

学 位 論 文

Anti-inflammatory effects of phosphophoryn

(象牙質基質タンパク質 phosphophoryn の抗炎症機能)

学位申請者 中西 惇

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻 歯学専門プログラム

2018 年度

主指導教員 柴 秀樹 教授

(医歯薬保健学研究科 歯髓生物学)

謝 辞

本研究のご指導及び御校閲を賜りました本学医歯薬保健学研究科歯髓生物学研究室 柴 秀樹 教授に謹んで感謝の意を表します。

また本研究の遂行ならびに論文作成においてご指導、ご鞭撻いただきました本学硬組織代謝生物学 吉子 裕二 教授、口腔外科学 武知 正晃 准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行ならびに論文作成に際し、直接御指導いただきました東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野 鈴木 茂樹 講師に深く感謝いたします。

また、常日頃より心温かいご支援を頂きました本学大学院医歯薬保健学研究科歯髓生物学研究室内の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた父 恵治、母 葉子をはじめ家族の皆様心より感謝申し上げます。

2019 年 3 月
広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻
歯髓生物学研究室

中西 惇

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 144 回 日本歯科保存学会春季学術大会
(2016 年 6 月 9, 10 日、宇都宮)

第 147 回 日本歯科保存学会秋季学術大会
(2017 年 10 月 26, 27 日、盛岡)

目次

第1章 序論	1
第2章 実験	3
第1節 組み換え Phosphoryn (PP) の精製	3
第1項 概要	3
第2項 材料および方法	3
1) 組み換え PP の精製	
2) SDS-PAGE、Stains-all 染色及びウェスタンブロット法	
第3項 結果	4
第2節 <i>in vitro</i> 炎症モデルにおける組み換え PP の抗炎症機能	6
第1項 概要	6
第2項 材料および方法	6
1) 細胞および細胞培養	
2) THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導	
3) 各種炎症性サイトカイン (<i>IL-1β</i> , <i>IL-8</i> , <i>TNF-α</i>) の遺伝子発現	
4) 培養上清中の <i>TNF-α</i> 分泌量	
5) LPS 依存性 <i>TNF-α</i> 遺伝子発現に及ぼす TLR 4 インヒビター および NF- κ B シグナルインヒビターの影響	
6) 投与組み換え PP の細胞局在	
7) 組み換え PP と LPS との結合量	
8) 統計学的解析	

第3項	結果	9
第3節	<i>in vivo</i> 炎症モデルにおける組み換え PP の抗炎症機能	11
第1項	概要	11
第2項	材料および方法	11
	1) 敗血症モデルマウスの作製ならびに炎症評価法	
	2) 組織学的検討	
	3) 組織内の各種炎症性サイトカイン遺伝子発現の比較	
	4) 統計学的解析	
第3項	結果	13
第4節	組み換え PP の抗炎症機能領域の探求	15
第1項	概要	15
第2項	材料および方法	15
	1) 改変型組み換え PP の作製	
	2) 各種改変型組み換え PP の <i>in vitro</i> 炎症モデルでの抗炎症効果	
	3) 各種改変型組み換え PP の <i>in vivo</i> 炎症モデルでの抗炎症効果	
第3項	結果	16
第3章	考察	18
第4章	総括	22

参考文献 24

表 30

図の説明 31

図 39

第1章 序論

齶蝕、アブフラクション等の歯の硬組織疾患によってエナメル質、象牙質に実質欠損が生じ象牙質表層が口腔内に露出すると、露出した象牙細管を通して歯髓組織が口腔内の細菌、温熱、化学等の刺激にさらされる。このような外来刺激に暴露された歯髓組織では、まず初めに象牙芽細胞周囲にマクロファージや樹状細胞等が浸潤し初期炎症反応が惹起される [1]。しかしながら、このような外来刺激に暴露された歯髓組織において、急性歯髓炎が必ずしも発症するとは限らず、自発痛、冷温水痛等の自覚症状が生じることなく経過することが臨床的に多く観察される。

このような臨床的経験から、外来刺激に対する歯髓組織の抗炎症制御のメカニズムにおいて、反応性象牙質形成による歯髓組織の物理的保護のみならず、炎症の初期反応を制御し不可逆性歯髓炎発症を抑制する因子が象牙質歯髓複合体内に存在することが想定される。これまでに、歯髓組織中に存在する抗炎症作用を示す因子の探索が行われ、Matrix Metalloproteinase-3 やアミノ酸の一種であるグルタミンが、グラム陰性菌由来の起炎物質である Lipopolysaccharide (LPS) で刺激を行った歯髓細胞からの炎症性サイトカインの発現亢進を抑制することが報告されている [2, 3]。

ヒト象牙質の組成は質量比で無機質が約 70%、有機質が約 20%、水分が約 10% である。有機質に含まれる主要なタンパク質は Type I collagen であり、重量比で有機質の約 90% を占める [4]。非コラーゲン性タンパク質のうち最も多く存在するものは Phosphoryn (PP) であり、質量比でその約 50% を占めている [5~10]。PP はヒト常染色体 4q21 に存在する *Dentin Sialophosphoprotein (DSPP)* 遺伝子にコードされる DSPP の開裂産物であ

り、 DSPP は Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) ファミリーに属している [11] 。象牙質に含まれる 主要な SIBLING ファミリーには、DSPP の他に Dentin matrix protein 1 (DMP-1) が存在し、これら SIBLING タンパク質は象牙質基質形成やその石灰化に重要な働きを担うことが報告されている [12] 。また PP は細胞内のシグナルを活性化することによって NIH3T3 細胞、 MC3T3-E1 細胞などの分化を誘導する因子としても機能する [13, 14] 。

最も多量に存在する非コラーゲン性タンパク質である PP は象牙質のみならず歯髄組織の細胞外基質中にも恒常的に存在していることから [15] 、齲蝕等の歯の硬組織疾患の初期段階において象牙質が脱灰した際には、PP は溶出し露出した象牙細管を通じて歯髄組織内に流入し [16 ~ 18] 、外来刺激に暴露された歯髄組織における炎症の初期反応を抑制する因子として機能している可能性が考えられる。

そこで本研究では PP が歯髄組織の恒常性維持に寄与する因子であることを明らかにするために、種々の組み換え PP を作製し、 *in vitro* と *in vivo* で PP の抗炎症機能を評価した。

第2章 実験

第1節 組み換え PP の精製

第1項 概要

組み換えタンパク質発現用哺乳類細胞の培養上清から、液体クロマトグラフィーシステムを併用した陰イオンクロマトグラフィー及び 6xHis タグアフィニティー精製法によって各種組み換えタンパク質を作製・精製した。

第2項 材料および方法

1) 組み換え PP の精製

組み換え PP の作製・精製は当研究室の先行研究にしたがって行った [19]。すなわち、マウス切歯から抽出した cDNA を基に作製した組み換え PP ベクターを哺乳類細胞に遺伝子導入し、得られた培養無血清上清から組み換え PP (rPP) を精製した。

得られた無血清培養上清を Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) を使用した陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて粗精製した。続いて、粗精製組み換え PP 溶出画分を Hi Trap Q HP Column (GE Healthcare UK Ltd.) を使用した陰イオンクロマトグラフィーによってさらに分画・精製した。続いて、得られた PP 溶出分画を His Trap HP Column (GE Healthcare UK Ltd.) を用いて His タグアフィニティー精製を行い、さらに濃縮精製した。これら Hi Trap Q HP Column および His Trap HP Column を用いたクロマトグラフィーには、液体クロマトグラ

フイーシステム (AKTA explorer 10S GE Healthcare UK Ltd.) を利用した。全工程を通じて、分画時の PP 溶出画分の同定は組み換え PP の C 末端アミノ酸残基を認識するウサギ抗 PP ポリクローナル抗体 (抗 PP 抗体) [19] を用いたウェスタンブロット法によって検出を行った、最終的に精製した組み換え PP を純水に対して透析した後に凍結乾燥を行った。組み換えタンパク質の純度を Stains-all 染色 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) で検討し、濃度を BCA assay kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

2) SDS-PAGE、Stains-all 染色及びウェスタンブロット法

組み換え PP タンパク質を dithiothreitol で変性させ NuPAGE® Bis-Tris 4-12% gel (Life Technologies, Carlsbad, CA), MOPS buffer (Life technologies) で電気泳動し分離した。ゲルを 25 % イソプロパノールで固定した後に、Stains-all で染色した。また同様に分離した精製タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、抗 PP 抗体を用いて組み換え PP を検出した。

第 3 項 結果

培養上清から Q Sepharose Fast Flow を用いて粗精製を行った PP 溶出画分を、さらに AKTA 10S システムを併用した陰イオンクロマトグラフィーで分画した結果、0.375 M NaCl から 0.430 M NaCl 濃度 (分画 8~11) で溶出される分画において抗 PP 抗体を用いたウェスタンブロット法でシグナルが特に強く検出されたことから (図 1)、この範囲の分画溶液を His binding buffer に対して透析し His タグアフィニティー精製に用いた。AKTA 10S システムを利用した His タグアフィニティー精製を行った結果、単一ピークの溶出分画を示し、ステインズオール染色を行ったところ単一バンドを示した

ことから純度の高い組み換え PP タンパク質を精製するに至った (図 2)。液体クロマトグラフィーシステムを利用することにより、バッチ法で精製していた従来法と比較し高純度の組み換え PP の精製が行えることが明らかとなった (図 3)。

第2節 *in vitro* 炎症モデルにおける組み換え PP の抗炎症機能

第1項 概要

組み換え PP の抗炎症作用に関して、LPS 刺激マクロファージ様細胞を用いた *in vitro* 炎症モデルにおいて検討を行った。LPS 刺激マクロファージ様細胞において亢進する *Interleukin-1β (IL-1β)*, *Interleukin-8 (IL-8)*, *Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)* の各種炎症性サイトカイン遺伝子発現、および培養上清中の TNF-α 分泌量について、組み換え PP 投与による影響を調べた。さらに LPS 刺激によって活性化される LPS 受容体 Toll-like receptor 4 (TLR 4) 依存性細胞内シグナルへの組み換え PP の関与を検討した。続いて、組み換え PP のマクロファージ様細胞内への取り込み様式や局在、および LPS と組み換え PP との直接的な結合作用を検証した。

第2項 材料および方法

1) 細胞および細胞培養

ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1 細胞) を実験に供した。THP-1 細胞は非働化した 10 % fetal bovine serum (FBS) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan)、1 % penicillin-streptomycin (PS) (Life Technologies)、1 % L-glutamine (L-Gln) (Life Technologies) 及び 1mM Sodium Pyruvate (Life Technologies) 含有 RPMI 1640 medium (Life Technologies) を用いて培養した。細胞株は 5 % CO₂, 37 °C の条件下で培養維持した。

2) THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導

サブコンフルエントの THP-1 細胞を継代培養後、24 well プレート、1 well あたり 1×10^6 / ml の濃度となるよう播種し、50.8 nM の Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Aldrich) によって 24 時間刺激し、マクロファージ様細胞へ分化誘導した。

3) 各種炎症性サイトカイン (*IL-1 β* , *IL-8*, *TNF- α*) の遺伝子発現

THP-1 細胞をマクロファージ様細胞へ分化誘導後に、無血清 RPMI 1640 培地にて二回洗浄した後に、無血清 RPMI 1640 培地下で 様々な濃度の組み換え PP (0.01 ~ 1 μ M) と共に LPS (10 ng / ml) (Sigma Aldrich) で刺激した。24 時間培養後、RNAiso Plus (TAKARA BIO Inc., Otsu, Japan) を用いてマクロファージ様細胞から total RNA を抽出した。抽出した total RNA から ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成し、得られた cDNA を鋳型として各種プライマーを用いた quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法によって炎症性サイトカイン (*IL-1 β* , *IL-8*, *TNF- α*) 遺伝子発現を調べた。Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として相対的に定量をおこなった。実験に用いたプライマーの配列を (表 1) に示す。

4) 培養上清中の TNF- α 分泌量

マクロファージ様細胞を 3) 同様に刺激した後に培養上清を回収した。回収した培養上清中の TNF- α 量を Human TNF- α Quantikine ELISA Kit (R&D systems Inc., Minneapolis, MN) を用いて測定した。

5) LPS 依存性 *TNF- α* 遺伝子発現に及ぼす TLR 4 インヒビターおよび NF- κ B シグナルインヒビターの影響

マクロファージ様細胞を LPS で刺激する際に (上記 3)) 組み換え PP の他に TAK242 (Sigma Aldrich) (TLR 4 inhibitor: 10 μ M), parthenolide (Sigma Aldrich) (NF- κ B signal: 1 μ M), BAY (Sigma Aldrich) (NF- κ B signal: 10 μ M), JSH-23 (Sigma Aldrich) (NF- κ B signal: 10 μ M) を同時投与し、*TNF- α* 遺伝子発現を qPCR 法で調べた。

