

氏名	山本 総司		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5486号		
学位授与の日付	平成29年3月24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)		
学位論文の題目	真菌二次代謝産物である(+)-terrein がヒト歯肉線維芽細胞における interleukin-6 誘導性タンパク質の産生に及ぼす影響とその標的分子の解明		
論文審査委員	大原 直也 教授	稲葉 裕明 准教授	高柴 正悟 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

慢性歯周炎は歯周病原性細菌による感染性疾患であると同時に、過剰な免疫反応によって歯槽骨が破壊される炎症性疾患でもある。歯周病治療は、感染源の除去によって歯周組織の治癒を促すが、治癒経過は宿主の生体反応性に依存している。したがって、生体の炎症反応を効果的に制御する先進的な歯周病治療の開発が求められる。

インターロイキン6 (IL-6) はヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) が産生する炎症性サイトカインの1種で、慢性歯周炎に深く関連する。IL-6は可溶性IL-6受容体 (sIL-6R) と複合体を形成し、HGFs表層のglycoprotein 130 (gp130) に結合する。さらにヤヌスキナーゼ (Janus kinase: JAK) /シグナル伝達兼転写活性化因子 (signal transducers and activator of transcription: STAT), Ras/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinases: Ras/MAPKs), そしてPI3キナーゼ (Phosphoinositide 3 kinase: PI3K) /プロテインキナーゼB (Akt) といった細胞内刺激伝達系を介して炎症関連因子の産生を促進し、慢性炎症を進展させる。そのため、IL-6作用の制御は慢性炎症の制御に重要であると考えられ、生物学的製剤が近年応用されている。しかし、感染症やアレルギーなどの重篤な副作用が発症し、医療経済的負担が大きいなど、問題もある。以上の背景から、優れたIL-6制御作用を有し、重篤な副作用が少なく、医療経済面に優れた新規の抗炎症薬の開発が求められる。

(+)-terreinは真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として1935年に分離された二次代謝産物であり、近年では抗菌作用、癌細胞におけるangiogenin産生抑制による抗癌作用、メラニン産生抑制、植物成長の抑制、そして歯髄細胞における抗炎症作用など、様々な生理的作用が報告されている。現在では、有機化学的に合成する経路も確立され、応用範囲が拡大されつつある。所属する研究室では、有機化学合成した(+)-terreinがHGFsにおいて、IL-6誘導性のSTAT3と細胞外シグナル調節キナーゼ1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2: ERK1/2) のリン酸化を抑制して、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の産生を抑制することを報告し、抗IL-6作用による抗炎症薬としての可能性が示唆された。しかし、VEGF以外のIL-6誘導性タンパク因子への影響の有無や、その作用機序については未だ不明である。

本研究では、(+)-terreinがHGFsにおいてIL-6誘導性のタンパク因子産生に及ぼす影響を解析するとともに、IL-6細胞内シグナル伝達系における(+)-terreinの標的分子を明らかにして、(+)-terreinの作用効果と作用機序の解明を図った。

【材料と方法】

1. 試薬: (+)-terreinは、L-酒石酸から化学合成し、10 μ Mの濃度で用いた。リコンビナントヒトIL-6 (rIL-6) とリコンビナントヒトsIL-6R (rsIL-6R) は、各50 ng/mlの濃度で用いた。
2. 細胞培養: 健康なヒト歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を用いた。培養は、10% ウシ胎児血清, 20 mM HEPES, 100 units/mL ペニシリンと100 μ g/mL ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地を用いて、37 $^{\circ}$ C, 5%炭酸ガス存在下, 95%湿

潤下で行った。細胞密度が80 %コンフルエントに達したときに4倍希釈で継代し、5~8 継代の細胞を実験に用いた。(岡山大学生命倫理審査委員会承認番号 661)

3. (+)-terreinが影響を及ぼすIL-6関連遺伝子発現の網羅的解析: HGFsを12-well plateに 5.0×10^4 cells/cm²の密度で播種して24時間培養後、(+)-terrein (10 μ M) で30分間処理した後に、rIL-6/rsIL-6R (各々50 ng/ml) を添加した。添加12時間後に回収した全RNAからcDNAを合成し、増殖遺伝子のcDNA量をRT² ProfilerTM PCR Array Human Growth Factors (84遺伝子, Qiagen) を用いて網羅的に解析した。精度が高いと判断された遺伝子のうち、発現がrIL-6刺激で5倍以上促進され、且つ(+)-terrein処理で抑制された6種は、リアルタイムPCR法にて追試を行った。
4. (+)-terreinがIL-6誘導性タンパク質の産生に及ぼす影響の検討: HGFsを上記3項と同様に調製し、rIL-6/rsIL-6Rを添加して24時間後の培養上清において、リアルタイムPCR法で差がみられたVEGF及びコロニー刺激因子(CSF1)の産生量を、ELISA法を用いて検討した。
5. (+)-terreinがIL-6細胞内刺激伝達系に及ぼす影響の検討: HGFsを35-mm dishに 5.0×10^4 /cm²の密度で播種して上記3項と同様に調製し、rIL-6/rsIL-6Rを添加した。そして添加1分後または5分後にHGFsをNonidet-P40を主剤とした細胞溶解バッファーを用いて回収した細胞タンパク中の、リン酸化Akt, リン酸化チロシンホスチターゼSHP2 (SHP2), そしてリン酸化JAK1をウェスタンブロット法にて検討した。
6. 統計解析: one-way analysis of variance (one-way ANOVA) 及びSheffe's testを用いた。p値が0.05未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. (+)-terreinが影響を及ぼすIL-6関連遺伝子発現: (+)-terreinを添加すると、rIL-6によって誘導された成長因子のmRNAの発現が抑制される傾向がみられた。84遺伝子のうち、材料と方法3項に則り、VEGF-A, 脳由来神経栄養因子(BDNF), Dickkopf-related protein 1 (DKK1), 骨形成タンパク質1 (BMP1), 小胞体アミノペプチダーゼ1 (ERAP1), そしてCSF1の6因子を見出した。さらにリアルタイムPCR法では、(+)-terreinはHGFsにおいてrIL-6誘導性のVEGF-A及びCSF1のみが遺伝子発現を抑制した(各50%の抑制)。
2. (+)-terreinが産生に影響を及ぼすIL-6誘導性タンパク質: (+)-terreinは、HGFsにおいてrIL-6誘導性VEGF-A及びCSF1の産生を有意に抑制した(前者50%と後者66%の抑制)。
3. (+)-terreinが影響したIL-6細胞内刺激伝達系: (+)-terreinは、HGFsにおいてrIL-6細胞内刺激伝達系のAkt, SHP2, そしてJAK1のリン酸化を抑制した(AktとSHP2は50%, JAK1は60%の抑制)。

