-1 α の機能解析における His-ppIL-1 α とその特異的抗体の有用性）

審査委員：（主査） 教授 鈴木 直 人

（副査） 教授 本 吉 満

教授 白 川 哲 夫

教授 浅 野 正 岳

Alarmin とは障害を受けた細胞が、周囲の細胞に自身の置かれた危機的状況を周知し、破壊された組織の再生を促進することにより、生体の恒常性維持に寄与する物質の総称である。IL-1 α は alarmin の一種であり、細胞質内で 34 kDa の前駆体（precursor IL-1 α : pIL-1 α ）として産生される。pIL-1 α は細胞質内でカルパインなどの酵素により N 末端側の propeptide IL-1 α （ppIL-1 α ）と C 末端側の成熟型 IL-1 α （mIL-1 α : mL-1 α ）に切断される。pIL-1 α と ppIL-1 α は nuclear localizing signals（NLS）を有しており、核内に局在し、転写調節などに関与していることなどが報告されているが、ppIL-1 α を認識する特異的抗体（Ab）が存在しないため、その機能については不明な点が多い。

そこで本研究では、ppIL-1 α の機能解析を目的として ppIL-1 α に対する特異的 Ab の作製を試みた。また、sandwich enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）システムの確立を目的として、得られた特異抗体をビオチン化した。ビオチン化後の Ab は、PBS で透析し、ELISA に用いた。また、Ab の反応性及び特異性について確認するために、ヒト子宮頸がん由来細胞（HeLa）に green fluorescence protein（GFP）および GFP-ppIL-1 α の発現ベクターを transfection し、transfectant の細胞溶解液を用いて、抗 GFP Ab および今回作成した抗 ppIL-1 α Ab により Western blotting を行った。さらに、段階的に希釈した His-ppIL-1 α を用いて sandwich ELISA による検量線を作成し、さらにこれを用いて、GFP-および GFP-ppIL-1 α transfectant の細胞溶解液中の ppIL-1 α の量を測定した。NLS の存在により ppIL-1 α は主に核内に存在すると想定されるが、このことについては pcDNA および pcDNA-ppIL-1 α transfectant を用いて蛍光免疫染色により検討した。

その結果、以下の知見を得た。

1. 抗 GFP Ab により、GFP および GFP-ppIL-1 α の両者がそれぞれ 27 および 43 kDa バンドとして検出されたのに対し、抗 ppIL-1 α Ab によっては、GFP-ppIL-1 α のみが検出された。
2. 確立した ELISA システムより、段階的に希釈した His-ppIL-1 α は、濃度依存的に吸光度が減少し、検出限界は 1.15 ng（3 μ g/ml）であった。
3. 1×10^5 /24 well の HeLa 細胞に対する transfection により、GFP-ppIL-1 α transfectant は 19.2 ng/ml の ppIL-1 α を含んでいた。
4. ppIL-1 は細胞内で主に核に局在し、細胞質にも僅かに局在していた。

以上、His-ppIL-1 α を免疫原として ppIL-1 α 特異的 Ab を得、さらにこの抗体をビオチン化することにより、sandwich ELISA system を構築することができた。

歯科矯正治療に際し、歯周組織に細胞障害作用が及び、歯根膜中に存在する線維芽細胞や骨芽細胞から alarmin 分子が放出されることが予想され、臨床症状や予後に大きく関与することが考えられる。

本研究により確立された sandwich ELISA system は歯根膜中に放出される ppIL-1 α の定量を可能とし、また、recombinant His-ppIL-1 α は、in vitro 研究を通じて ppIL-1 α の機能解析に道を開くものであり、極めて有用であると考えられる。よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいものと認められる。

以 上

令和2年3月11日