6) 投与組み換え PP の細胞局在

マクロファージ様細胞を LPS と共に組み換え PP (1 μ M) で刺激した。0.5 ~ 12 時間後にマクロファージ様細胞へ結合あるいは取り込まれた組み換え PP をウェスタンブロッティング法と蛍光免疫染色法によって調べた。ウェスタンブロッティング法はマクロファージ様細胞の lysate と、抗 PP 抗体を用いて行った。さらに、細胞内外での組み換え PP の局在および TLR 4 との共局在を検討するために、投与 24 時間後に 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液で固定し、Triton X-100 (Sigma Aldrich) で透過膜処理を行った後に、抗 PP 抗体およびマウス抗 TLR 4 モノクローナル抗体 (abcam, Cambridge, England) を用いて蛍光免疫染色を行った。

7) 組み換え PP と LPS との結合量

組み換え PP (0 ~ 100 pmol) を 96 well プレートに添加し 16 時間静置した。非接着余剰組み換え PP を PBS で洗浄除去し、Pierce Protein-Free (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA) を用いて室温 1 時間にてブロッキングを行った。引き続き、1ng のビオチン化 LPS

(InvivoGen, San Diego, CA) を各 well に添加し、ウェル上の組み換え PP とビオチン化 LPS との結合を streptavidin-HRP (Sigma Aldrich) および TMB 溶液 (Nacalai Tesque) を用いた発色量で調べた。

8) 統計学的解析

得られたデータを平均 ± 標準偏差 (SD) で示し、分散分析 (ANOVA) と Tukey の方法による多重検定を行った。有意確率は $p < 0.05$ とした。

第 3 項 結果

組み換え PP は LPS 刺激によって亢進されたマクロファージ様細胞における *TNF- α* 遺伝子発現を濃度依存的に抑制した (図 4)。さらに、LPS 刺激による *IL-1 β* , *IL-8* 遺伝子の発現促進も、*TNF- α* 同様組み換え PP 投与によって有意に抑制された (図 5)。続いて、LPS 刺激時のマクロファージ様細胞からの *TNF- α* 分泌量に対する組み換え PP 同時投与の影響を検討したところ、濃度依存的に *TNF- α* 分泌が抑制された (図 6)。

次に、マクロファージ様細胞における組み換え PP による LPS 依存性 *TNF- α* 遺伝子発現抑制能を TLR 4 インヒビターおよびその主要下流シグナルカスケードである NF- κ B シグナルに対する特異的インヒビターと比較した所、PP 同様、各インヒビターによって LPS 依存性 *TNF- α* 遺伝子発現量は抑制された (図 7)。

次に、投与した組み換え PP の局在を検討するため、ウェスタンブロット法解析により投与後 0.5 時間から 12 時間において、細胞 lysate 分画に、組み換え PP が検出されるかを検討したところ、投与後 1 時間から組み換え PP

が検出され、12 時間まで時間依存的にその結合量が増加した (図 8)。続いて、投与した組み換え PP の投与後 24 時間における細胞局在を、共焦点顕微鏡を用いた蛍光細胞免疫染色にて検討したところ、組み換え PP はマクロファージ様細胞の細胞膜近傍に局在し、細胞膜上の TLR 4 と共局在を示す組み換え PP も観察された (図 9)。

これらの結果から、投与された組み換え PP は LPS と細胞膜上または近傍で介合し LPS の TLR4 への結合を抑制することで、LPS 依存性の炎症性反応を抑制する可能性が示唆された。次に、組み換え PP と LPS の直接的介合の有無を検討するため、異なった量の組み換え PP で 96 ウェルプレートをコートし、各ウェルのビオチン化 LPS の結合量を検討したところ、LPS の組み換え PP への結合量は組み換え PP の量依存的に増加することが明らかとなった (図 10)。

第3節 *in vivo* 炎症モデルにおける組み換え PP の抗炎症機能

第1項 概要

D-galactosamine (D-GalN) をマウスに投与すると LPS に対する感受性が LPS 単独群と比較して約 10 万倍亢進する。この亢進を利用して、LPS と D-GalN の同時投与によって誘発される致死性肝炎を伴う敗血症モデルが広く用いられている [20]。そこで、LPS 依存性炎症反応に対する組み換え PP の抑制効果を *in vivo* で検討するため、組み換え PP 投与が D-GalN / LPS 誘導性マウス敗血症モデルにおける致死性炎症を抑制できるかについて検討した。致死性炎症の抑制については生存率、肝臓の病理組織学的観察、炎症組織において活性化されたマクロファージや樹状細胞から放出されることが知られている High mobility group box 1 (HMGB1) の肝臓における発現 [21]、および肝臓組織内における各種炎症性サイトカインの遺伝子発現によって評価した。

第2項 材料および方法

1) 敗血症モデルマウスの作製ならびに炎症評価法

実験には雄の C57/BL6 J Jcl マウス (6~8 週齢、体重 20~25g) を用いた。動物実験は広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設に基づいて行った。D-GalN (800 mg / kg) と LPS (1 μ g / kg) を腹腔内投与し、敗血症モデルマウスを作製した。組み換え PP 投与群では、組み換え PP (0.1 μ mol / kg) 投与後

30 時間までの生存率を 5 時間ごとに算出した。コントロールとして、0.1 $\mu\text{mol} / \text{kg}$ の組み換え DMP-1 を使用した。

2) 組織学的検討

1) の方法に従い、D-GalN / LPS とともに組み換え PP あるいは組み換え DMP-1 を投与し、7.5 時間後に安楽死させ肝臓を摘出した。摘出した肝臓を肉眼で観察した後に、4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液にて室温 1 時間、さらに 4 °C 1 時間で固定した。固定後 70 ~ 90 % スクロース・リン酸緩衝溶液にて脱水し、O.C.T. コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co.Ltd., Tokyo, Japan) にて包埋を行った後に、クリオスタットを用いて薄切切片 (6 μm) を作製した。続いて、作製した凍結組織切片に H-E 染色を行った。またラビット抗 HMGB 1 ポリクローナル抗体 (GeneTex, Inc, Irvine, CA) を用いた蛍光免疫組織検討を行った。

3) 組織内の各種炎症性サイトカイン遺伝子発現の比較

1) の方法に従い、D-GalN / LPS とともに組み換え PP あるいは組み換え DMP-1 を投与し、7.5 時間後に安楽死させ肝臓を摘出した。摘出した肝臓を液体窒素で直ちに凍結し、RNAiso Plus 溶液中で超音波破碎を行った後に total RNA を抽出した。得られた total RNA から ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix を用いた逆転写反応を行い cDNA を作製し、これを鋳型として qPCR を行い、各種炎症性サイトカイン (*IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α*) の遺伝子発現を比較検討した。GAPDH 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として相対的に定量をおこなった。実験に用いたプライマーの配列を (表 2) に示す。

4) 統計学的解析

生存曲線に関して log-rank 検定を行った。(有意確率を $P<0.05$)。その他の得られたデータに関しては平均 ± 標準偏差 (SD) とし、分散分析 (ANOVA) と Tukey の方法による多重検定を行った。有意確率は $P<0.05$ とした。

第 3 項 結果

LPS 投与群 (n=18) の生存曲線は経時的に低下し、投与後 30 時間においては 7% に至った (図 11)。組み換え PP を前投与 (n=15) することによって投与後 30 時間において生存率は 66% となり有意に改善を示した (図 11)。一方、組み換え DMP-1 を前投与しても生存率は改善しなかった (図 11)。

続いて、肝臓の肉眼所見を比較したところ、LPS 投与群では、投与後 7.5 時間では肝臓の顕著な鬱血、肥大を示すのに対して、LPS / 組み換え PP 投与群ではこれらの所見が改善されていた (図 12)。一方で LPS / 組み換え DMP-1 投与群では鬱血、肥大は改善しなかった (図 12)。H-E 染色による組織学的解析では、LPS 投与群においては肝小葉の肝細胞の正常な配列が崩壊しているが、LPS / 組み換え PP 投与群では細胞配列が保たれていた (図 13)。LPS / 組み換え DMP-1 投与群では、細胞配列は崩壊しており、LPS / 組み換え PP 投与群で観察されたような配列の改善は観察されなかった (図 13)。蛍光免疫組織染色法にて HMGB-1 の肝臓組織中での発現を検討したところ、LPS 投与群と比較して、LPS / 組み換え PP 投与群では HMGB-1 陽性シグナルの低下を認めた (図 14)。各群の肝臓組織における各種炎症性サイトカイン (*IL-6*, *IL-1β*, *TNF-α*) の遺伝子発現を検討したところ、LPS 投与

群で上昇した各遺伝子発現は、組み換え PP 投与によって有意に抑制されたが、組み換え DMP-1 投与群では抑制されなかった (図 15)。

第 4 節 組み換え PP の抗炎症機能領域の探求

第 1 項 概要

PP は高度にリン酸化された約 200 の連続したセリンーセリンーアスパラギン酸繰り返し配列 (SDrr) とアルギニンーグリシンーアスパラギン酸 (RGD) からなるインテグリン結合配列が種を超えて高度に保存されている [22]。本研究では、SDrr 領域が PP の抗炎症機能発現に影響をおよぼしているかについて検討した。これまで当研究室で作製した SDrr 領域を欠失または変異させた種々の組み換え PP および SDrr 合成ペプチドを利用して、PP の抗炎症作用との関連について前節までと同様の方法によって検討した。

第 2 項 材料および方法

1) 改変型組み換え PP の作製

組み換え PP のアミノ酸配列を示す (表 3)。前節まで使用してきた組み換え PP (全長組み換え PP, PP-full) と比較して SDrr 繰り返し配列が 63.5% 欠失したものを組み換え PP-middle、SDrr がほぼ全て欠失したものを組み換え PP-short とした [23]。これらタンパク質を組み換え PP 同様に精製し本実験に供した。

2) 各種改変型組み換え PP の *in vitro* 炎症モデルでの抗炎症効果の検討

各種改変型組み換え PP の炎症性サイトカイン遺伝子発現、TNF- α 分泌量、LPS との結合能を、第 2 節、第 2 項 3), 4), 7) と同様の方法で調べた。さらに SDrr 繰り返し配列の化学合成ペプチド (表 4) を用いて SDrr が

マクロファージ様細胞での LPS 依存性 TNF- α 分泌におよぼす影響を調べた。

3) 各種改変型 組み換え PP の *in vivo* 炎症モデルでの抗炎症効果

各種改変型 組み換え PP の *in vivo* 炎症モデルにおける抗炎症効果について、第 3 節、第 2 項 1) と同様の方法で検討した。

第 3 項 結果

in vitro 炎症モデルにおいて、組み換え PP-middle および組み換え PP-short は、組み換え PP (組み換え PP-full と同義) と同様に LPS 依存性の TNF- α の遺伝子発現 (図 16) および培養上清中の分泌量 (図 17) を LPS 刺激群と比較して有意に抑制したが、LPS / 組み換え PP, LPS / 組み換え PP-middle, LPS / 組み換え PP-short 投与群間で有意差は認められなかった (図 16, 17)。またこれら改変型組み換え PP へのビオチン化 LPS の結合量は、いずれも促進された (図 18)。組み換え PP-full と組み換え PP-short においては濃度に依存して結合量が増加した (図 18)。化学合成 SDrr ペプチドはいずれの濃度においても LPS 依存性の TNF- α 分泌量の抑制効果を示さなかった (図 19)。これら結果より、PP の *in vitro* での抗炎症能は SDrr 領域非依存的であることが示された。

次に、これら改変型組み換え PP の *in vivo* 炎症モデルにおける LPS 抑制能を検討したところ、LPS 投与群 (n=18) では 30 時間後の生存率 7% であるのに対して、LPS / 組み換え PP-full 投与群 (n=15) では 66%、LPS / 組み換え PP-middle 投与群 (n=10) では 50% といずれも有意な生存率の改善を示した。しかしながら LPS / 組み換え PP-short 投与群 (n=10) では

