

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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

後藤 絢香

Ayaka GOTO

(平成 26 年 12 月 10 日受付)

緒言

リソソームはヒトの細胞内で唯一酸性環境下にある小器官で、様々な加水分解酵素を含んでいる^{1,2)}。リソソーム内の酵素群は、生体内に取り込まれ不要となったタンパク質等の代謝産物をアミノ酸レベルにまで分解することによって、生体恒常性の維持に必要不可欠な働きを有している³⁾。特に、プロテアーゼの一種であるカテプシンは、コラーゲン、フィブロネクチン、そしてラミニンなどの細胞外基質を分解するリソソーム内の酵素として、生体内に幅広く分布している⁴⁾。

カテプシンは現在までに B, L, H, そして K など少なくとも 11 種類以上が報告されており、活性部位のアミノ酸配列によってシステインプロテアーゼやセリンプロテアーゼなどに分類されている⁵⁾。カテプシンの生体内分布は、カテプシンおよび生体組織の種類によって様々である。例えば、カテプシン B, L および H はほぼ全ての細胞に分布し、カテプシン K は破骨細胞特異的に分布している⁶⁾。カテプシンが産生されて活性化するまでの経路は以下の通りである。不活化型であるカテプシン前駆体が小胞体で合成された後、ゴルジ体へと運ばれる。ゴルジ体へと運ばれた前駆体は、マンノース 6 リン酸が付加され、リソソームへと運ばれる。リソソーム内へと運ばれた前駆体は、酸性 pH 環境下で N 末端の切断というプロセッシングを受けることによって活性型カテプシンとして機能を有するようになる⁷⁾。これまでの研究から、細胞内におけるカテプシン遺伝子の異常は様々な疾患と関与していることが明らかとなっている。骨硬化や低身長を特徴とする濃化異骨症はカテプシン K 遺伝子の欠失により生じ⁸⁾、掌蹠を含む四肢末端の過角化と高度に進行した歯槽骨吸収を特徴とする Papillon-Lefèvre 症候群はカテプシン C 遺伝子の欠失によって生じる⁹⁾。また、カテプシン L 遺伝子の発現を抑制したマウスは歯肉増殖を引き起こすことが報告されている¹⁰⁾。

インターロイキン-6 (interleukin-6 ; IL-6) は、1989 年に活性化 B 細胞を抗体産生細胞へと分化させる因子として発見された¹¹⁾。また、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と機能の発現に関わる生理活性因子として作用する^{12,13)}。一方で、IL-6 が肝細胞に作用すると、炎症反応の指標である C 反応性タンパクを発現させることが報告されており、多くの炎症性疾患に関与する炎症性サイトカインの一つとして有名である^{14,15)}。IL-6 は、標的細胞膜上に存在する膜結合型 IL-6 受容体 (membrane bound IL-6 receptor ; mIL-6R) と結合し、分子量 130kDa の膜タンパク質 gp130 を活性化させて細胞内にシグナルを伝達する¹⁶⁾。ヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts ; HGFs) など mIL-6R を有さない細胞においては、IL-6 が血清などに存在する可溶性 IL-6 受容体 (soluble IL-6 receptor ; sIL-6R) と複合体を形成した後、gp130 と会合してシグナルを細胞内に伝達することがわかっている¹⁷⁾。

口腔内に存在する歯周病原細菌の感染によって発症する歯周炎においても、IL-6 が病態悪化に関与している¹⁸⁾。IL-6/sIL-6R 複合体は、HGFs に作用してマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase ; MMP) や血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) の産生を亢進させ、その結果として結合組織の分解や血管新生を助

長して歯周組織の破壊に関係する^{19,20)}。また、IL-6/sIL-6R 複合体は HGFs 内のカテプシン B および L の産生と活性を亢進させる。その際の細胞膜から核内へのシグナル伝達経路には、細胞膜上の脂質に富む凹みであるカベオラを構成する主要なタンパク質であって細胞内シグナル伝達の機能を有する caveolin-1 (Cav-1) と、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一種である c-jun N-terminal kinase (JNK) のシグナル経路を介することが報告されている²¹⁾。また、臨床サンプルを用いた研究において、歯周病罹患患者から採取した炎症部歯肉の歯肉線維芽細胞のカテプシン B および L の mRNA の発現が亢進しているとの報告もある²²⁾。以上のことから、カテプシンは歯周炎病巣での組織破壊に関与していると考えられる。

