

論文要旨等報告書

氏名	山口 知子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 1 6 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	IL-6/sIL-6R enhances cathepsin B and L production via caveolin-1-mediated JNK-AP-1 pathway in human gingival fibroblasts (ヒト歯肉線維芽細胞でのIL-6/sIL-6Rによるカベオリン-1-JNK-AP-1経路を介したリソソーム酵素カテプシンB, L産生の促進)
論文審査委員	教授 滝川 正春 教授 高柴 正悟 准教授 苔口 進

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病は口腔細菌の感染によって発症する炎症性疾患である。また、炎症性サイトカインは複雑にネットワークを形成して、歯周組織破壊を起こすことが知られている。これまでに、インターロイキン6 (IL-6) は、可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) と複合体を形成してヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に作用し、VEGF の産生を促進させることが報告されている (Naruishi *et al.*, 2003)。このことから、IL-6 は歯周病の悪化をきたす炎症性サイトカインであると考えられる。

リソソーム酵素であるカテプシン B, L は結合組織を破壊することが知られており、炎症性サイトカイン IL-1 β が HGF のカテプシン産生を誘導することが報告された (Cox *et al.*, 2006)。しかし、IL-6 によるカテプシン産生誘導に関する報告はない。

カベオリン-1 は、上皮細胞や線維芽細胞などの細胞膜上のラフトと呼ばれる糖脂質とコレステロールに富んだ領域に存在する細胞膜蛋白である。近年、カベオリン-1 が様々な炎症性サイトカインの影響下にある刺激伝達系を修飾して、炎症反応を制御することが明らかになってきた。

したがって、本研究では、歯周病悪化のメカニズムの一端を明らかにすることを目的に、HGF での IL-6 によるカテプシンの産生性、およびその刺激伝達系におけるカベオリン-1 の関与を調べた。

【方法】

- 1. HGF およびその培養:** HGF は、臨床的に健康なヒトの歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を用いた。培養は、ウシ胎児血清を 10 % の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地を用い、37 °C, 5 % CO₂ 存在下、95 % 湿潤下で行った。なお、5-10 代継代培養した HGF を実験に供した。
- 2. カベオリン-1 の small interfering RNA (siRNA) を導入した HGF の樹立:** HGF へのカベオリン-1 siRNA の導入は、市販のカベオリン-1 siRNA (0-200 nM, Santa Cruz) および、その対照 siRNA (0-200 nM, Santa Cruz) を用いて、添付の使用説明書の記載に従って行った。なお、siRNA の導入効率は、カベオリン-1 siRNA を導入した 48 時間後の HGF の全細胞蛋白を回収し、ウエスタンブロット法によってカベオリン-1 の産生程度を調べて評価した。

- 3. 刺激伝達系の解明:** siIL-6R (50 ng/ml) 存在下において IL-6 (50 ng/ml) を用いて HGF を刺激し、刺激伝達分子である mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系 (p44/42 MAPK および c-Jun N-terminal kinase : JNK) のリン酸化の程度を、ウエスタンブロット法により解析した。転写因子である activator protein 1 (AP-1) の核内移行は、同様に刺激した HGF の核内蛋白を回収した後、ゲルシフトアッセイ法により解析した。
- 4. カテプシン B, L 産生の検出:** 産生されたカテプシン B, L は、上記 2 の実験系をもとに、100 nM のカベオリン-1 siRNA を導入した HGF を IL-6/siIL-6R (ともに 50 ng/ml) で 24 時間刺激した後に全細胞蛋白を回収し、ウエスタンブロット法によって検出した。なお、p44/42 MAPK 阻害剤である PD98059 あるいは JNK 阻害剤である SP600125 を添加した正常の HGF においてもカテプシンの産生を調べた。
- 5. カテプシン B, L 活性の測定:** カテプシン活性は、Barrett らの記載 (*Methods Enzymol*, 1981) に従って、リソソーム画分内のカテプシンによる基質分解度として測定した。HGF のリソソーム画分は、上記 3 と同様の実験系を用いて 48 時間刺激した細胞を超音波破碎し、超遠心した後の上清画分として回収した。カテプシン B 活性は、リソソーム画分 (1 μ g) を反応基質 Benzyloxycarbonyl-L-Arginyl-L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Z-Arg-Arg-MCA) に作用させ、基質から遊離する 7-amino-4-methylcoumaryn (AMC) の蛍光強度を測定して調べた。また、カテプシン L 活性は、細胞回収時にカテプシン B 阻害剤である CA-074Me を添加した際の細胞のリソソーム画分を反応基質 Benzyloxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (Z-Phe-Arg-MCA) に作用させて、前述と同様に AMC の蛍光強度を測定し、カテプシン B 活性の抑制時のカテプシン (B+L) 活性をもって表現した。なお、上記 4 と同様に、PD98059 あるいは SP600125 を添加した正常の HGF においてもカテプシンの活性を調べた。
- 6. 統計処理:** 測定値の群間の有意差は、Student's *t*-test および ANOVA/Fisher's PLSD を用いて検定した。