20% と改善傾向を示したものの LPS 投与群と比較して有意な生存率の改善は認めなかった (図 20)。

第3章 考察

本研究で得られた結果から、液体クロマトグラフィーシステムの併用によって従来法と比較してより高純度な組み換え PP の精製が可能になった (図 1, 2, 3)。PP は LPS 刺激マクロファージ様細胞からの炎症性サイトカインの発現、および分泌を抑制することを示した (図 4, 5, 6)。これまでに生体内在物質で LPS 刺激によるマクロファージ様細胞の炎症反応を抑制する代表的な物質としてラクトフェリンが知られている [24]。ラクトフェリンは生体内に恒常的に存在しており、さらに感染等により炎症が惹起された好中球等の細胞から血中へ能動的に放出される [25 ~ 27]。放出されたラクトフェリンの抗炎症機能はマクロファージ等の免疫応答細胞の細胞内外における受容体や細胞内シグナル伝達の制御によって発揮される [28 ~ 31]。TLR 4 を発現しているマクロファージ等の免疫担当細胞の周囲におけるラクトフェリンは LPS と結合することで LPS と TLR4 との結合によって亢進する細胞内のシグナルを阻害し、TNF- α 等の炎症性サイトカイン分泌抑制を抑制する。本研究では組み換え PP は LPS に対して直接的な結合能を有すること (図 10)、および *in vitro* 炎症モデルにおいて投与した組み換え PP は細胞膜近傍に局在し、その一部は TLR 4 と共局在していること、および組み換え PP、TLR 4 特異的インヒビター、および NF- κ B 特異的インヒビターは炎症性サイトカイン遺伝子発現抑制能を有することを示した (図 7, 8, 9)。このことから、組み換え PP は細胞膜近傍にて LPS と TLR4 との結合を阻害することで細胞内の NF- κ B を介するシグナル伝達を抑制している可能性が示唆された。

組み換え PP の前投与はマウスモデルにおける D-GalN / LPS 誘導性の致死を有意に抑制した (図 11)。マウスモデルにおける D-GalN / LPS 誘導性

の致死は重篤な肝臓の臓器不全に由来する。これは D-GalN 投与による肝細胞における核酸合成の阻害および LPS 刺激による肝臓組織中の免疫応答細胞からの TNF- α 分泌による肝細胞障害や肝細胞のアポトーシスに起因する [32 ~ 34]。本研究における肝臓組織の免疫組織学的観察および肝臓組織内における各種炎症性サイトカインの遺伝子発現の結果から、組み換え PP 前投与を行うことで D-GalN / LPS 投与によって亢進する肝臓での炎症反応が有意に抑制されることが示された (図 12, 13, 14, 15)。 *in vitro* での結果を踏まえた上で、組み換え PP の肝臓組織における炎症抑制のメカニズムとして以下 2 つの可能性を疑った。一つは腹腔内に投与した組み換え PP が血液中に移行した後に肝臓組織へ分布し、肝臓組織中で LPS 刺激により惹起される常在するマクロファージや Kupffer 細胞、あるいは血液中から肝臓組織内に浸潤してきたマクロファージの炎症反応を抑制している可能性である。もう一つは、腹腔内に投与された LPS が血液中に吸収されるまでの過程において、組み換え PP と結合することで、LPS の血液中への吸収が阻害されている可能性である。前者のメカニズムを明らかにするために組み換え PP の N- 末端側を Alexa-488 で蛍光標識を行い、組み換え PP 投与後の肝臓組織内の PP 集積の有無を組織切片上で観察する予備実験を行ったが、この実験では肝臓組織内で蛍光標識した組み換え PP は観察されなかった。後者の可能性を追求していくためには、第一に投与した組み換え PP と LPS の血中濃度の測定が必要である。

組み換え PP の抗炎症機能領域に関して PP の有する特徴的な SDrr の長さに着目した。 *in vitro* 炎症モデルにおいて、いろいろな長さの SDrr 有する各種改変型組み換え PP は、SDrr の長さに関係なく抗炎症作用および LPS との結合能を示した (図 16, 17, 18)。さらに化学合成 SDrr ペプチドを

用いた実験からも SDrr 単独では抗炎症作用を示さなかった (図 19)。一方 *in vivo* 炎症モデルでは異なる長さの SDrr を有する各種改変型組み換え PP は SDrr の長さに依存的な抗炎症作用を示し、さらに SDrr がほぼ全て欠失した組み換え PP-short については有意な抗炎症作用を示さなかった (図 20)。このように、組み換え PP は *in vitro* では SDrr 長非依存的な抗炎症作用を、一方で *in vivo* では SDrr の長さに依存的な抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

in vivo で SDrr の長さに依存的な抗炎症作用が生じた理由としては、腹腔内に投与した組み換え PP の血中への移行等の薬理学的作用に SDrr の長さが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、D-GalN / LPS 誘導性の敗血症モデルにおいて炎症反応の LPS / TLR 4 シグナルの活性化を直接的なターゲットとせず敗血症の抑制効果を示す物質も報告されている [35 ~ 37]。すなわち、acteoside や human epidermal growth factor の前投与は TNF- α 分泌量の抑制効果は示さないが、TNF- α 刺激による肝細胞のアポトーシス亢進を抑制することで肝臓組織障害を改善する。このことから PP の SDrr 領域がこれらの物質と同様に、炎症反応においてマクロファージ等の細胞の LPS / TLR 4 シグナルの活性化の抑制とは異なる作用により敗血症の抑制効果を有する可能性も考えられる。

PP は RGD のインテグリン結合配列と、SDrr という二つの特徴的な領域を持つことがアミノ酸配列から明らかとなっており、生体に存在するタンパク質の中で最も酸性度の高いタンパク質の一つであるとされる [22]。象牙質形成時、PP の前駆物質である DSPP は象牙芽細胞から分泌後、その多くが bone morphogenetic protein-1 (BMP1) によって N-末端側の Dentin sialoprotein (DSP) と C-末端側の PP の 2 つのタンパク質に開裂される

[38]。PP は歯髄細胞の RGD 配列を介して象牙芽細胞への分化誘導、また SDrr 中のセリンは高度にリン酸化修飾を受けることから高いカルシウム結合能を示し、PP が象牙質の細胞外基質の石灰化に重要な因子として働くと考えられている [39 ~ 44]。このことから PP の生体内での機能として、象牙質等の硬組織での石灰化誘導能が着目されてきたが、近年、DSPP が唾液腺や肝臓、腎臓や肺などの軟組織にも恒常的に発現していることが明らかにされた [45]。DSPP から創出される PP がこれらの組織の炎症性疾患の発症に関与しているかもしれない。

本研究は、象牙質に存在する PP が抗炎症因子として機能し、歯髄組織の恒常性維持に関わっている可能性を初めて示した。また従来より PP の硬組織誘導能に着目し、PP を応用した覆髄剤の開発に関する研究が行われてきた [46 ~ 48]。本研究の結果から硬組織誘導能に加えて、PP は覆髄面直下の歯髄組織に対する抗炎症作用を示すことが想定されることから、臨床応用を行うに際しより有益な覆髄剤になり得ることが判明した。

第4章 総括

Phosphophoryn (PP) の抗炎症作用を明らかにするために、LPS 誘導性 *in vitro* と *in vivo* 炎症モデルにおける組み換え PP の影響を検討し、以下の結果を得た。

1. 本精製システムによって高純度の組み換え PP を精製できた。
2. 組み換え PP は LPS によって亢進した各種炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制し、また LPS による TNF- α 量の増加を有意に減少させた。組み換え DMP-1 はサイトカインの遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。組み換え PP は細胞ライセート分画で検出され、そのシグナルは時間依存的に増強した。また solid phase binding assay は組み換え PP と LPS との直接的な結合作用を示した。組み換え PP は THP-1 細胞の細胞膜近傍に局在しその一部が TLR 4 と共局在を示す像が観察された。
3. 組み換え PP 前投与は D-GalN / LPS 誘導性の致死率を有意に抑制した。組み換え PP 投与群において D-GalN / LPS 投与による肝臓の鬱血、肥大所見および、H-E 染色から肝小葉の細胞配列の崩壊が改善された。また、組み換え PP 投与は D-GalN / LPS 投与により亢進した肝臓中の各種炎症関連サイトカイン遺伝子発現を有意に抑制した。
4. 致死率は SDrr の長さに依存し改善したが、*in vitro* 炎症モデルにおいては SDrr の長さは抗炎症作用に影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、PP が抗炎症作用を有していることが明らかとなったことから、PP は抗炎症作用と硬組織誘導能によって歯髓の恒常性維持に関与してい

ることが示唆された。この二つの作用を有する PP は覆髄剤としての有用性が期待される。さらに、PP が生体内において炎症制御因子として機能している可能性が示唆された。

参考文献

1. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp., *Crit Rev Oral Biol Med.* 9: 179-200, 1998.
2. Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakamura H, Nakashima M. The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth., *PLoS One.* 7 (12), 2012.
3. Kim DS, Shin MR, Kim YS, Bae WJ, Roh DH, Hwang YS, Kim EC. Anti-inflammatory effects of glutamine on LPS-stimulated human dental pulp cells correlate with activation of MKP-1 and attenuation of the MAPK and NF- κ B pathways., *Int Endod J.* 48: 220-228, 2015.
4. Antonio N. Ten Cate's Oral Histology: development, structure, and function 7th ed, 2008.
5. MacDougall M, Zeichner-David M, Slavkin HC. Production and characterization of antibodies against murine dentine phosphoprotein., *Biochem J.* 232: 493-500, 1985.
6. Jontell M, Linde A, Lundvik L. Comparative studies of phosphoprotein preparations from rat incisor dentin., *Prep Biochem.* 10: 235-253, 1980.
7. Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nysten MU. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix protein., *J Biol Chem.* 255: 9760-9768, 1980.
8. Lyaruu DM, Belcourt A, Fincham AG, Termine JD. Neonatal hamster molar tooth development: Extraction and characterization of amelogenins, enamelin and soluble dentin proteins., *Calcif Tissue Int.* 34: 86-96, 1982.
9. Butler WT, Mikulski A, Urist MR, Bridges G, Uyeno S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity., *J Dent Res.* 56: 228-232, 1977.

10. Butler WT, Bhowan M, Dimuzio MT, Linde A. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method., *Coll Relat Res.* 1: 187-199, 1981.
11. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer., *Nat Rev Cancer.* 8: 212-226, 2008.
12. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins., *Int J Dev Biol.* 39: 169-179, 1995.
13. Jadlowiec JA, Zhang X, Li J, Campbell PG, Sfeir C. Extracellular matrix-mediated signaling by dentin phosphophoryn involves activation of the Smad pathway independent of bone morphogenetic protein., *J Biol Chem.* 281: 5341-5347, 2006.
14. Jadlowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C. Phosphophoryn regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway., *J Biol Chem.* 279: 53323-53330, 2004.
15. Chen Y, Zhang Y, Ramachandran A, George A. DSPP is Essential for normal development of the dental-craniofacial complex., *J Dent Res.* 95: 302-310, 2016.
16. Widbiller M, Eidt A, Wölflick M, Lindner SR, Schweikl H, Hiller KA, Buchalla W, Galler KM. Interactive effects of LPS and dentine matrix proteins on human dental pulp stem cells., *Int Endod J.* 51: 877-888, 2018.
17. Yamakoshi Y, Lu Y, Hu JC, Kim JW, Iwata T, Kobayashi K, Nagano T, Yamakoshi F, Hu Y, Fukae M, Simmer JP. Porcine dentin sialophosphoprotein: length polymorphisms, glycosylation, phosphorylation, and stability., *J Biol Chem.* 283: 14835-14844, 2008.
18. Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC, Nagano

- T, Yamamoto R, Simmer JP, Margolis HC, Gomi K. The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin., *Sci Rep.* 8(1): 4450, 2018.
19. Suzuki S, Kobuke S, Haruyama N, Hoshino H, Kulkarni AB, Nishimura F. Adhesive and migratory effects of phosphophoryn are modulated by flanking peptides of the integrin binding motif., *PLoS One.* 9(11), 2014.
20. Decjer K, Keppler D. Galactosamine induced liver injury., *Prog Liver Dis.* 4: 183-199, 1972.
21. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation., *Nature* 418: 191-195, 2002.
22. McKnight DA, Fisher LW. Molecular evolution of dentin phosphoprotein among toothed and toothless animals., *BMC Evol Biol.* 9: 299, 2009.
23. Kobuke S, Suzuki S, Hoshino H, Haruyama N, Nishimura F, Shiba H. Relationship between length variations in Ser/Asp-rich repeats in phosphophoryn and in vitro precipitation of calcium phosphate., *Arch Oral Biol.* 60: 1263-1272, 2015.
24. Haversen L, Ohlsson BG, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B., *Cell Immunol.* 220: 83-95, 2002.
25. Nagasawa T, Kiyosawa I, Takase M. Lactoferrin and serum albumin of human casein in colostrum and milk., *J Dairy Sci.* 57: 1159-1163, 1974.
26. Masson PL, Heremans JF, Dive CH. An iron-binding protein common to many external secretions., *Clin Chim Acta.* 14: 735-739, 1966.
27. Okubo K, Kamiya M, Urano Y, Nishi H, Herter JM, Mayadas T, Hirohama D, Suzuki K, Kawakami H, Tanaka M, Kurosawa M, Kagaya S, Hishikawa K, Nangaku M, Fujita T, Hayashi M, Hirahashi J. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation., *E Bio Medicine.* 10: 204-215, 2016.