近年、カテプシン B は、慢性関節リウマチ患者の滑膜液中に多く含まれ、関節軟骨の組織破壊に関与していることが知られている²³⁾。また、カテプシン B は、乳癌の乳腺上皮細胞から細胞外へ分泌され、IV型コラーゲンを分解し、癌細胞の浸潤および転移に関与しているとの報告がある²⁴⁻²⁶⁾。このように、慢性炎症巣や腫瘍においてカテプシンが細胞外に存在することが明らかとなり、細胞内だけではなく細胞外におけるカテプシンの作用に注目が集まっている。

以上の背景から、口腔内の慢性炎症性疾患である歯周炎の病態においても、細胞外に分泌されたカテプシンが歯周結合組織の破壊に関与していると考えた。臨床サンプルを用いた研究において、慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中のカテプシン B および L の活性が健常者と比較して亢進しているとの報告がある²⁷⁾。そこで本研究では、歯周炎症巣において細胞外に分泌されたカテプシン B および L が、歯周炎症の悪化に関与しているという仮説をもとに、HGFs を用いて IL-6 がカテプシン B および L の細胞外への分泌に及ぼす影響を検討した。

材料ならびに方法

1. 試薬

リコンビナントヒトIL-6およびリコンビナントヒトsIL-6Rは、R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) のものを用いた。ラビット由来抗ヒトカテプシンBおよびLポリクローナル抗体、Cav-1を標的とするsmall interfering RNA (siRNA) およびスクランブル配列の陰性control siRNAは、Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) のものを用いた。extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2阻害剤であるPD98059, JNK阻害剤であるSP600125は、Calbiochem (San Diego, CA, USA) のものを用いた。カテプシン活性を測定する蛍光性ペプチドの4-methyl-7-coumarylamide (MCA) 基質であるZ-Arg-Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCAは、ペプチド研究所 (大阪, 日本) のものを用いた。

IL-6およびsIL-6Rは、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で希釈し、それぞれ50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整した。PD98059およびSP600125は、dimethyl sulphoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) で希釈し、それぞれ50 mMの濃度に調整した。

2. 細胞とその培養

HGFsは、Naruishiらの方法²⁸⁾に従って、4人のドナーの健康なヒト歯肉組織から分離・培養した。培養は、20 mM HEPES (Sigma), 10 %ウシ胎児血清 (FBS, biowest SAS, Nuaille, France), 100 Units/mlペニシリンと100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (共にLife Technologies) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium : DMEM, Life Technologies) を用いて、37 °C, 5 % 炭酸ガス存在下, 95 %湿潤下で行った。細胞が80 %コンフルエントの細胞密度になったところで4倍希釈となるように継代し、5~8継代した細胞を実験に供した。細胞数の計測は、血球計算板 (NanoEn Tec, Seoul, Korea) を用いて計測した。

なお、IL-6添加を行う際には、FBS濃度を0.5 %に低下させた培地で24時間培養した後に使用した。また、HGFsの採取および培養に関しては岡山大学大学院医試薬学総合研究科倫理委員会の承認を受け (承認番号661), 規定に基づき、ドナーに使用目的を十分に説明して了承を得て行った。

3. Caveolin-1発現抑制細胞の樹立

HGFsにおけるCav-1発現抑制は、Yamaguchiらの方法²¹⁾に従って行った。すなわち、HGFsを35-mm dish (Corning, New York, NY, USA) に細胞数 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、前述の記載 (材料ならびに方法2項) と同様に培養した。70 %コンフルエントの細胞密度になってから、Lipofectamin® Transfection Reagent & Plus Reagent (Life Technologies) を用いて、染色体7q31.2.に位置するCav-1遺伝子を標的とするsiRNA (100 nM, Santa Cruz

Biotechnology) をOpti-MEM (Life Technologies) で希釈後、細胞内へ導入した。導入開始から5時間後に、培養培地を添加した。そして、siRNAを導入した24時間後にFBS濃度を0.5%に低下させた培地に交換し、48時間後にIL-6/sIL-6R (各50 ng/ml) を添加した。

4. IL-6シグナル伝達系ERK1/2とJNKの阻害

HGFsを35-mm dishに細胞数 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、前述の記載(材料ならびに方法2項)と同様に培養後、IL-6およびsIL-6R添加30分前に、ERK1/2阻害剤(PD985059)およびJNK阻害剤(SP600125)を50 μMになるように添加し、その後、IL-6/sIL-6R(各50 ng/ml)を添加した^{20, 21)}。

