

論 文 内 容 要 旨

題 目

Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts

(カルプロテクチンは、ヒト歯肉線維芽細胞のTLR4を介してIL-6, MCP-1の産生を誘導する)

著 者

西川泰史

内容要旨

[目的]

歯周病は歯周組織に細菌感染が生じることから始まり、組織を構築する様々な細胞や好中球等の免疫担当細胞による生体防御機構が病態を形成する炎症性疾患である。カルプロテクチンは、S100ファミリーに属するS100A8とS100A9のヘテロダイマーとして存在し、好中球の細胞質ゾルの40%を占める分子である。またカルプロテクチンは炎症巣に多く検出され、関節リウマチや炎症性腸疾患との関連も報告されている。一方、歯科領域においては、口腔上皮細胞によって産生されることが報告されており、さらに*Porphyromonas gingivalis*菌の増殖を抑制する抗菌作用を併せ持つことも知られている。これまで我々の研究室では、カルプロテクチンが歯周病患者の歯肉溝滲出液中に有意に高く検出されることを報告してきた。歯肉線維芽細胞は主要な歯周組織構成細胞であり、歯周病の炎症反応を制御する役割を持つことが明らかになってきた。しかし、カルプロテクチンが歯肉線維芽細胞に対してどのような作用を及ぼすかは不明である。そこで本研究の目的は、カルプロテクチンによるヒト歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の産生機序を明らかにすることとした。

[方法]

1.細胞

ヒト歯肉線維芽細胞CRL-2014はATCC社から購入したものをを用いた。培養はFBSを10%の割合に含むDMEMを用いて行った。

2.試薬

S100A8, S100A9はATGen社から購入し、Kwonらの記載*に従って、カルプロテクチンを調製した。なお細胞障害作用は、通法に従いMTT法によって評価した。

3.受容体mRNA発現の検討

カルプロテクチンの標的受容体であるTLR4およびRAGEのmRNA発現の有無は、通法に従いRT-PCR法によって評価した。

4.炎症関連蛋白の産生性の検討

S100A8, S100A9およびカルプロテクチンで24時間刺激した細胞の上清をサンプルとして回収し、IL-6, MCP-1の産生濃度を市販のELISA Kit (R&D) を用いて測定した。

5.細胞内シグナル伝達系の検討

カルプロテクチンの細胞内シグナル伝達系はNF- κ B, MAPKs(ERK, JNK, p38MAPK)の各種阻害剤を用いて、IL-6, MCP-1の産生性を調べることで確認した。また、細胞内シグナルにおけるTLR4の関与についてはTLR4阻害剤あるいはTLR4 siRNAを用いてTLR4をノックダウンした細胞を用いて、同様に産生性を調べることで評価した。

6.統計解析

各群における有意差はStudent's *t*-testまたはANOVA Tukey-HSD分析を用い、P値が0.05未満を有意差ありと判定した。

[結果]

- 1.ヒト歯肉線維芽細胞は恒常的にTLR4 mRNAを発現しているが、RAGE mRNAは発現していなかった。
- 2.カルプロテクチンは歯肉線芽細胞のIL-6, MCP-1の産生性を有意に亢進した。
- 3.MAPKs, NF- κ B, TLR4を阻害することでカルプロテクチン誘導性のIL-6, MCP-1の産生は有意に抑制された。また、TLR4ノックダウン細胞においても同様にそれらの炎症蛋白の産生性は抑制された。

[考察及び結論]

ヒト歯肉線維芽細胞において、カルプロテクチンはTLR4を介してMAPKsおよびNF- κ Bをリン酸化し、IL-6およびMCP-1の産生を誘導することが明らかになった。すなわち、カルプロテクチンは歯周病を増悪させる作用を有することが示唆された。

(*Kwon et al, Mol Cells, 2013)