28. Ellass-Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J, Spik G. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein., *Infect Immun.* 66: 486-491, 1998.
29. Caccavo D, Pellegrino NM, Altamura M, Rigon A, Amati L, Amoroso A, Jirillo E. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application., *J Endotoxin Res.* 8: 403-417, 2002.
30. Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, Nakano H, Takeuchi O, Akira S, Akiyama T, Gohda J, Inoue J, Hayakawa M. Human lactoferrin activates NF- κ B through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling., *FEBS J.* 277: 2051–2066, 2010.
31. Drago-Serrano ME, de la Garza-Amaya M, Luna JS, Campos-Rodríguez R. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects., *Int Immunopharmacol* 12: 1-9, 2012.
32. Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermüller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock., *Am J Pathol.* 149: 1381-1393, 1996.
33. Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity., *Immunobiology.* 187: 346-356, 1993.
34. Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, Tamada Y, Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model., *Infect Immun.* 64: 734-738, 1996.
35. Xiong Q, Hase K, Tezuka Y, Namba T, Kadota S. Acteoside inhibits apoptosis in D-Galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury., *Life Sci.* 65: 421-430, 1999.

36. Car BD, Eng VM, Schnyder B, Ozmen L, Huang S, Gallay P, Heumann D, Aguet M, Ryffel B. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock., *J Exp Med.* 179: 1437-1444, 1994.
37. Cho JY, Yeon JD, Kim JY, Yoo ES, Yu YH, Park MH. Hepatoprotection by human epidermal growth factor (hEGF) against experimental hepatitis induced by D-Galactosamine (D-GalN) or D-GalN/Lipopolysaccharide., *Biol Pharm Bull.* 23: 1243-1246, 2000.
38. von Marschall Z, Fisher LW. Dentin sialophosphoprotein (DSPP) is cleaved into its two natural dentin matrix products by three isoforms of bone morphogenetic protein-1 (BMP1)., *Matrix Biol.* 29: 295-303, 2010.
39. Stetler-Stevenson WG, Veis A. Bovine dentin phosphophoryn calcium ion binding properties of a high molecular weight preparation., *Calcif Tissue Int.* 40: 97-102, 1987.
40. Zanetti M, de Bernard B, Jontell M, Linde A. Ca²⁺-Binding studies of the phosphoprotein from rat incisor Dentine., *Eur J Biochem.* 113: 541-545, 1981.
41. He G, Ramachandran A, Dahl T, George S, Schultz D, Cookson D, Veis A, George A. Phosphorylation of phosphophoryn is crucial for its function as a mediator of biomineralization., *J Biol Chem.* 280: 33109-33114, 2005.
42. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization., *Matrix Biol.* 28: 221-229, 2009
43. Polan MA, Handa K, Saito T. Dentin phosphophoryn promotes odontoblast differentiation *in vitro* and induction of mineralized tissue-like matrix *in vivo*., *J Oral Tissue Engin.* 11: 201-212, 2014.
44. Yasuda Y, Izumikawa M, Okamoto K, Tsukuba T, Saito T. Dentin phosphophoryn promotes cellular migration of human dental pulp cells., *J*

Endod. 34: 575-578, 2008.

45. Prasad M, Zhu Q, Sun Y, Wang X, Kulkarni A, Boskey A, Feng JQ, Qin C. Expression of dentin sialophosphoprotein in non-mineralized tissues., *J Histochem Cytochem.* 59: 1009-10021, 2011.

46. Saito T, Arsenault AL, Yamauchi M, Kuboki Y, Crenshaw MA. Mineral induction by immobilized phosphoproteins., *Bone.* 21: 305-311, 1997.

47. Saito T, Yamauchi M, Crenshaw MA. Apatite induction by insoluble dentin collagen., *J Bone Miner Res.* 13: 265-270, 1998.

48. Saito T, Yamauchi M, Abiko Y, Matsuda K, Crenshaw MA. In vitro apatite induction by phosphophoryn immobilized on modified collagen fibrils., *J Bone Miner Res.* 15: 1615-1619, 2000.

図の説明

図 1. 液体クロマトグラフィーシステムを併用した陰イオンクロマトグラフィーの溶出分画

Q Sepharose Fast Flow による 0.6 M NaCl での溶出分画を、0.3 M NaCl の濃度となるよう希釈した後に、0.3 M NaCl で平衡化した Hi Trap Q HP Column に結合させ、AKTA 10 S システムによって 0.25 M NaCl から 0.5 M NaCl の濃度を 1 分画あたり 1ml ずつ 50ml 溶出を行った。Q Sepharose Fast Flow の溶出分画を含めた、各分画に含まれる組み換え PP を抗 PP 抗体を用いたウェスタンブロット法によって検出した。特に 0.375 M NaCl から 0.430 M NaCl の溶出分画でのシグナルが強いことが確認された。

1: Q Sepharose Fast Flow の溶出分画, 2: Hi Trap Q カラムフロースルー, 3: 0.25 M NaCl, 4: 0.275 M NaCl, 5: 0.300 M NaCl, 6: 0.325 M NaCl, 7: 0.350 M NaCl, 8: 0.375 M NaCl, 9: 0.400 M NaCl, 10: 0.420 M NaCl, 11: 0.430 M NaCl, 12: 0.440 M NaCl, 13: 0.460 M NaCl, 14: 0.480 M NaCl, 15: 0.500 M NaCl.

図 2. 液体クロマトグラフィーシステムを併用した His タグアフィニティー精製の溶出分画

AKTA 10S システムを併用した陰イオンクロマトグラフィーによって溶出した組み換え PP を His Trap HP Column に結合させ、AKTA 10S システムによって 0 mM Imidazole から 250 mM Imidazole の濃度を 1 分画あたり 1ml ずつ 50ml 溶出を行った。40 mM Imidazole から 70 mM Imidazole

の範囲において単一ピークの溶出分画を示した。この溶出分画の総タンパク量に関して BCA assay kit を用いて濃度測定を行い、300 ng ローディングしたところ、ステインズオール染色にて単一バンドを示した。

図 3. 従来法で精製した組み換え PP と液体クロマトグラフィーシステム併用により精製した組み換え PP の純度の比較

従来法で精製した組み換え PP (anion exchange (+), his-tag affinity purification (+), AKTA 10S system (-): バッチ法) と液体クロマトグラフィーシステム併用により精製した組み換え PP の各精製ステップにおける、液体クロマトグラフィーシステムの併用の有無による純度を等量ずつ電気泳動することで比較を行った。精製ステップの進行と共に、かつ液体クロマトグラフィーシステムを併用することでより高純度な組み換え PP の精製が可能となることが示された。

図 4. LPS 刺激により亢進するマクロファージ様細胞の *TNF- α* 遺伝子発現に及ぼす組み換え PP の影響

LPS 依存性 *TNF- α* 遺伝子発現が、組み換え PP 投与 (0.01~1 μ M) においていずれの濃度においても有意に抑制されることが示された。n = 3, 平均値 \pm SD. ** p < 0.01, Tukey's test. LPS 単独群と比較。

図 5. マクロファージ様細胞における LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞での *IL-8*, *IL-1 β* 遺伝子発現に及ぼす組み換え PP の影響

LPS 依存性 *IL-8* および *IL-1 β* 遺伝子発現が、組み換え PP 投与 (0.5, 1 μ M) においていずれの濃度においても有意に抑制されることが示された。n =

3, 平均値 ± SD. ** p<0.01, Tukey's test 。

図 6. LPS 刺激により亢進するマクロファージ様細胞からの TNF- α 分泌量に及ぼす組み換え PP の影響

マクロファージ様細胞からの LPS 依存性 TNF- α 分泌量が、組み換え PP 投与 (0.5 および 1 μ M) 群においていずれも有意に抑制されることが示された。n = 3, 平均値 ± SD. * p<0.05, ** p<0.01, Tukey's test. LPS 単独群と比較。

図 7. LPS 依存性 TNF- α 遺伝子発現に及ぼす TLR 4 インヒビターおよび NF- κ B シグナルインヒビターの影響

LPS 依存性 TNF- α 遺伝子発現が組み換え PP (1 μ M), JSH 23 (10 μ M), BAY (10 μ M), TAK 242 (10 μ M), parthenolide (1 μ M) 投与群においていずれも有意に抑制されることが示された。n = 3, 平均値 ± SD. * p<0.05, ** p<0.01, Tukey's test. LPS 単独群と比較。

図 8. 組み換え PP 投与後のマクロファージ様細胞 lysate 分画における組み換え PP の検出

炎症モデルにおいてマクロファージ様細胞へ組み換え PP 投与後 0.5 から 12 時間後での細胞ライセート分画における組み換え PP の検出を抗 PP 抗体を用いたウェスタンブロット法によって検出したところ、1 時間後以降のすべての時間において組み換え PP が検出され、時間依存的に増強することが示された。総タンパク量は抗 GAPDH 抗体のシグナル強度を用いてノーマライズした。

図 9. マロファージ様細胞における組み換え PP の局在

組み換え PP 投与 24 時間後にマクロファージ様細胞を抗 PP 抗体および抗 TLR 4 抗体を用いて 2 重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ、組み換え PP は細胞膜近傍に局在していることが示され、さらにその一部は細胞膜上の TLR 4 と共局在を示すことが観察された。

LPS : 10 ng / ml

rPP : 1 μ M

図 10. 組み換え PP とビオチン化 LPS との結合量

96 well プレートにコートした組み換え PP (25 ~ 100 pmol) に対するビオチン化 LPS との結合量を、solid phase binding assay によって評価した。アビジン-ビオチンシステムと TMB 溶液による発色を 450nm の吸光度において測定した。組み換え PP の量依存的にビオチン化 LPS が結合することが示された。n = 3, 平均値 \pm SD. ** p < 0.01, Tukey's test. 組み換え PP のコートなし群と比較。

図 11. LPS 投与後の生存率に及ぼす組み換え PP 前投与の影響

LPS 投与マウス (n=18) は投与後約 7.5 時間から衰弱が始まり、30 時間後において生存率は 7% になったが、組み換え PP を前投与した群 (n=15) の生存率は 66% となり生存率の有意な改善を示した。一方、組み換え DMP-1 を前投与した群 (n=5) の生存率は 0% であった。3 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されている。* p < 0.05, log-rank test LPS 投与群と比較。

図 12. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の肝臓の肉眼所見の変化

LPS 投与 7.5 時間後における肝臓の顕著な鬱血、肥大所見と比較して、組み換え PP 投与群においては部分的に鬱血肥大している所見がみられるものの正常な領域の占める割合が明らかに多く、顕著な改善が観察された。一方、組み換え DMP-1 投与群において改善は見られなかった。4 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されている。

図 13. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の肝臓の H-E 染色所見の変化

D-GalN / LPS 投与 7.5 時間後の肝小葉における肝細胞の配列は細胞間隙の拡大や細部構造の不正の所見が顕著となり、明らかに細胞配列が崩壊している像が示される。組み換え PP 前投与群では細胞間隙の拡大等の所見は認められるものの、肝小葉の細胞配列が改善している像が観察される。一方で組み換え DMP-1 投与群においてはこれらの改善は見られなかった。4 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されている。I—I : 50 μ m

図 14. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の肝臓における HMGB1 発現の変化

D-GalN / LPS 投与 7.5 時間後の肝臓組織内では HMGB1 の発現が亢進するが、組み換え PP 前投与群においてはこの発現の減少が観察された。3 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されている。

図 15. 組み換え PP 前投与による LPS 投与の肝臓における各種炎症性サイトカイン遺伝子発現の変化

LPS 投与 7.5 時間後における肝臓組織中の各種炎症性サイトカインの遺伝

子発現の亢進は、各組み換え PP 投与群においていずれも有意に抑制されることが示された。一方で組み換え DMP-1 投与群においてはいずれにおいても抑制は見られなかった。n = 3, 平均値 ± SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, Tukey's test. LPS 群と比較。4 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されている。

図 16. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞の *TNF- α* 遺伝子発現に及ぼす各種改変型組み換え PP の影響

LPS 依存性 *TNF- α* 遺伝子発現が、各種改変型組み換え PP 投与 (0.5, 1 μ M) においていずれの濃度においても有意に抑制されることが示された。また、各種改変型組み換え PP 群間において有意差は認められなかった。n = 3, 平均値 ± SD. ** p < 0.01, Tukey's test. LPS 単独と比較。

図 17. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞からの *TNF- α* 分泌量に及ぼす各種改変型組み換え PP の影響

マクロファージ様細胞からの LPS 依存性 *TNF- α* 分泌量は、各種改変型組み換え PP 投与群においていずれも有意に抑制されることが示された。また、各種改変型組み換え PP 群間において SDrr の長さと *TNF- α* 分泌量の抑制効果との間には関係はなかった。n = 3, 平均値 ± SD. ** p < 0.01, Tukey's test. LPS 単独と比較。