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

HGFsにおいてIL-6/sIL-6RがカテプシンBおよびLの分泌に及ぼす影響は、ウェスタンブロット法を用いて検討した²⁹⁾。すなわち、35-mm dishに細胞数 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、前述の記載(材料ならびに方法2~4項)と同様に培養し、IL-6/sIL-6R(各50 ng/ml)を添加後、24時間ごとに培養上清を回収し、4℃で10分間、 $9,500 \times g$ にて遠心分離を行って上清を回収した。採取した試料は採取後直ちに-80℃で保存した。タンパク質の定量は、Bradfordの方法³⁰⁾に基づいて行った。得られた試料(5 μg)はドデシル硫酸ナトリウムサンプルバッファー[45 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol, 1% sodium dodecyl-sulfate (SDS), 144 mM β-mercaptoethanol]と混合して5分間煮沸して還元状態にした。なお、還元状態になるまでの試料は全て氷上で操作を行った。還元状態にした試料を12%アクリルアミドゲルに展開し、泳動用緩衝液(25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 35 mM SDS)を用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した(室温, 150 V定電圧条件)。その後、分離したタンパク質を、湿式転写装置(MINI PROTEAN® II: Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて転写用バッファー(1.8 mM Tris-HCl, 190 mM glycine, 20% methanol)中で60分間、polyvinylidene difluoride (PVDF)膜(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)へ転写した(4℃, 100 V定電圧条件)。転写後のPVDF膜は、5%スキムミルク(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を含有するトリス緩衝食塩水(TBS: 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.4)に浸漬し、4℃にて1時間のブロッキング操作を施した。その後、一次抗体を5%スキムミルク含有TBSで希釈した溶液中でPVDF膜を4℃, 12時間振とうした。反応後、0.05% Tween-20含有TBS (T-TBS)で洗浄し、二次抗体を5%スキムミルク含有TBSで希釈した溶液中にPVDF膜を浸漬し、4℃で1時間振とうさせた。カテプシンBおよびLの検出には、一次抗体としてラビット由来抗ヒトカテプシンBポリクローナルIgG抗体を1:250の希釈率で、ラビット由来抗ヒトカテプシンLポリクローナルIgG抗体を1:200の希釈率で用い、二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ラビットIgG抗体(GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, United Kingdom)を1:1,000の希釈率で用いた。反応タンパク質の検出は、enhanced chemiluminescence system (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いて行った。

同じPVDF膜上の種々のタンパク質を異なる抗体で検出するために、リプロービングを行った。リプロービングは、抗体除去バッファー (Retore™ Western Blot Stripping Buffer : Thermo Fisher Scientific Inc.) 中でPVDF膜を30分間振とうして抗体を除去した後、上記に記載したブロッキング操作以降と同様の操作を繰り返して行った。また、標的タンパク質に相対するバンドの強度は、画像解析ソフトImage J (version 1.46r, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて黒化度を数値化し、IL-6/sIL-6R無添加の0時間を基準とした相対黒化度とした。また、使用したPVDF膜をcoomassie brilliant blue (CBB) 溶液で染色し、各レーンに等量のタンパクが転写されていることを確認した。

6. enzyme-linked immunosorbent assay法による培養上清中の前駆体カテプシンBの定量

培養上清中の前駆体カテプシンBの量は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を基本としたHuman Pro-cathepsin B Quantikine® ELISA Kit (R&D Systems) を用いて定量した。すなわち、HGFsを35-mm dishに 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、前述の記載 (材料ならびに方法2項) と同様に培養後、IL-6/sIL-6R (各50 ng/ml) を添加した。そして、刺激直後、24, 48, そして72時間後の培養上清を回収して測定した。

7. 培養上清中のカテプシンBおよびLの活性測定

培養上清中のカテプシンBおよびLの活性測定は、蛍光性ペプチドMCA基質を用いて測定した³¹⁾。すなわち、35-mm dishに細胞数 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、前述の記載 (材料ならびに方法2項) と同様に培養後、IL-6/sIL-6R (各50 ng/ml) で刺激し、刺激直後、24, そして48時間後までの培養上清を回収し、4 °Cで10分間、 $9,500 \times g$ にて遠心分離を行った後の上清を回収した。タンパク質の定量は、Bradfordの方法³⁰⁾ に基づいて行った。得られた試料 (1 µg) と基質を、pH5.5の酢酸ナトリウム水溶液 (4 mM EDTA, 0.4 M sodium acetate) で、37 °C, 90分間反応させた。カテプシンBの活性はZ-Arg-Arg-MCAを、カテプシン (B + L) の活性はZ-Phe-Arg-MCAを基質とし、遊離した7-amido-4-methylcoumarin (AMC) を蛍光マイクロプレートリーダー (Gemini XPS ; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて測定し、活性強度とした。なお、遊離したAMCは、370 nmで励起し、460 nmの波長を測定した。

