

指導教授氏名	指導役割
印	研究の総括的指導
印	
印	

学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 歯周病態学分野	身分 大学院生	氏名 後藤 絢香
論文題名	ヒト歯肉線維芽細胞のリソソーム酵素カテプシンB、L分泌に対するIL-6が及ぼす影響に関する研究	
論文内容の要旨（2000字程度）		
<p>【緒言】</p> <p>リソソームは様々な加水分解酵素を含んでおり、細胞内における消化の場である。カテプシンはリソソーム内酵素の主要なプロテアーゼであり、生体恒常性の維持に必須である。Interleukin-6 (IL-6) は、免疫系や血液系など生体防御にとって重要な臓器の分化や機能発現に関与する生理活性因子である。一方で、IL-6 は歯周病や関節リウマチ等の慢性炎症性疾患の発症および進展において主要な役割を担っている炎症性サイトカインである。今まで、IL-6 が細胞内シグナル伝達に関わる膜タンパクのカベオリン-1 (Cav-1) を介して c-Jun N-terminal kinase (JNK) を経て、ヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts: HGFs) 内のカテプシン B および L の産生および活性を亢進させることが報告されてきた。これは、カテプシンが歯周炎の病変部における組織破壊に関与していることを示唆する。近年、カテプシンは細胞外にも存在して癌の浸潤や転移に関与することが報告されていることから、リソソーム内酵素としての役割だけではなく細胞外における作用も着目されている。しかし、歯周炎の病変部におけるカテプシンの分泌は不明である。</p> <p>そこで本研究では、<i>in vitro</i> において HGFs からのカテプシン B および L の分泌に IL-6 が及ぼす影響を検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 試薬：組換えヒト IL-6 および組換えヒト可溶性 IL-6 受容体 (soluble IL-6 receptor ; sIL-6R) は、リン酸緩衝生理食塩水で希釈し、それぞれ 50 µg/ml の濃度に調整して使用時まで -30 °C に保存した。 細胞とその培養：細胞は、Naruishi らの報告に基づき、臨床的に健康なヒト歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を HGFs として実験に用いた。培養は、10 % ウシ胎児血清を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、5～8 代継代培養した細胞を使用した。 Cav-1 発現抑制細胞：Yamaguchi らの報告に基づき、Cav-1 を標的とする small interfering RNA を IL-6/sIL-6R 添加の 48 時間前にトランスフェクションして、Cav-1 の発現を抑制した HGFs を作製した。 IL-6 シグナル伝達系 ERK1/2 と JNK の阻害：Naruishi らの報告に基づき、extracellular signal-regulated 		

kinase (ERK) 1/2 の阻害剤として PD98059, JNK の阻害剤として SP600125 を用い, IL-6/sIL-6R 添加の 30 分前に添加し抑制した。

5. ウェスタンブロット法による培養上清中のカテプシン B および L の半定量 : IL-6/sIL-6R を添加後, 24 時間ごとに培養上清を回収し, 4 °C で 10 分間, 9,500×g にて遠心分離を行って上清を回収した。その後, 上清中の総蛋白を sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel 電気泳動にて分画して polyvinylidene difluoride 膜へ転写後, 抗カテプシン B および L 抗体を用いて, 上清中のカテプシン B および L の量を半定量した。
6. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による培養上清中の前駆体カテプシン B の定量 : 前述の記載 (材料および方法 5 項) と同様に回収した上清中の前駆体カテプシン B について, Human Pro-cathepsin B Quantikine® ELISA Kit を用いて ELISA 法にて定量した。
7. 培養上清中のカテプシン B および L の活性測定 : Yamaguchi らの報告に基づき, カテプシン B およびカテプシン (B+L) の活性には, pH5.5 の酢酸ナトリウム水溶液とそれぞれの特異的な基質である Z-Arg-Arg-MCA と Z-Phe-Arg-MCA を用いた。IL-6/sIL-6R で刺激後, 前述の記載 (材料および方法 5 項) と同様に回収した上清と基質を反応させ, 遊離した蛍光性ペプチド基質を蛍光マイクロプレートリーダーにて測定した。
8. 統計処理 : 各実験系における統計解析には, one-way analysis of variance を行い, さらに多重比較検定を Scheffe's test, Fisher's protected least significant difference で行った。なお, *p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

【結果】

1. IL-6/sIL-6R がカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響 : HGFs は恒常的に前駆体カテプシン B および L を培養上清中へ分泌した。その分泌量は, HGFs の IL-6/sIL-6R 刺激時には亢進した。
2. 分泌されたカテプシン B および L の活性の検討 : 培養上清中の前駆体カテプシン B とカテプシン (B+L) は, pH5.5 の酢酸ナトリウム水溶液下で活性を有していた。これらカテプシンの活性は, HGFs の IL-6/sIL-6R 刺激時には, 24 と 48 時間の時点間で亢進した。
3. Cav-1 がカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響 : Cav-1 の発現を抑制した HGFs から分泌されたカテプシン B 量は, 抑制していないものと比較して IL-6/sIL-6R 刺激の有無に関わらず減少した。一方, カテプシン L 量は, IL-6/sIL-6R 刺激時には減少した。
4. ERK1/2 および JNK の抑制がカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響 : 分泌されたカテプシン B 量は, ERK1/2 または JNK を阻害すると減少し, 両阻害剤の相加効果があった。一方カテプシン L 量は, ERK1/2 阻害時には変化しなかったが, JNK 阻害時には減少した。

【考察と結論】

HGFs によるカテプシン B および L の産生は, IL-6/sIL-6 刺激によって細胞内での産生が亢進されることがわかっていたが, 本研究によって細胞外への分泌量も亢進されることが明らかになった。さらに, 分泌されたカテプシン B および L には基質を分解する活性があった。また, このカテプシン B の分泌の際には, IL-6 のシグナル伝達に関与している Cav-1 が, 細胞膜からの分泌に関与していることも示唆された。その際に, 細胞内でのカテプシン B および L の産生には関与しないと考えられていた ERK1/2 が, カテプシン B の分泌に関与していた。

カテプシンは, 不要となった細胞外基質をリソソーム内で分解するため, 生体にとって不可欠なプロテアーゼである。しかし, がんや炎症の部位においては細胞外に存在し, 組織破壊を助長していると考えられている。本研究結果から, 炎症部におけるカテプシン B の細胞外分泌機序の一端が解明できた。この機序をさらに詳しく調べることは, IL-6 が関与した慢性炎症悪化の病態解明につながると思われる。

HGFs を IL-6/sIL-6R で刺激すると, 前駆体カテプシン B および L の細胞外への分泌が亢進した。この前駆体カテプシン B および L は, pH5.5 の条件下で活性を發揮した。さらに, 前駆体カテプシン B の分泌には, Cav-1 と ERK1/2 が関与していることが示唆された。