図 18. 各種改変型組み換え PP とビオチン化 LPS との結合量

96 well プレートにコートした各種改変型組み換え PP に対するビオチン化 LPS との結合能を、solid phase binding assay によって調べた。アビジンビオチンシステムと TMB 溶液による発色を 450nm の吸光度で測定し比較を行

ったところ、コートしない well と比較し 25 pmol から 100 pmol いずれの量の改変型組み換え PP においても有意にビオチン化 LPS と結合することが示された。PP-full と PP-middle においては量依存的に吸光度が増加した。しかしながら SDrr の長さ と 結合量 との間は関係なかった。 n = 3, 平均値 ± SD. ** p<0.01, Tukey's test. coat なしと比較。

図 19. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞からの TNF- α 分泌量に及ぼす SSD 繰り返し配列合成ペプチドの影響

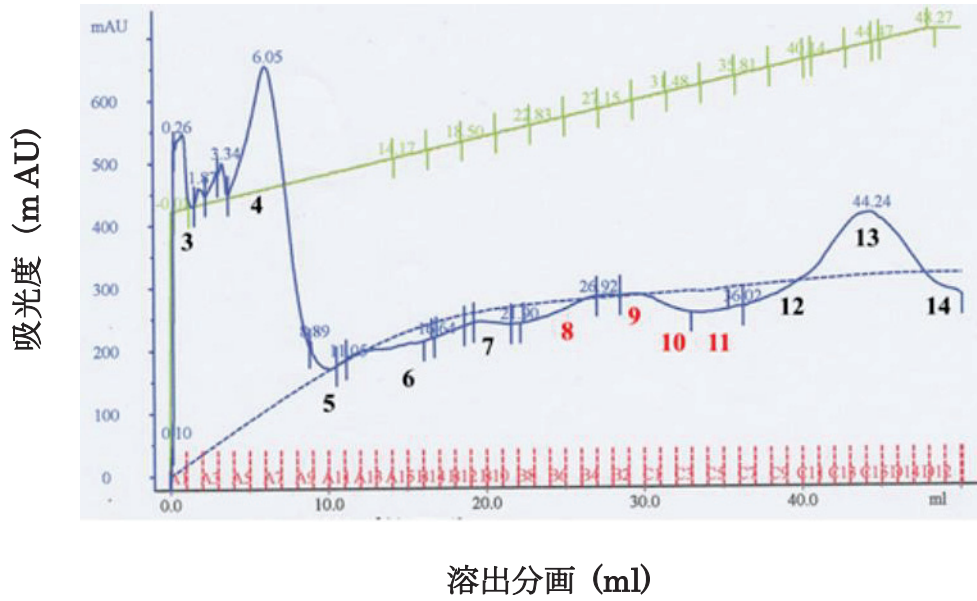
マクロファージ様細胞からの LPS 依存性 TNF-a 分泌量は、組み換え PP 投与群においては有意に抑制されるが、SDrr 配列の化学合成ペプチド投与群では抑制されなかった。すなわち、SDrr を有する化学合成ペプチドを組み換え PP-full 1 μ M と同分子量の SDrr を含むよう調整した群 (SDrr peptide 25 μ M)、および組み換え PP-middle 1 μ M と同分子量の SDrr を含むよう調整した群 (SDrr peptide 10.1 μ M) およびその間の濃度群 (SDrr peptide 16 μ M) のいずれの群においても組み換え PP 投与時にみられるような抑制効果は認められなかった。 n = 3, 平均値 ± SD. ** p<0.01, Tukey's test. LPS 単独群と比較。

図 20. LPS 投与後の生存率に及ぼす各種改変型組み換え PP 前投与の影響

LPS 投与後の生存率は 7 % であるのに対して、組み換え PP-full 前投与群 (n=15) では 66%、組み換え PP-middle 前投与群 (n=10) では 50% と生存率の有意な改善を示した。しかしながら組み換え PP-short 前投与群 (n=10) では 20 % となり有意な改善が見られなかった。 * p<0.05, log-rank test. LPS 投与群と比較。 4 群全てに、D-GalN (800mg / kg) が投与されて

いる。

☒



ウェスタンブロッティング

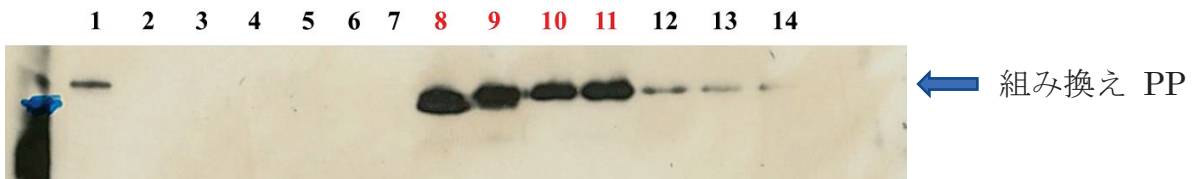
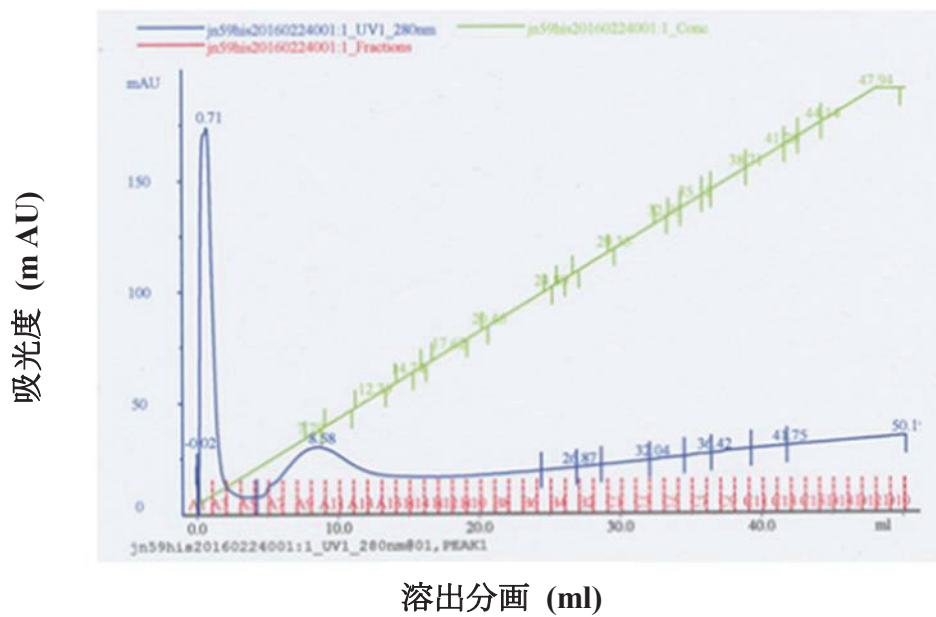