8. 統計処理

各実験系における統計解析は、one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を行い、さらに多重比較検定をScheffe's test, Fisher's protected least significant difference (PLSD) で行った。各々の統計処理には、SPSSソフトウェア (version 13.0, Chicago, IL, USA) を用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を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、IL-6/sIL-6R無添加時においてカテプシンBおよびLを恒常的に分泌していた（図1と2）。なお、ウエスタンブロット法にて検出した培養上清中のカテプシンBおよびLは、分子量から前駆体のみであったと判断した。したがって、以後の結果と図で表記するカテプシンBおよびLは、前駆体カテプシンBおよびLを意味する。

ウエスタンブロット法にて検出した分泌されたカテプシンBおよびL量は、IL-6/sIL-6R無添加時と比較して添加時には、24、48、そして72時間後に増加した（図1； $p<0.05$ ）。ELISA法にて検出した分泌されたカテプシンB量も、ウエスタンブロット法による検出結果と同様に、IL-6/sIL-6R添加時には、48および72時間後に増加した（図2； $p<0.05$ ）。

2. 上清中のカテプシンBおよびLの活性の検討

分泌されたカテプシンBおよびカテプシン（B+L）の活性は、pH5.5の酢酸ナトリウム水溶液下でIL-6/sIL-6Rの添加によって分泌が増加したことに遅れ、添加48時間後において亢進した（図3； $p<0.05$ ）。また、添加時のカテプシンBとカテプシン（B+L）の活性は、24と48時間の時点間で亢進した（図3； $p<0.05$ ）。

3. Cav-1 がカテプシンBおよびLの分泌に及ぼす影響

siRNAを導入して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、control siRNAを導入してCav-1の発現を抑制してないものと比較して、IL-6/sIL-6R添加の有無に関わらず減少した（図4 AとB； $p<0.05$ ）。一方、分泌されたカテプシンL量は、Cav-1の発現を抑制していないものと比較して、IL-6/sIL-6Rの添加時のみ減少した（図4 AとC； $p<0.05$ ）。

Cav-1の発現を抑制していないHGFsから分泌されたカテプシンBおよびL量は、IL-6/sIL-6Rの添加によって48時間後において増加した（図4； $p<0.05$ ）。

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

IL-6/sIL-6Rを添加した場合、ERK1/2またはJNKを阻害したHGFsから分泌されたカテプシンB量は、阻害していないものと比較して減少した（図5 AとB； $p<0.05$ ）。また、ERK1/2およびJNKの両方を阻害したHGFsから分泌されたカテプシンB量は、それぞれ単独で阻害したものと比較して相加的に減少した（図5 AとB； $p<0.05$ ）。一方、ERK1/2を阻害したHGFsから分泌されたカテプシンL量は、阻害していないものと比較し変化しなかったが、JNKを阻害したものでは減少した（図5 AとC； $p<0.05$ ）。

ERK1/2およびJNKの両方を阻害していないHGFsから分泌されたカテプシンBおよびL量は、IL-6/sIL-6Rの添加によって48時間後において増加した（図5 ; $p < 0.05$ ）。

なお、IL-6/sIL-6Rを添加しない場合、ERK1/2またはJNKを阻害したHGFsから分泌されるカテプシンBおよびL量は、阻害していないものと比較して変化はなかった。

考察

本研究において、IL-6のHGFsにおけるカテプシンBおよびLの分泌に対する影響を調べた結果を、以下にまとめる。

1. HGFsは恒常的に前駆体カテプシンBおよびLを分泌しており、IL-6/sIL-6Rはその分泌量を亢進させた。
2. 分泌された前駆体カテプシンBおよびLは、pH5.5の酢酸ナトリウム水溶液下で活性を有した。
3. Cav-1は、細胞膜から核へのシグナル伝達以外にも、前駆体カテプシンBの分泌に関与していた。
4. 前駆体カテプシンBの分泌に関わるIL-6のシグナル伝達系には、JNKとERK1/2が関与していた。
5. 前駆体カテプシンLの分泌に関わるIL-6のシグナル伝達系には、JNKが関与していた。

