

## 論文審査結果報告書

論文提出者氏名 大塚 麻衣

学位論文題目 Ameloblastin upregulates inflammatory response  
through induction of IL-1 $\beta$  in human macrophages

審査委員(主査) 竹内 弘

(副査) 松尾 拓

(副査) 臼井通彦



### 論文審査結果の要旨

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、AMBNが歯髄炎の治癒促進や骨折の治癒促進など多彩な機能をもつ可能性が明らかになってきた。今回、申請者の大塚麻衣氏は、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 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )産生に対するAMBNの影響について検証した。

マクロファージ様細胞には、ヒト単球様細胞株(U937細胞)を phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)処理により分化誘導したものを用いた。これを Escherichia coli由来LPSとリコンビナントヒトAMBN(rhAMBN)で刺激し、IL-1 $\beta$ などの遺伝子発現をreal time RT-PCR法にて、またタンパク発現をWestern blot法とELISA法を用いて解析を行った。

LPS刺激U937細胞において、IL-1 $\beta$ の遺伝子発現が上昇した。IL-1 $\beta$ の遺伝子発現は、rhAMBN単独刺激では影響を認めなかったが、LPSとrhAMBNの同時刺激により、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、活性化型caspase-1 p10と成熟型IL-1 $\beta$ の発現が上昇し、培養上清中に分泌されるIL-1 $\beta$ 量が有意に増加することもELISAの結果から明らかになった。一方、caspase-1阻害剤は、rhAMBNによるIL-1 $\beta$ の発現増強作用を抑制した。共免疫沈降実験を行ったところ、LPSとrhAMBN同時刺激によりTLR4/MyD88の会合が亢進したが、LPS単独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0.5hでERK1/2のリン酸化が上昇した。LPSとrhAMBNの同時刺激により、ERK1/2のリン酸化の持続時間が4hまで延長した。ERK1/2阻害剤を使用すると、LPSとrhAMBNの同時刺激によるIL-1 $\beta$ のタンパク発現は抑制された。

マクロファージにおける成熟型IL-1 $\beta$ の産生は、LPS誘導性IL-1 $\beta$ 前駆体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段階のステップからなる。今回、申請者らは、rhAMBNがLPS誘導性IL-1 $\beta$ の遺伝子発現を増強するとともに、活性化型caspase-1 p10の発現と成熟型IL-1 $\beta$ 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およびcaspase-1の阻害剤により、rhAMBNによるIL-1 $\beta$ の増強作用は抑制されることが明らかになった。以上の結果は、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 $\beta$ の産生を促進し、炎症応答を増強する生理学的機能をもつ可能性を示唆するもので、rhAMBNを用いた組織修復促進の機構を理解する上で、大変有意義である。

本研究の内容に関して、申請者の大塚氏に対し、主査と2名の副査から、実験に用いた細胞や試薬についてや、各実験方法から得られたデータの解釈・意義について質問したが、概ね適切な回答を得た。総じて、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。