図 1. 液体クロマトグラフィーシステムを併用した陰イオンクロマトグラフィーの溶出分画



ステインズオール染色

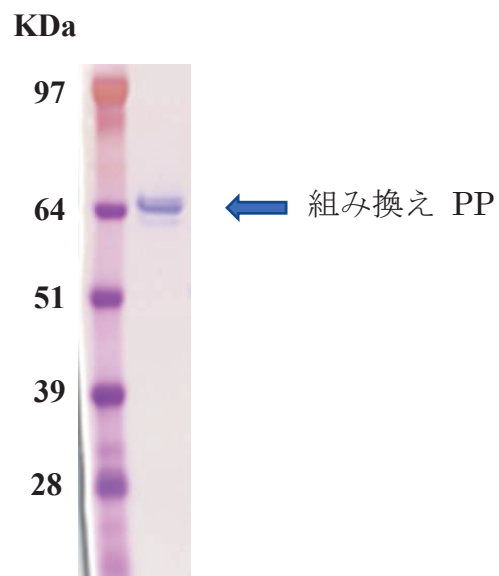


図 2. 液体クロマトグラフィーシステムを併用した
His タグアフィニティー精製の溶出分画

ステインズオール染色

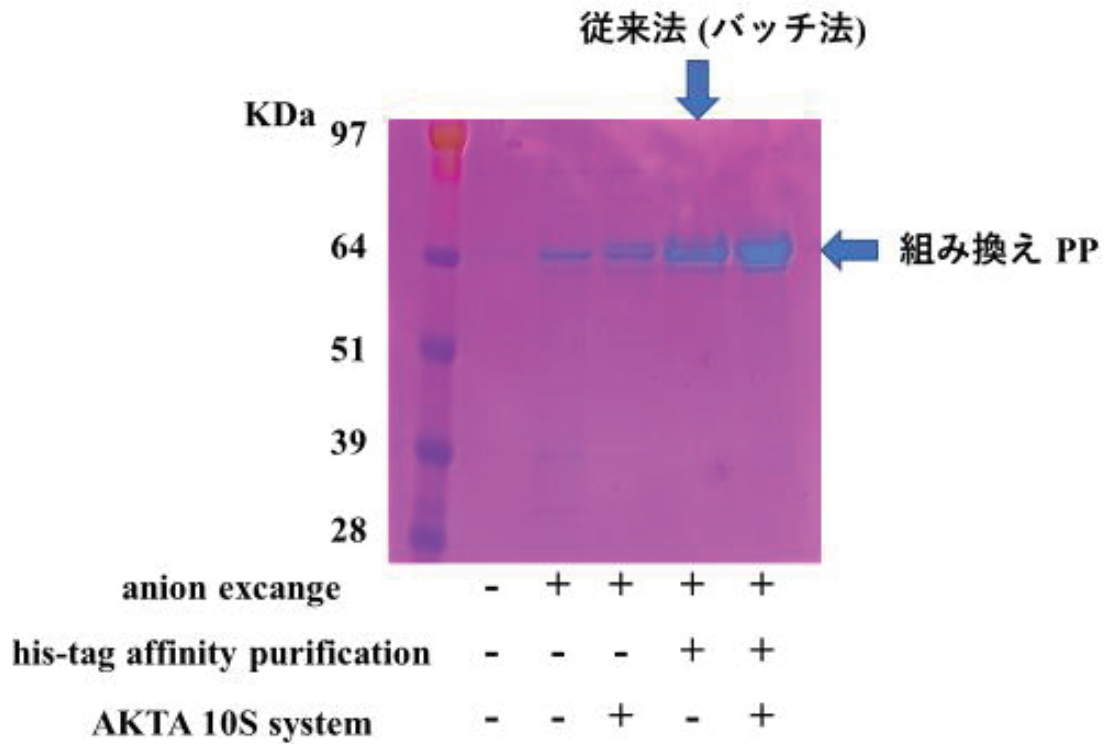


図 3. 従来法で精製した組み換え PP と液体クロマトグラフィーシステム併用により精製した組み換え PP の純度の比較

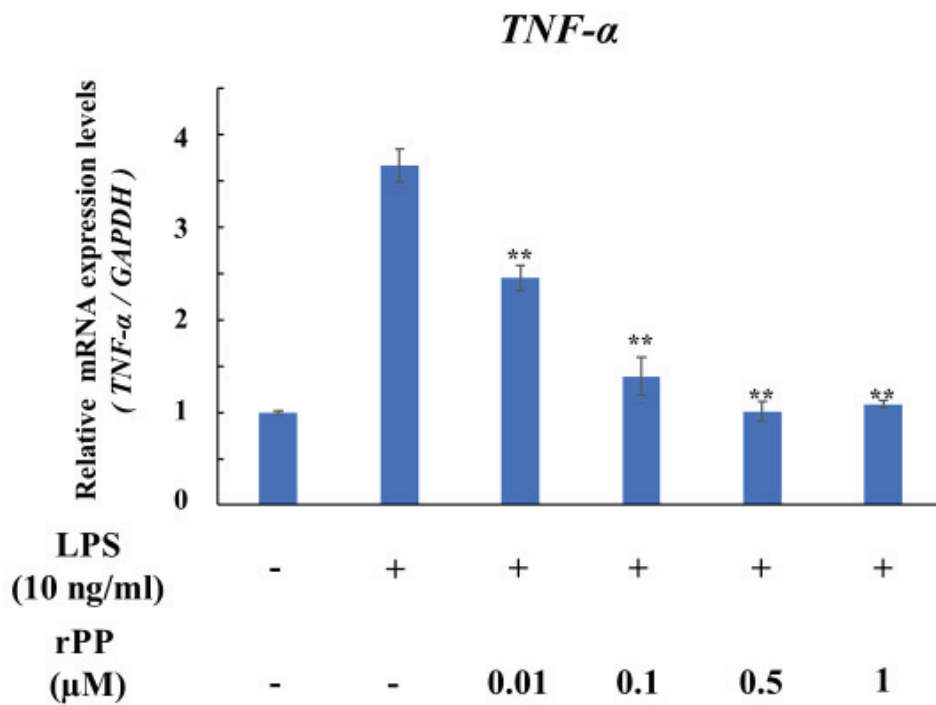


図 4. LPS 刺激により亢進するマクロファージ様細胞の *TNF- α* 遺伝子発現に及ぼす組み換え PP の影響

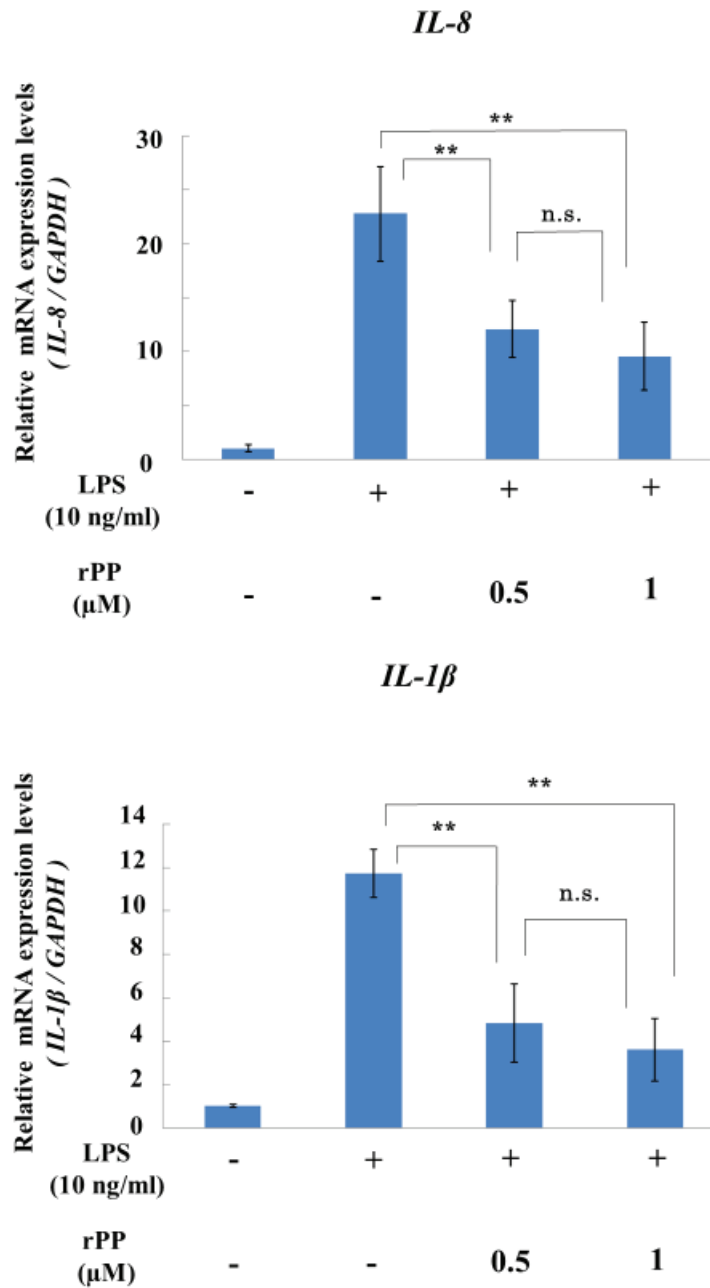


図 5. マクロファージ様細胞における LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞での *IL-8*, *IL-1β* 遺伝子発現に及ぼす組み換え PP の影響

