

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

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

山本 総司

**Effects of synthetic (+)-terrein on secretion of proteins induced by interleukin-6
and the target molecules on signaling pathway in human gingival fibroblasts**

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Satoshi Yamamoto

(平成28年12月15日受付)

緒言

慢性歯周炎は歯周病原性細菌の感染によって生じる感染性疾患である¹⁾と同時に、過剰な免疫反応によって顎骨（歯槽骨）の破壊が惹起される炎症性疾患でもある²⁾。通常、生体組織内に侵入した異物に対して、まず好中球が遊走し貪食作用を発揮する³⁾。次いでマクロファージによる貪食作用、抗原提示、サイトカイン産生などを通じて、各種免疫反応が進行していく⁴⁾。慢性歯周炎において、歯周病原細菌の長期的な停滞が、歯周組織に菌体タンパク質やリポ多糖（lipopolysaccharide : LPS）など異物の侵入を絶えず引き起こす。その結果、上記の免疫反応が持続的に惹起されるため、過剰な自己組織の破壊、すなわち歯周組織の破壊が引き起こされる。実際の歯周病治療において、まず優先されるのは感染源の除去である。歯周基本治療の一つであるスケーリングやルートプレーニングによって感染源を除去することで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のが現状である。日常臨床においても、感染源除去だけでは完全な治癒を得られない慢性歯周炎患者症例も多く存在する。したがって、生体の炎症反応を効果的に制御する新たな治療法を見出すことが、歯周病治療を発展させる上で求められている。

インターロイキン6（interleukin-6 : IL-6）は、炎症反応や免疫反応をはじめとした、多様な生理的作用を有するサイトカインである⁵⁾。また、歯周組織の大部分を占める

ヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts : HGFs) によって産生される炎症性サイトカインでもある⁶⁾。慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中には健常者と比較すると多量のIL-6が存在するなど、慢性歯周炎の病態と深い関連性が報告されている⁷⁾。HGFsにおいて、IL-6は可溶性IL-6受容体 (soluble IL-6 receptor : sIL-6R) と複合体を形成した後、細胞膜表層のglycoprotein 130 (gp130) に結合する⁸⁾。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) ⁹⁾、Ras/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (Ras/mitogen-activated protein kinases : Ras/MAPKs) ¹⁰⁾、そしてホスホファチジルイノシトール3キナーゼ (Phosphatidylinositol 3 kinase : PI3K) /プロテインキナーゼB (Akt) ¹¹⁾といった細胞内シグナル伝達系を介して炎症関連因子の産生を促進することで、慢性炎症の進展に関与している。IL-6は慢性歯周炎だけでなく、関節リウマチ¹²⁾、クローン病¹³⁾、そして糖尿病¹⁴⁾など種々の炎症性疾患の進展にも関与しており、これら疾患の治療のためにIL-6を制御する治療法が多く研究されている。すなわち、IL-6の作用を制御することは慢性歯周炎における炎症反応制御においても重要であると考えられる。現在、IL-6の作用を制御する手法の一つとして、抗IL-6抗体医薬などの生物学的製剤が関節リウマチを対象に臨床応用され始めている。しかし、生物学的製剤の投与は、感染症やアレルギーなどの重篤な副作用が発症する可能性があり、静脈注射や

皮下注射が必要であり、また非常に高価なため医療経済的負担が大きい、といった理由から投与が困難となる場合もある。況してや、国民病の一つである歯周病治療への生物学的製剤の導入はさらに困難である。以上のような背景から、優れたIL-6制御作用を有し、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。

(+)-terreinは近年、抗菌作用¹⁵⁾、癌細胞におけるangiogenin産生抑制による抗癌作用¹⁶⁾、メラニン産生抑制¹⁷⁾、植物成長抑制¹⁸⁾、そして歯髄細胞における抗炎症作用¹⁹⁾など、様々な生理的作用が報告されている物質である。1935年にRaistrickとSmithによって、真菌の一種である*Aspergillus terreus*から二次代謝産物として分離された化合物であり²⁰⁾、現在では同様の物質を有機化学的に合成する経路も確立されている²¹⁾。所属する研究室の先行知見として、有機化学的合成によって得られた(+)-terreinがHGFsにおいて、IL-6/sIL-6R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た²²⁾。VEGFは慢性炎症において、幼若血管新生を促進することによって炎症の進展に関与することと知られるタンパク質である²³⁾。以上の知見から、(+)-terreinはIL-6の作用を制御することによって、IL-6誘導性の炎症の進展を抑制することができる可能性が示唆され

る。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な点が多い。

本研究では、(+)-terreinがHGFsにおいてIL-6/sIL-6R誘導性のタンパク質産生に及ぼす影響を網羅的に解析するとともに、IL-6/sIL-6R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することによって、(+)-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、Mandaiらの方法²²⁾に従ってL-酒石酸から合成したものを、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline : PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で希釈して100 mMの濃度に調整して-80°C下で保存した。使用の際には、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium : DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) で10 μ Mに調整した²²⁾。

リコンビナントヒトIL-6 (rIL-6), リコンビナントヒトsIL-6R (rIL-6R) はR&D systems (Minneapolis, MN, USA) 製を用いた。rIL-6およびrsIL-6RはPBSで希釈し、それぞれ50 μ g/mLの濃度に調整して-30°C下で保存した。

2. 細胞培養

細胞は、Naruishiらの方法⁶⁾に従って、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として用いた。培養は、10 %ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, Biowest SAS, Nuaille, France), 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA),

100 Units/mL ペニシリンと100 µg/mL ストレプトマイシン（共にLife Technologies）を含むDMEM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（NanoEntec, Seoul, Korea）を用いて計測した。