HGFsにおいて、通常細胞内に存在するカテプシンが恒常的に細胞外へ分泌されており、IL-6刺激は細胞外へのカテプシン分泌を亢進させることが分かった(図1, 2)。さらに、細胞外へ分泌されたカテプシンBおよびLはウエスタンブロット法にて前駆体として検出されたが、前駆体の状態でもpH5.5の酢酸ナトリウム水溶液下で活性を有することが明らかとなった(図3)。炎症巣部では酸性環境下になることが報告されており³²⁾、歯周炎の病変部位の環境も酸性であり、分泌されたカテプシンBおよびLは活性を有していると考えられる。以上のことは、悪性腫瘍細胞から分泌される前駆体カテプシンBが活性を示して細胞外基質を分解する²⁴⁻²⁶⁾ことと一致する。さらに、慢性関節リウマチ患者から採取した滑膜液中のカテプシンBおよびLはI型コラーゲンを分解するという報告³³⁾もあるので、歯周炎においても分泌された前駆体カテプシンBおよびLが歯周組織を構築するコラーゲン等の細胞外基質の破壊に関与していると考えられる。以上のことから、歯周炎症部におけるHGFsからのカテプシンの分泌を制御することは、歯周炎の病態制御につながると考えた。そこで、IL-6刺激によるカテプシンBおよびLの細胞外への分泌機序を調べ、細胞内のカテプシンの産生機序との相違を検討した。

HGFs内のIL-6刺激によるカテプシンBおよびLの産生亢進において、膜タンパクの一つであるCav-1が必要であることが報告されている²¹⁾。本研究においても、siRNAを用いてHGFsにおけるCav-1の発現を抑制したところ、IL-6/sIL-6R添加時のカテプシンBおよびLの分泌が有意に減少した(図4)。また、カテプシンBの分泌においては、IL-6/sIL-6R無添加の場合においてさえも有意に減少した(図4)。以上の結果から、Cav-1がIL-6のシグナル伝達経路に関与している一方で、カテプシンBの分泌においては細胞膜から細胞外への分泌にCav-1が関与していると考えられる。これまでに、Cav-1がコレステロールの小胞体から細胞膜への輸送に関与しているという報告がある³⁴⁾。また、Cav-1はカベオラから小胞体そしてゴルジ装置からカベオラという経路で細胞内をリサイクリングしていると考えられている³⁵⁾。さ

らに、Cav-1の発現を抑制した大腸癌細胞では、前駆体カテプシンBの産生と分泌が減少したという報告³⁶⁾や、Cav-1とカテプシンBが共発現している乳癌細胞では浸潤や転移が亢進し、悪性度が高いという報告もある³⁷⁾。本研究からも、カテプシンBの分泌とCav-1の関係が示唆されたので、少なくとも分泌型カテプシンが関与する歯周炎症巣部位での組織破壊においてCav-1が重要な分子であると考えられる。

IL-6のシグナル伝達経路の1つにMAPK系がある。IL-6刺激時のHGFsにおいて細胞内のカテプシンBおよびLの産生亢進には、MAPK系のうちJNKが関与し、ERK1/2は関与していないことが報告されている²¹⁾。そこで本研究では、カテプシンBおよびLの細胞外への分泌におけるMAPK系の関与を検討した。その結果、カテプシンBの分泌は、JNKとERK1/2のどちらを阻害した条件においても有意に減少したが、カテプシンLの分泌は細胞内のカテプシン産生と同様にJNKの阻害時のみに減少した(図5)。以上の結果から、カテプシンBおよびカテプシンLの分泌メカニズムが異なる可能性が示唆された。特に注目すべき点は、カテプシンBの分泌にはERK1/2が関与していることである。カテプシンの細胞外への分泌については未だ不明な点が多いが、臍帯静脈内皮細胞ではアネキシンIIがCav-1を介してカテプシンBの分泌に関与しているという報告がある³⁸⁾。アネキシンIIは細胞内の膜輸送に関与しているリン脂質に結合するタンパク質として知られている³⁹⁾。したがって、ERK1/2がカテプシンBの分泌に関与しているのは、アネキシンIIといったカテプシンBを細胞外へ輸送するタンパク質の産生や機能と関与しているためと考えられる。今後は、カテプシンBの細胞外輸送に関わるタンパク質にも解析を展開する必要がある。