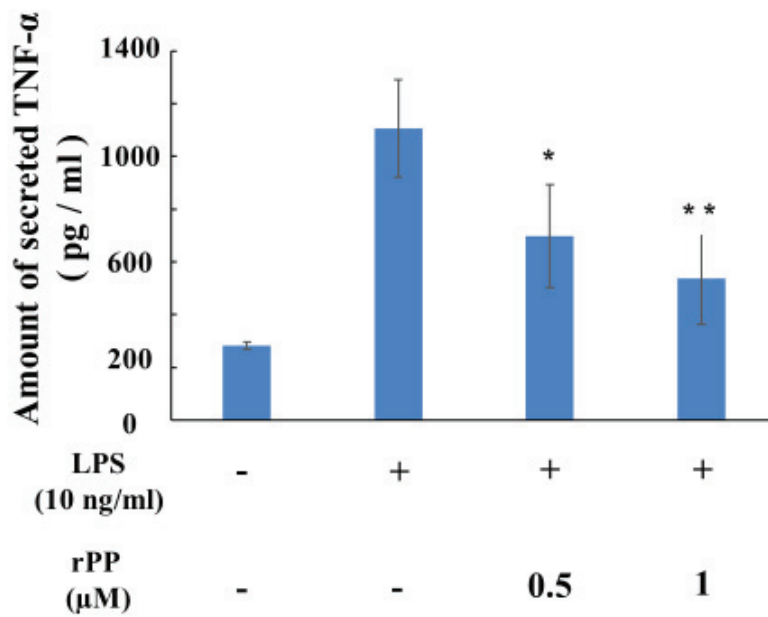


図 6. LPS 刺激により亢進するマクロファージ様細胞からの TNF- α 分泌量に及ぼす組み換え PP の影響

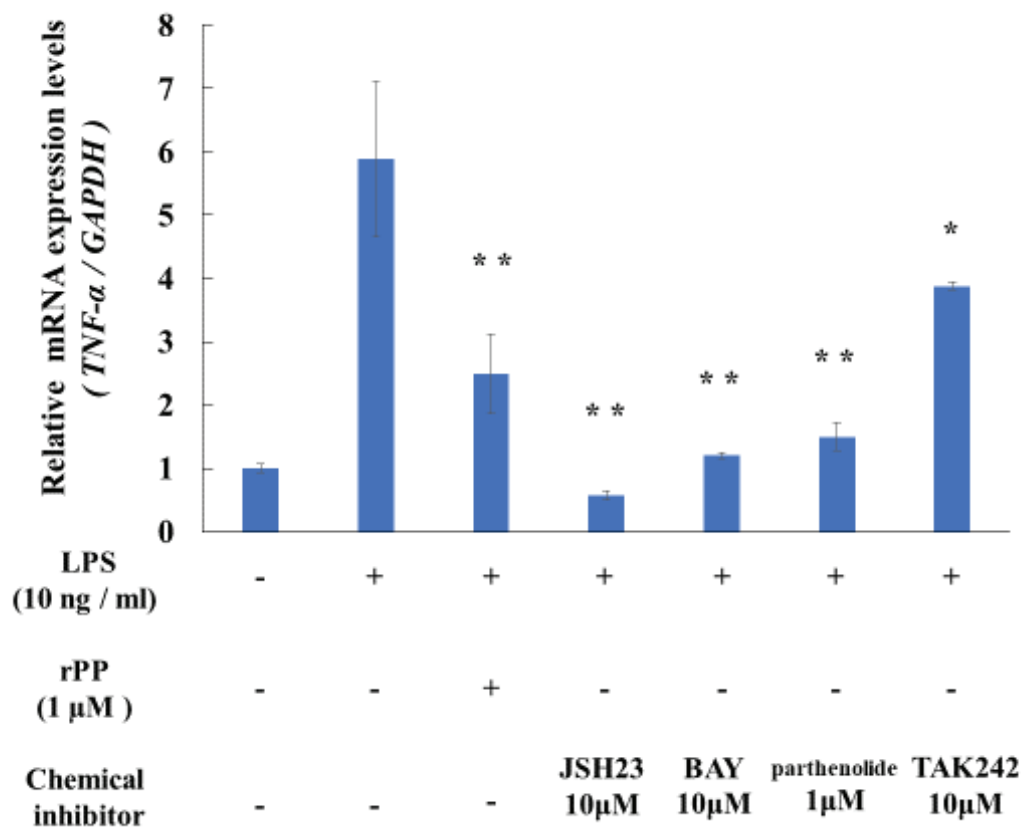


図 7. LPS 依存性 $TNF-\alpha$ 遺伝子発現に及ぼす
TLR 4 インヒビターおよび NF- κ B シグナルイ
ンヒビターの影響

ウェスタンブロッティング

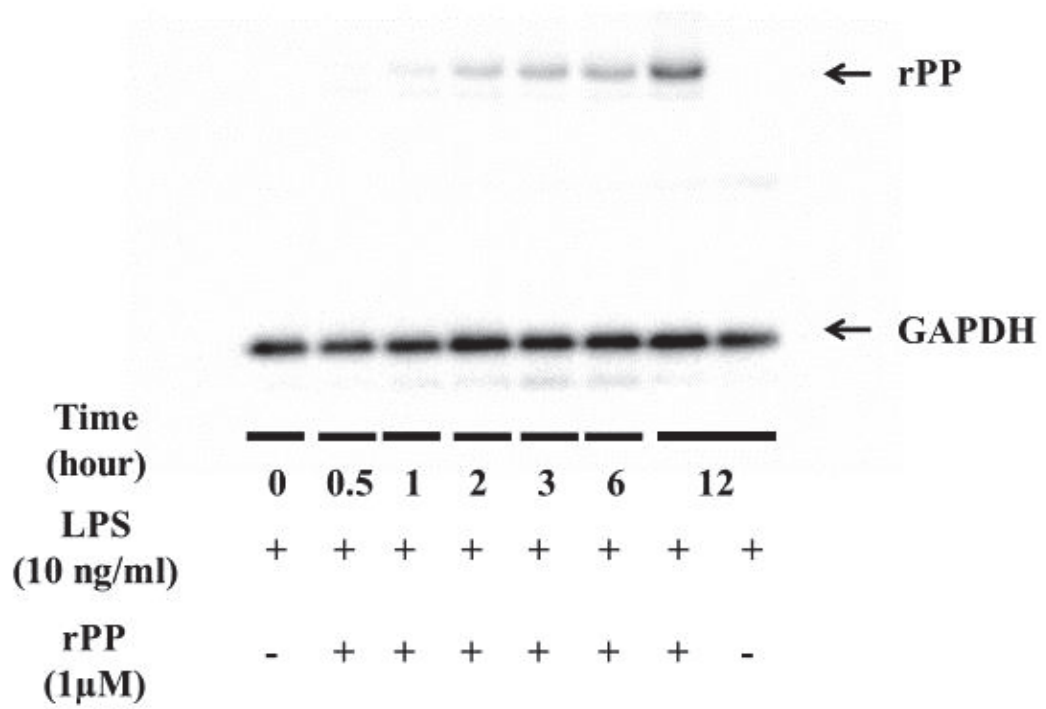


図 8. 組み換え PP 投与後のマクロファージ様細胞 lysate 分画における組み換え PP の検出

蛍光免疫染色

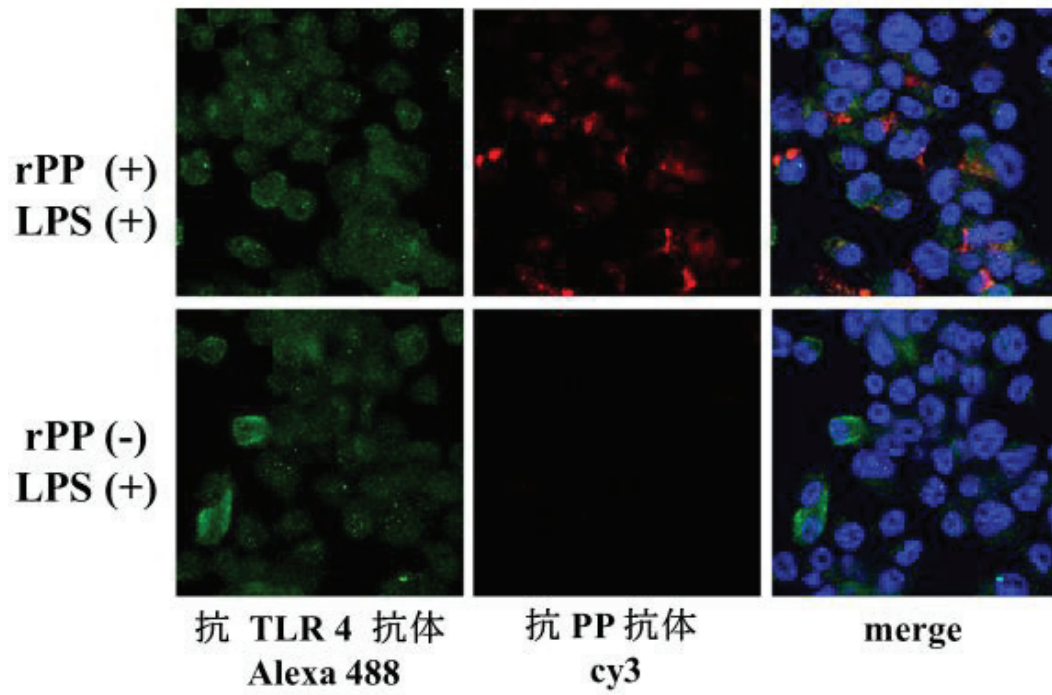


図 9. マロファージ様細胞における組み換え PP の局在

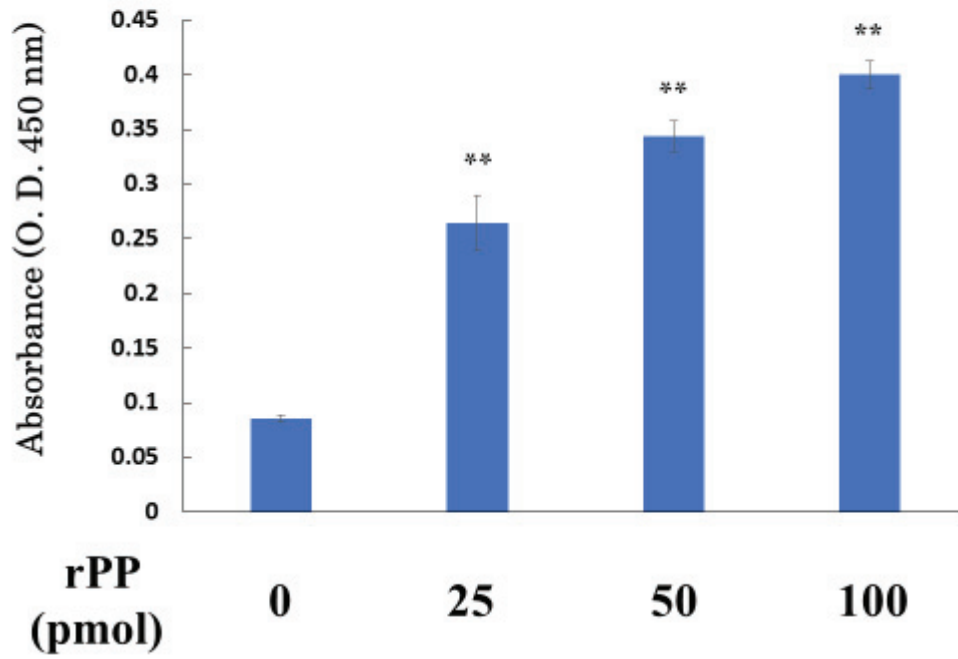


図 10. 組み換え PP とビオチン化 LPS との結合量

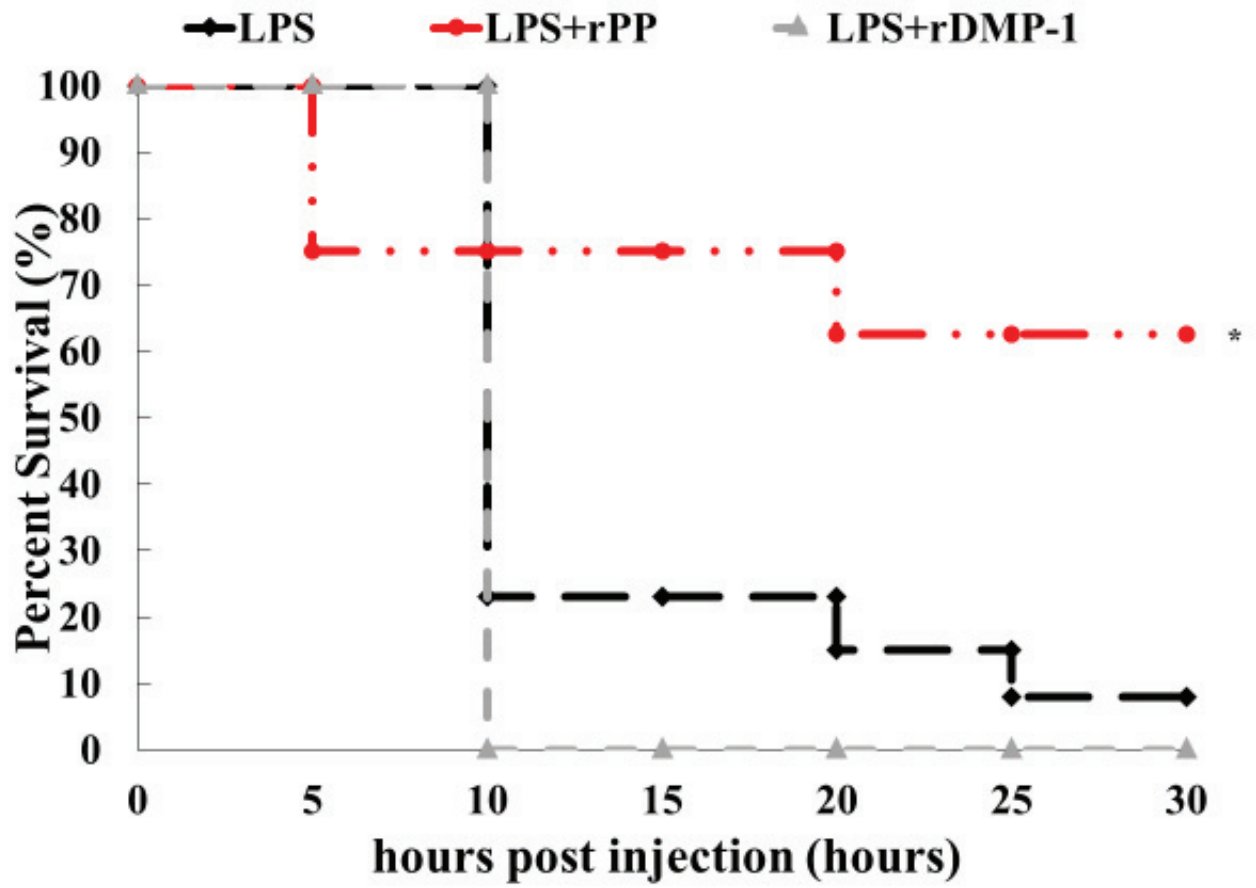
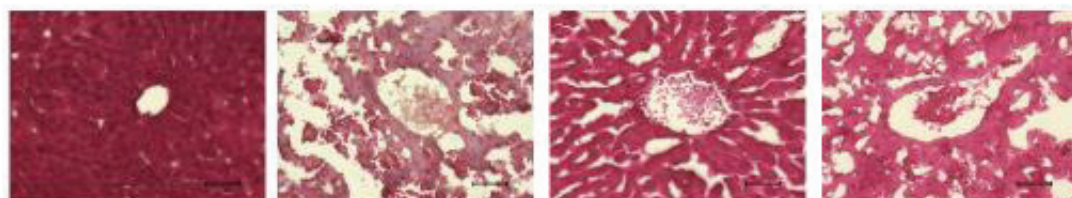