【考察】

本研究において、(+)-terreinはIL-6誘導性VEGFとCSF1の産生を抑制した。(+)-terreinがHGFsにおいてIL-6誘導性VEGFを抑制するという知見は所属する研究室から既に報告されているため、本研究で得られた知見は信頼に足るものと思われる。

CSF1は造血幹細胞にマクロファージへの分化を促進することで、慢性炎症の進展に関与している。これによって、IL-6の制御による(+)-terreinの抗炎症効果の新たな可能性が示唆された。

VEGFおよびCSF1は、IL-6細胞内刺激伝達系のうち主にRas/MAPKsに誘導される分子である。同様にRas/MAPKsに誘導される分子についても、(+)-terreinが影響を及ぼす可能性がある。

(+)-terreinはIL-6細胞内刺激伝達系の最上流に位置するJAK1を標的として抗IL-6作用を発揮する可能性が示唆された。また、JAK阻害剤は近年自己免疫疾患や炎症性疾患の治療薬として開発が進められている分野でもあるため、JAK阻害剤として広範囲の医療分野に応用できる(+)-terreinのリーディング化合物としての可能性が示唆された。

【結論】

(+)-terreinはHGFsにおいて、IL-6誘導性CSF1の産生を抑制し、さらに細胞内刺激伝達系の最上流に存在するJAK1を標的として、抗IL-6作用を発揮する可能性が強化された。

論文審査結果の要旨

慢性歯周炎は歯周病原性細菌による感染性疾患であると同時に、過剰な免疫反応によって歯槽骨が破壊される炎症性疾患でもある。歯周病治療は、感染源の除去によって歯周組織の治癒を促すが、治癒経過は宿主の生体反応性に依存している。よって、生体の炎症反応を効果的に制御し、且つ重篤な副作用が少なく、医療経済面に優れた新規の抗炎症薬の開発が求められる。

真菌 *Aspergillus terreus* の二次代謝産物である (+)-terrein は、近年様々な分野でその生理的作用が報告されている。所属する研究室では、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) において、(+)-terrein は炎症性サイトカインであるインターロイキン6 (IL-6) の細胞内シグナル伝達に関与する STAT3 と ERK1/2 のリン酸化を抑制することにより、IL-6 誘導性血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生を抑制することを報告した。このことは、(+)-terrein は、IL-6 を制御することを作用機序とする抗炎症薬として用いることができる可能性を有することを示唆している。しかし、VEGF 以外の IL-6 誘導性タンパク質因子への影響の有無、およびその作用機序については不明であるため、それらの検討が必要と考えた。

本研究では、HGFs において (+)-terrein が IL-6 関連遺伝子に及ぼす影響を、PCR Array を用いて網羅的解析を行い、得られた結果に対し、リアルタイムPCR法により追試した。IL-6 誘導性タンパク質の産生に及ぼす影響は、固相酵素免疫測定法 (ELISA法) により検討した。また、(+)-terrein の作用機序解明のため、IL-6 シグナル伝達系路中の Akt, SHP2, JAK1 のリン酸化に (+)-terrein が及ぼす影響をウエスタンブロット法により検討した。結果は以下のとおりであった。

1. (+)-terrein が影響を及ぼす IL-6 関連遺伝子の発現

PCR Array を用いた網羅的解析の結果、VEGF-A, BDNF, DKK1, BMP1, ERAP1, そして CSF1 の6因子を、(+)-terrein が影響を及ぼす因子として抽出した。さらにリアルタイムPCR法による追試の結果、(+)-terrein は IL-6 誘導性の VEGF-A と CSF1 の遺伝子発現を有意に抑制することが確認された。

2. (+)-terrein が産生に影響を及ぼす IL-6 誘導性タンパク質

ELISA法により、(+)-terrein は HGFs において IL-6 誘導性の VEGF-A と CSF1 の産生を有意に抑制することが、タンパク質においても確認された。

3. (+)-terrein が影響した IL-6 細胞内シグナル伝達系の分子

(+)-terrein は、HGFs において IL-6 細胞内シグナル伝達系路中の Akt, SHP2, および JAK1 のリン酸化を有意に抑制した。

(+)-terrein は IL-6 によって誘導される VEGF の産生とともに、CSF1 の産生を抑制することが明らかになった。CSF1 は造血幹細胞にマクロファージへの分化を促進することで、慢性炎症の進展に関与する。また、(+)-terrein は HGFs の IL-6 細胞内シグナル伝達系の最上流に位置する JAK1 を標的として、IL-6 の作用を制御する可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、新規の抗炎症薬としての可能性を有する (+)-terrein の作用効果と作用機序の解明の一助となり、今後の歯科治療の発展に貢献するものである。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。