なお本研究では、4人のドナーから採取した歯肉線維芽細胞を使用して得た実験の結果を用いている。本実験結果に用いた4人のドナーから採取した細胞においては、IL-6/sIL-6Rの添加によって、分泌されたカテプシンBおよびLの量が増加していることをウエスタンブロット法にて確認できた。しかし、別の実験では1人のドナーにおいて、IL-6/sIL-6Rを添加した場合でも、培養上清中のカテプシンBおよびLの分泌量は増加せず、添加していない場合と変化がなかった。また、このドナーから採取した培養上清中のカテプシンBおよびLの活性は、分泌量が増加していないためIL-6/sIL-6Rの添加の有無に関わらず変化がなかった。以上のことから、本研究結果には個体差があり、IL-6がHGFsにおいてカテプシンBおよびLの分泌量を増加させるという作用は、全ての個体に対して起る作用ではない可能性がある。IL-6による細胞外へのカテプシン分泌量が増加しなかった要因としては、IL-6のシグナルを細胞内へ伝達するgp130が機能していないか、カテプシンを分泌するための細胞内のシグナルが機能していないことが推察される。

カテプシンは不要となった細胞外基質をアミノ酸レベルにまで分解するため、生体内にとっては必要不可欠なプロテアーゼである。しかし、炎症時には細胞外に存在し、組織破壊を助長している可能性がある。本研究結果から、カテプシンBおよびLがヒト歯肉線維芽細胞外に分泌される機序の一端を解明することができた。本機序の詳細をさらに解明することによって、ホメオスタシスに必要な細胞内のカテプシン産生を抑制することなく、歯周組織破壊に関与すると推測される分泌型カテプシンの産生を抑制する新たな治療法の可

能性を模索することができる。以上のことから、本研究結果は、慢性炎症組織における分泌されたカテプシンBとLの存在を明らかとし、その分泌機序の一端を解明することで、IL-6が関与した慢性炎症悪化の病態解明につながると考えられる。

結論

IL-6/sIL-6Rは、HGFsにおいて、前駆体カテプシンBおよびLの細胞外への分泌を亢進させた。この前駆体カテプシンBおよびLは、pH5.5の条件下で活性を発揮した。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。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，様々な面にわたり終始ご指導賜り，貴重なご助言とご協力を下さいました岡山大学病院歯周科の大森一弘講師，九州大学病院口腔総合診療科の富川知子助教，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の小林寛也助教，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**, 604-617, 1955.
- 2) Bainton, D. F.: The discovery of lysosomes. *J. Cell. Biol.*, **91**, 66-76, 1981.
- 3) Doria, A., Gatto, M., and Punzi, L.: Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.*, **368**, 1845-1846, 2013.
- 4) Shaw, E., and Dean, R. T.: The inhibition of macrophage protein turnover by a selective inhibitor of thiol proteinases. *Biochem. J.*, **186**, 385-390, 1980.
- 5) Rossi, A., Deveraux, Q., Turk, B., and Sali, A.: Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.*, **385**, 363-372, 2004.
- 6) Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M., and Kokubo, T.: Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 89-96, 1995.
- 7) Mort, J. S., and Buttle, D. J.: Cathepsin B. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **29**, 715-720, 1997.
- 8) Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A., and Desnick, R. J.: Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, **273**, 1236-1238, 1996.
- 9) Hart, T. C., Hart, P. S., Bowden, D. W., Michalec, M. D., Callison, S. A., Walker, S. J., Zhang, Y., and Firatli, E.: Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefèvre syndrome. *J. Med. Genet.*, **36**, 881-887, 1999.
- 10) Nishimura, F., Naruishi, H., Naruishi, K., Yamada, T., Sasaki, J., Peters, C., Uchiyama, Y., and Murayama, Y.: Cathepsin-L, a key molecule in the pathogenesis of drug-induced and I-cell disease-mediated gingival overgrowth: a study with cathepsin-L-deficient mice. *Am. J. Pathol.*, **161**, 2047-2052, 2002.
- 11) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T., and Kishimoto, T.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, **324**, 73-76, 1986.
- 12) Van Snick, J.: Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 253-278, 1990.
- 13) Hirano, T.: Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.*, **16**, 249-284,

1998.