図 11. LPS 投与後の生存率に及ぼす組み換え PP 前投与の影響



LPS (1 μg/kg)	-	+	+	+
rPP (0.1 μmol/kg)	-	-	+	-
rDMP-1 (0.1 μmol/kg)	-	-	-	+

図 12. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の
肝臓の肉眼所見の変化



LPS (1 μg/kg)	-	+	+	+
rPP (0.1 μmol/kg)	-	-	+	-
rDMP-1 (0.1 μmol/kg)	-	-	-	+

図 13. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の
肝臓の H-E 染色所見の変化

蛍光免疫染色

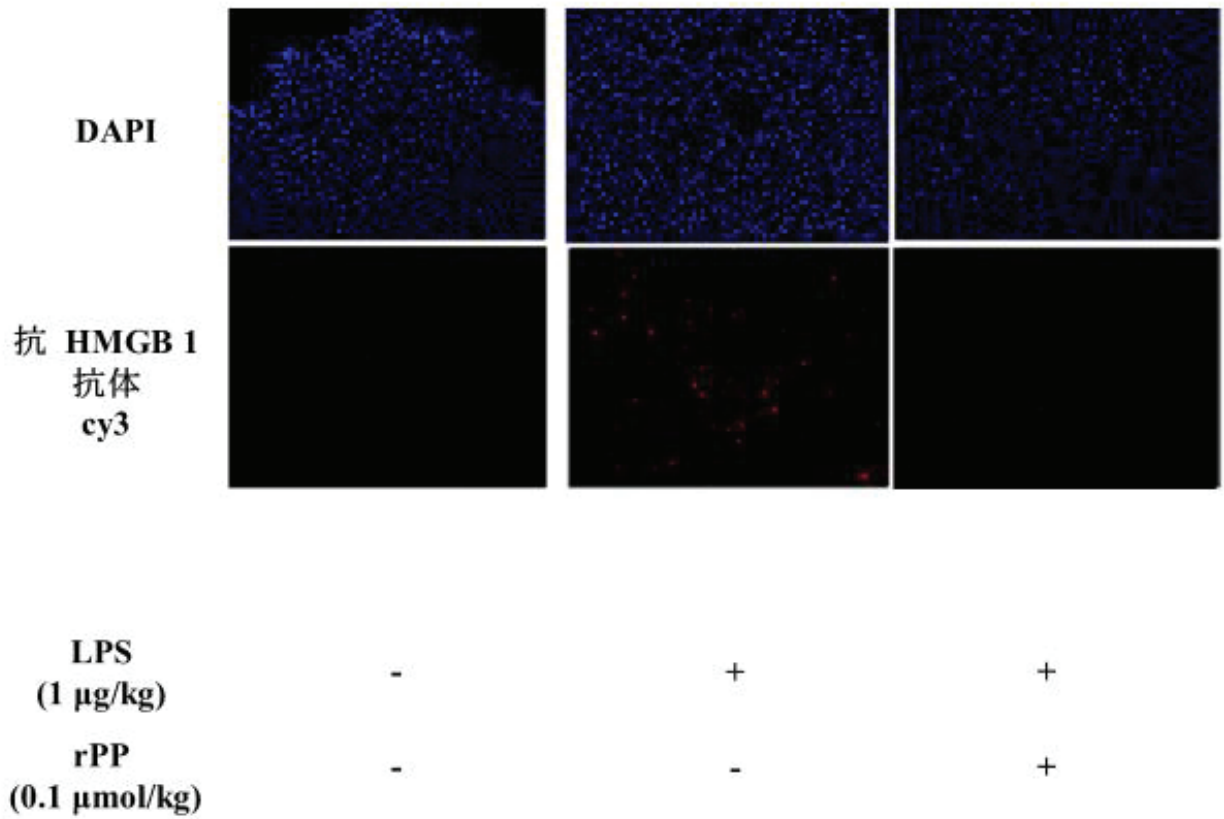


図 14. 組み換え PP 前投与による LPS 投与後の肝臓における HMGB 1 発現の変化

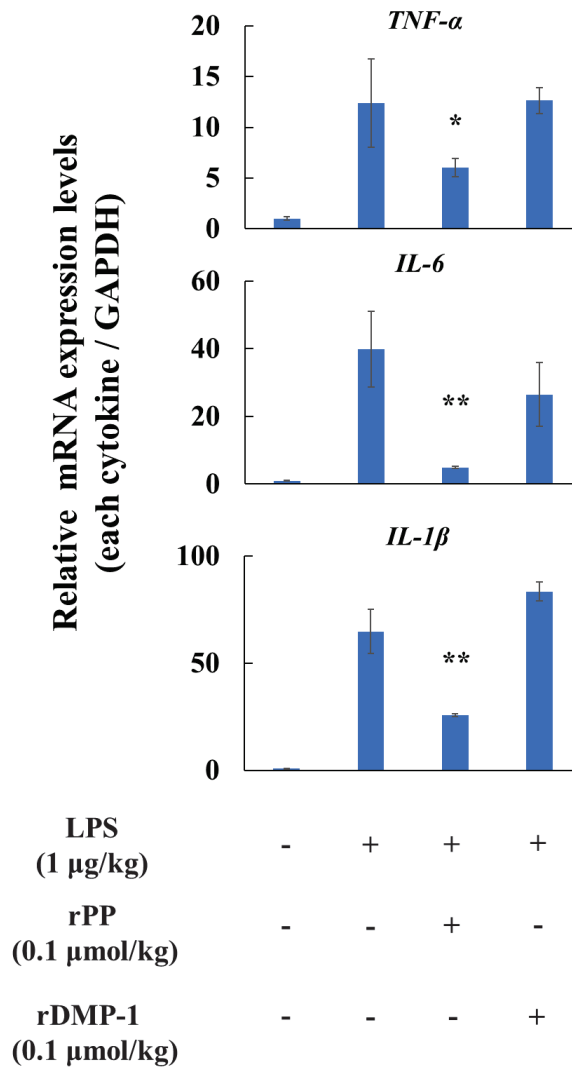


図 15. 組み換え PP 前投与による LPS 投与の肝臓における各種炎症性サイトカイン遺伝子発現の変化

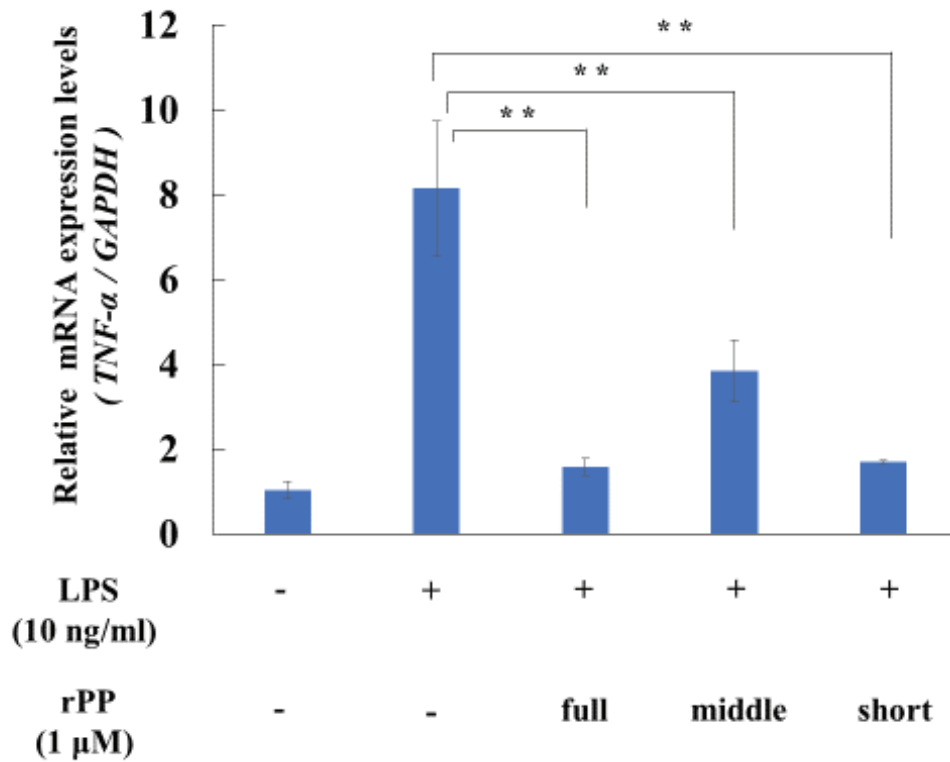


図 16. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞の *TNF-α* 遺伝子発現に及ぼす各種改変型組み換え PP の影響

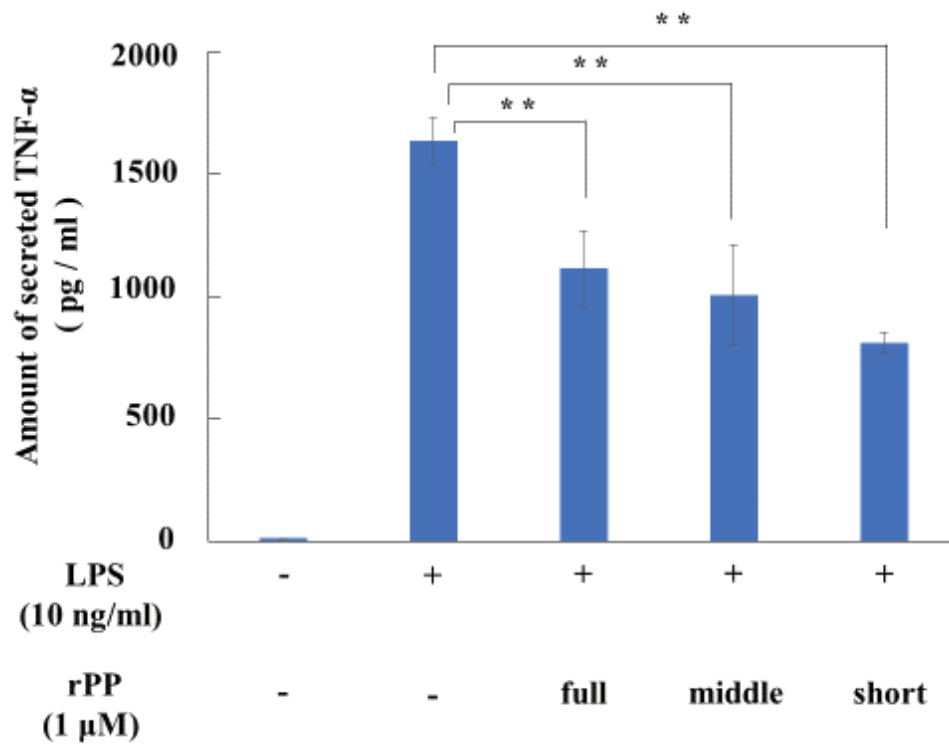


図 17. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞からの TNF- α 分泌量に及ぼす各種改変型組み換え PP の影響

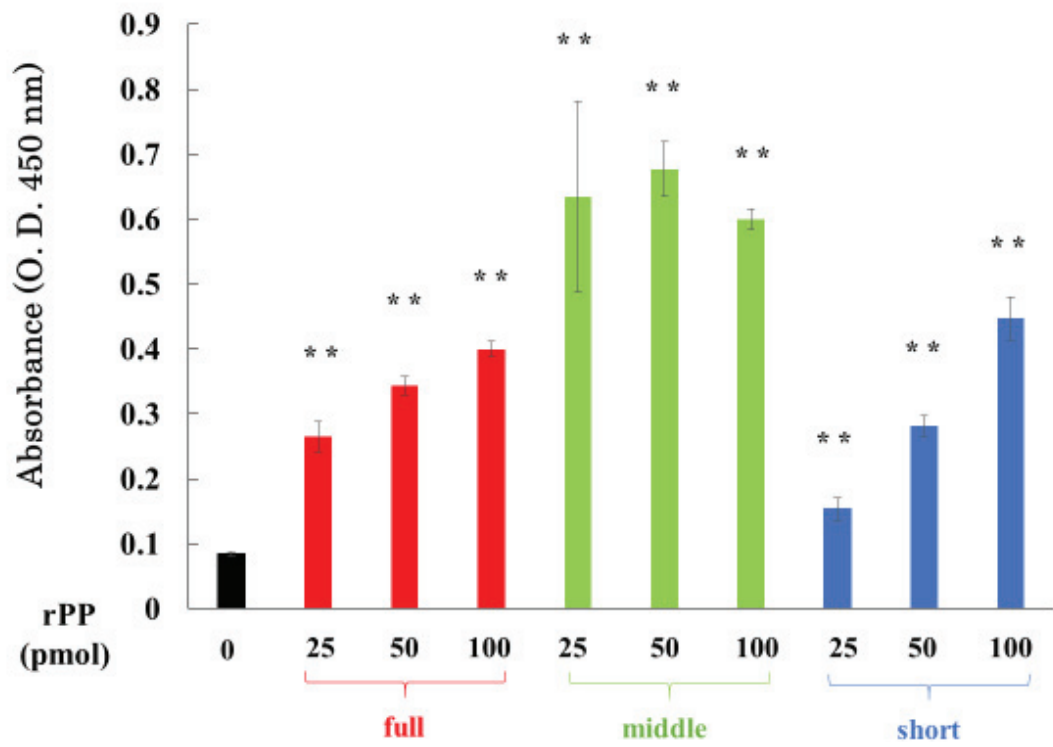


図 18. 各種改変型組み換え PP とビオチン化 LPS との結合量

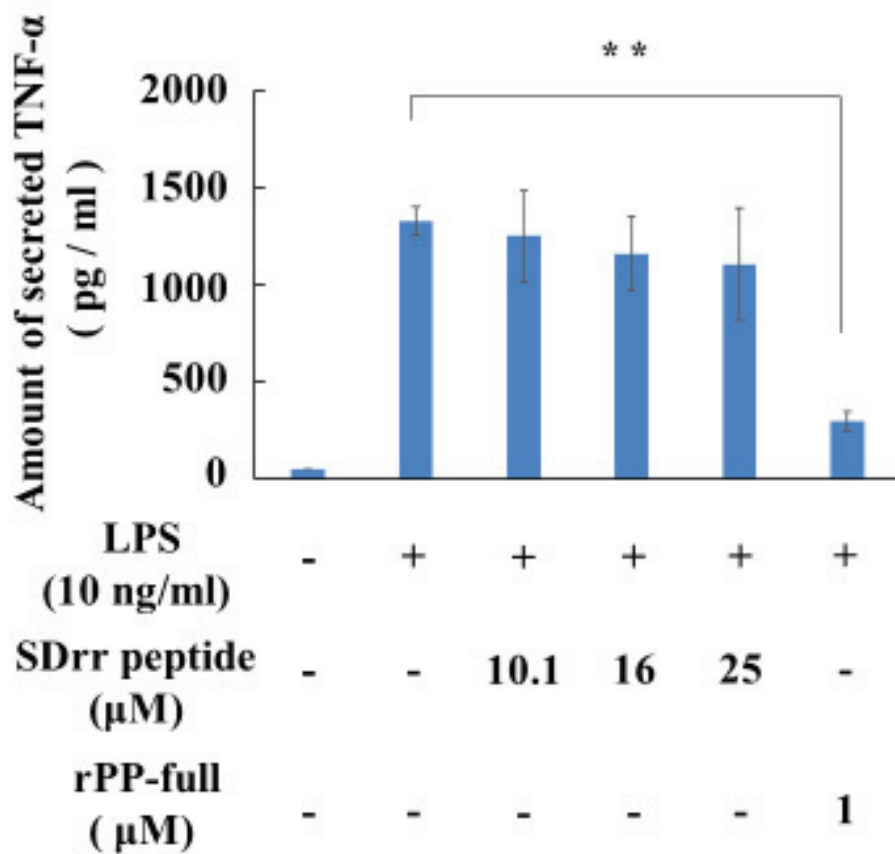


図 19. LPS 刺激によって亢進するマクロファージ様細胞からの TNF- α 分泌量に及ぼす SSD 繰り返し配列合成ペプチドの影響

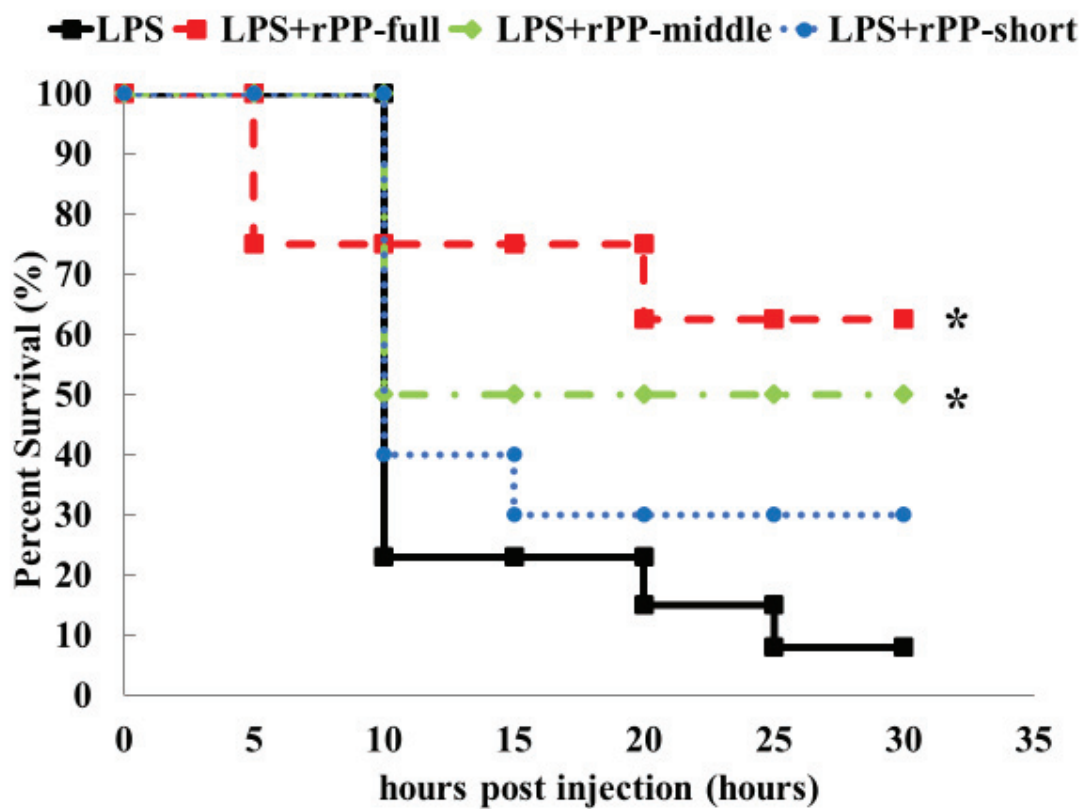


図 20. LPS 投与後の生存率に及ぼす各種改変型組み換え PP 前投与の影響