【結果】

- IL-6 は、HGF の p44/42 MAPK および JNK のリン酸化を促進し、その下流の AP-1 を活性化した。これらは、カベオリン-1 siRNA を導入した HGF において有意に抑制された ($p < 0.05$)。
- IL-6 は、HGF のカテプシン B, L 産生を促進した。また、その結果に相応してカテプシン B, L 活性も亢進した。しかし、siRNA を導入してカベオリン-1 の産生を抑制すると、カテプシン B, L の産生と活性は有意に抑制された ($p < 0.05$)。なお、JNK を抑制した正常の HGF において、カテプシン B, L の産生と活性は有意に低下した ($p < 0.05$)。一方、p44/42 MAPK を抑制した場合には抑制されなかった。

【考察および結論】

HGF に作用した IL-6 がカベオリン-1-JNK-AP-1 経路を介してリソソーム酵素カテプシン B, L 産生を促進することが明らかになった。このことは、カベオリン-1 が IL-6 が関与する歯周病の病態形成に関与することを示し、カベオリン-1 の産生を制御することで歯周病の病態を変化できる可能性を示唆する。

論文審査結果の要旨

歯周病は口腔細菌の感染によって発症する炎症性疾患である。また、炎症性サイトカインは複雑にネットワークを形成して、歯周組織破壊を起こすことが知られている。これまでに、インターロイキン6 (IL-6) は、可溶性IL-6受容体 (sIL-6R) と複合体を形成してヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) に作用し、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の産生を促進させることが報告されている (Naruishi *et al*, *Transplantation*, 2003)。このことから、IL-6は歯周病の悪化をきたす炎症性サイトカインであると考えられる。

リソソーム酵素であるカテプシンB, Lは結合組織を破壊することが知られており、炎症性サイトカインIL-1 β がHGFsのカテプシン産生を誘導することが報告された (Cox *et al*, *Oral Dis*, 2006)。このことから、IL-6についてもカテプシン産生誘導の可能性が考えられる。

カベオリン-1は、上皮細胞や線維芽細胞などの細胞膜上のラフトと呼ばれる糖脂質とコレステロールに富んだ領域に存在する細胞膜蛋白である。近年、カベオリン-1が様々な炎症性サイトカインの影響下にある情報伝達系を修飾して、炎症反応を制御することが明らかになってきた。

したがって、本研究では、歯周病悪化のメカニズムの一端を明らかにすることを目的に、HGFsでのIL-6によるカテプシンの産生性、およびその情報伝達系におけるカベオリン-1の関与を調べた。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) IL-6は、HGFsのp44/42 MAPKおよびJNKのリン酸化を促進し、その下流のAP-1を活性化した。これらは、カベオリン-1 small interfering RNA (siRNA) を導入したHGFにおいて有意に抑制された ($p < 0.05$)。
- 2) IL-6は、HGFsのカテプシンB, L産生を促進した。また、その結果に相応してカテプシンB, L活性も亢進した。しかし、siRNAを導入してカベオリン-1の産生を抑制すると、カテプシンB, Lの産生と活性は有意に抑制された ($p < 0.05$)。なお、JNKを抑制した正常のHGFsにおいて、カテプシンB, Lの産生と活性は有意に低下した ($p < 0.05$)。一方、p44/42 MAPKを抑制した場合には、カテプシンB, Lは抑制されなかった。

以上のことから、HGFsに作用したIL-6がカベオリン-1-JNK-AP-1経路を介してリソソーム酵素カテプシンB, L産生を促進することが明らかとなった。このことは、IL-6が歯周病の病態形成に関与することを示し、カベオリン-1の産生を制御することで歯周病の病態を変化できる可能性を示唆する。

以上により、本申請論文は博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認めた。