- 14) Ganter, U., Arcone, R., Toniatti, C., Morrone, G., and Ciliberto, G.: Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *EMBO. J.*, **8**, 3773-3779, 1989.
- 15) Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T.: Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.*, **54**, 1-78, 1993
- 16) Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T.: Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, **86**, 1243-1254, 1995.
- 17) Naruishi, K., Takashiba, S., Chou, H. H., Arai, H., Nishimura, F., and Murayama, Y.: Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *J. Periodontal. Res.*, **34**, 296-300, 1999.
- 18) Okada, H., and Murakami, S.: Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **9**, 248-266, 1998.
- 19) Domeiji, H., Yucel-Lindberg, T., and Mod er, T.: Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *Eur. J. Oral Sci.*, **110**, 302-306, 2002.
- 20) Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., Omori, K., Yamaguchi, M., and Takashiba, S.: C-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, blocks interleukin (IL)-6-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production: cyclosporine A partially mimics this inhibitory effect. *Transplantation*, **76**, 1380-1382, 2003.
- 21) Yamaguchi, T., Naruishi, K., Arai, H., Nishimura, F., and Takashiba, S.: IL-6/sIL-6R enhances cathepsin B and L production via caveolin-1-mediated JNK-AP-1 pathway in human gingival fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **217**, 423-432, 2008.
- 22) Trabandt, A., M ller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Gay, R. E., and Gay, S.: Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues. *Lab. Invest.*, **73**, 205-212, 1995.
- 23) Ikeda, Y., Ikata, T., Mishiro, T., Nakano, S., Ikebe, M., and Yasuoka, S.: Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase. *J. Med. Invest.*, **47**, 61-75, 2000.
- 24) Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., and Sloane, B. F.: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.*, **54**, 6617-6625, 1994.
- 25) Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V., and Kos, J.: Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell. Res.*, **283**, 206-214, 2003.

- 26) Victor, B. C., Anbalagan, A, Mohamed, M. M., Sloane, B. F., and Cavallo-Medved D.: Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. *Breast Cancer Res.*, **13**, 2011.
- 27) Kunitatsu, K., Yamamoto, K., Ichimaru, E., Kato, Y. and Kato, I.: Cathepsins B, H and L activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects. *J. Periodontal. Res.*, **25**, 69-73, 1990.
- 28) Naruishi, K., Takashiba, S., Nishimura, F., Chou, H. H., Arai, H., Yamada, H., and Murayama, Y.: Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J. Dent. Res.*, **80**, 1421-1424, 2001.
- 29) Omori, K., Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., and Takashiba, S.: High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6643-6649, 2004.
- 30) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
- 31) Barrett, A. J., and Kirschke, H.: Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods. Enzymol.*, **80**, 535-561, 1981.
- 32) Menkin, V.: Studies on Inflammation: X. The Cytological Picture of an Inflammatory Exudate in Relation to its Hydrogen Ion Concentration. *Am. J. Pathol.*, **10**, 193-210, 1934.
- 33) Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., Turk, V., and Katunuma, N.: Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 334-339, 2001.
- 34) Uittenbogaard, A., Ying, Y., and Smart E. J.: Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.*, **273**, 6525-32, 1998.
- 35) Conrad, P. A., Smart, E. J., Ying, Y. S., Anderson, R. G., and Bloom, G. S.: Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J. Cell. Biol.*, **131**, 1421-1433, 1995.
- 36) Cavallo-Medved, D., Mai, J., Dosescu, J., Sameni, M., and Sloane, B. F.: Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J. Cell. Sci.*, **118**, 1493-1503, 2005.
- 37) Nouh, M. A., Mohamed, M. M., El-Shinawi, M., Shaalan, M. A., Cavallo-Medved, D., Khaled,

- H. M., and Sloane, B. F.: Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer. *J. Transl. Med.*, **9**, 2011.
- 38) Cavallo-Medved, D., Rudy, D., Blum, G., Bogyo, M., Caglic, D., and Sloane, B. F.: Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation. *Exp. Cell. Res.*, **315**, 1234-1246, 2009.
- 39) Moss, S. E., and Morgan, R. O.: The annexins. *Genome. Biol.*, **5**, 1-8, 2004.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野（指導：高柴正悟教授）

本文の一部は、以下の学会において発表した。

第 136 回日本保存学会春季学術大会（2012 年 6 月，沖縄）

The 91st General Meeting, International Association for Dental Research（2013 年 3 月，シアトル，アメリカ合衆国）

第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会（2014 年 10 月，神戸）

図の説明

図 1. IL-6/sIL-6R が HGFs のカテプシン B および L 分泌に及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) の培養系に、IL-6/sIL-6R (各 50 ng/ml) を添加し、0~72 時間培養後に回収した培養上清中のカテプシン B および L 分泌量をウエスタンブロット法にて調べた。

(A) 上清中のカテプシンのウエスタンブロット像 (一人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験結果の代表例; CBB 染色像は用いたタンパク 5 μ g 分の上清中のタンパク量の確認用)

(B) 相対黒化度で示したカテプシン B のタンパク質分泌量

(C) 相対黒化度で示したカテプシン L のタンパク質分泌量

ウエスタンブロット法で検出された各カテプシンに相当するバンドの強度は、解析ソフト Image J を用いて黒化度を数値化し、IL-6/sIL-6R 無添加 0 時間を 1.0 とした比で相対黒化度を算出した。

グラフは一人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。カテプシン B および L の相対黒化度の違いは、ANOVA / Scheffe's test を用いて検定した。*, $p < 0.05$

図 2. IL-6/sIL-6R が HGFs の前駆体カテプシン B 分泌に及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) の培養系に、rhIL-6/rhsIL-6R (各 50 ng/ml) を添加し、0~72 時間後の培養上清中に分泌された前駆体カテプシン B 量を ELISA 法にて定量した。

グラフは図 1 の一人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。前駆体カテプシン B の分泌量の違いは、ANOVA / Fisher's PLSD を用いて検定した。**, $p < 0.01$

図 3. IL-6/sIL-6R が分泌させたカテプシン B および L の活性

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) の培養系に rhIL-6/rhsIL-6R (各 50 ng/ml) を添加し、0~48 時間後に培養上清中へ分泌されたカテプシン B および L 酵素活性を、基質からの蛍光性ペプチドの遊離度によって調べた。

(A) カテプシン B の活性

(B) カテプシン (B + L) の活性

活性強度を測定するために、カテプシン B には Z-Arg-Arg-MCA を、カテプシン L のみの活性を測定する基質がないため、カテプシン (B + L) には Z-Phe-Arg-MCA を用いた。活性強度の数値は、IL-6/sIL-6R 無添加 0 時間を 1.0 とした比で相対活性度を算出した。

グラフは図 1 のドナーとは異なるドナー 1 名から得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。カテプシン B および B + L の活性強度の違いは、ANOVA / Fisher's PLSD を用いて検定した。*, $p < 0.05$

図 4. Cav-1 が IL-6/sIL-6R 誘導性のカテプシン 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 を用いて、Cav-1 がカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響を検討した。Cav-1 の siRNA (100 nM) を HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) にトランスフェクションした 48 時間後の培養系に、IL-6/sIL-6R (各 50 ng/ml) を添加し、0~48 時間後に回収した培養上清中のカテプシン B および L 分泌量をウエスタンブロット法にて調べた。

(A) 上清中のカテプシンのウエスタンブロット像 (一人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験結果の代表例; CBB 染色像は用いたタンパク 5 μ g 分の上清中のタンパク量の確認用)

(B) 相対黒化度で示したカテプシン B のタンパク質分泌量

(C) 相対黒化度で示したカテプシン L のタンパク質分泌量

ウエスタンブロット法により検出された各タンパク質に相当するバンドの強度は、解析ソフト Image J を用いて黒化度を数値化し、IL-6/sIL-6R 無添加 0 時間を 1.0 とした比で算出した。

グラフは図 1 の一人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。カテプシン B および L の相対黒化度の違いは、ANOVA / Fisher's PLSD を用いて検定した。*, $p < 0.05$

図 5. ERK1/2 および JNK の抑制が IL-6/sIL-6R 誘導性のカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響

IL-6/sIL-6R 添加によって増強する ERK1/2 および JNK シグナルを阻害した HGFs を用いて、MAPK 系がカテプシン B および L の分泌に及ぼす影響を検討した。ERK1/2 阻害剤である PD985059 と JNK 阻害剤である SP600125 (各 50 μ M) を HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) に添加した 30 分後の培養系に、IL-6/sIL-6R (各 50 ng/ml) を添加し、0~48 時間後に回収した培養上清中のカテプシン B および L 分泌量をウエスタンブロット法にて調べた。

(A) 上清中のカテプシンのウエスタンブロット像 (二人のドナーから得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験結果の代表例; CBB 染色像は用いたタンパク 5 μ g 分の上清中のタンパク量の確認用)

(B) 相対黒化度で示したカテプシン B のタンパク質分泌量

(C) 相対黒化度で示したカテプシン L のタンパク質分泌量

ウエスタンブロット法で検出された各カテプシンに相当するバンドの強度は、解析ソフト Image J を用いて黒化度を数値化し、IL-6/sIL-6R 無添加 0 時間を 1.0 とした比で相対黒化度を算出した。

グラフは二人のドナー (図 3 と同じドナーとさらにもう一人) から得た HGFs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。カテプシン B および L の相対黒化度の違いは、ANOVA / Fisher's PLSD を用いて検定した。*, $p < 0.05$