本研究では、一人のドナーから得たHGFsを用いて独立した実験を行った。なお、HGFsの採取および培養に関しては、岡山大学生命倫理審査委員会の承認を受け（承認番号 661）、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. (+)-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、前述の記載（材料と方法2項）と同様に培養後、(+)-terrein（10 µM）で30分前処理した後に、rIL-6/rsIL-6R（各々50 ng/mL）⁶⁾を添加した。そして添加12時間後に全RNAをRNeasy Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）にて抽出した。RNAの濃度と純度は、NanoDrop 2000（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて260 nmと280 nmでの吸光度とその比を用いて測定した。全てのRNAの純度は、A260/A280値が1.8～2.2の間である事を確認した。また、RNA抽出過程でRNase-Free DNase Set（Qiagen）を用いて混入したDNAを除去

した。抽出したRNA 1 μg をテンプレートとして、50 μM oligo (dT) 12-18 Primerと10 mM dNTP Mix (ともにLife Technologies) を1 : 1で混合した13 μL の溶液を、65 $^{\circ}\text{C}$ で5分間熱処理してRNAのステム構造を破壊した後に氷上で1分間急冷反応させた後、プライマーを60 $^{\circ}\text{C}$ でアニールした。さらに、4 μL の5 \times First Standard Buffer, 各1 μL の0.1 M dithiothreitol, SuperScript III Reverse Transcriptase (すべてLife Technologies), および RNase-free Water (Qiagen) を追加することで最終量を20 μL の溶液とし、50 $^{\circ}\text{C}$ で1時間の逆転写反応を行ってcDNAを合成した。その後、70 $^{\circ}\text{C}$, 15分間の熱処理によって逆転写酵素を不活化した。

合成したcDNA中の増殖因子のcDNAについて、RT² ProfilerTM PCR Array Human Growth Factors (84遺伝子, Qiagen ; 表1) を用いて、網羅的解析を行った。合成したcDNAの溶液を添付文書に従って調製し、95 $^{\circ}\text{C}$ で15秒の熱変性を行うステップと、60 $^{\circ}\text{C}$ で60秒のアニーリングと伸長反応を同時に行うステップを含む2段階ステップを40サイクル行うことでcDNAを増幅した。この反応は7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて行い、その際にPCR産物が発する蛍光量は、サイバーグリーン法を用いてSDS v1.X with RQ Software (Life Technologies) にて測定した。なお、各遺伝子のcDNA量はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のmRNA量を内部対照とした相対発現量として示した。RT² Profiler PCR Array Data Analysis Web

Portal-version 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) にて解析

を行い、精度が高いと判断された遺伝子の相対発現量を示した。(表2)

PCR Arrayを用いた解析にてIL-6刺激によって5倍以上の遺伝子発現が促進され、且つその遺伝子発現が(+)-terreinによって抑制されている遺伝子の発現について、リアルタイムPCR法にて追試した。リアルタイムPCR法は、上記のcDNA合成後の反応液を10倍希釈した溶液を、後述のように合成したセンスならびにアンチセンスPCRプライマー (10 μ M), 2 \times Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), およびRNase-free Waterと混合し、95 $^{\circ}$ Cで15秒の熱変性を行うステップと、60 $^{\circ}$ Cで60秒のアニーリングと伸長反応を同時に行うステップを含む2段階ステップを40サイクル行った。この反応は7300 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を用いて行い、その際にPCR産物が発する蛍光量をSDS v1.X with RQ Software (Life Technologies) にて測定した。なお、mRNA発現量はGAPDHのmRNA量を内部対照として検量線法にて定量し、相対発現量として示した。各因子のPCRプライマーはPrimer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて合成し、NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて目的遺伝子に理論上特異的であることを確認した。(表3)

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12-well plateに 5.0×10^4 /cm²の密度で播種し、前述の記載（材料と方法2項）と同様に培養後、(+)-terrein（10 μM）で30分前処理した後に、rIL-6/rsIL-6R（各々50 ng/mL）を添加した。そして添加24時間後の培養上清を回収し、-80 °C下で保存した。mRNAの発現に差がみられたVEGFとコロニー刺激因子（colony stimulating factor 1 : CSF1）の産生については、固相酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA法）にて検討した。ELISA法はhuman VEGF kitとCSF1 ELISA kit（ともにR&D systems）を用いて行った。

5. (+)-terreinがIL-6細胞内刺激伝達系に及ぼす影響の検討

HGFsにおいて、(+)-terreinがIL-6細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響について、ウエスタンブロット法にて検討した²⁴⁾。HGFsを35-mm dishに 5.0×10^4 /cm²播種し、前述の記載（材料と方法2項）と同様に培養後、(+)-terrein（10 μM）で30分前処理した後に、rIL-6/rsIL-6R（各々50 ng/mL）を添加した。そして、添加1分または5分後に、氷冷したcell lysis buffer {50 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸バッファー (Tris-HCl, pH7.2), 1% ノニデットP-40, 5 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1% ドデシ

ル硫酸ナトリウム (SDS) , プロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma) } にて10分間細胞を溶解し, 4 °Cで10分間, 12,000×gにて遠心分離を行い, その上清をタンパク質として回収した。タンパク質濃度はウシ血清アルブミンを対照に, Bradford法²⁵⁾にて測定した。細胞溶解物 {タンパク質30 µg ; リン酸化Akt (phospho-Akt), リン酸化チロシンホスタファーゼSHP2 (phospho-SHP2), タンパク質50 µg ; リン酸化JAK1 (phospho-JAK1)} にSDSサンプルバッファー {1 % (w/v) SDS, 45 mM Tris-HCl (pH6.8), 15 % (v/v) グリセリン, 144 mM 2-メルカプトエタノール, 0.002 % ブロモフェノールブルー} を加え, 95 °Cで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泳動用緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 35 mM SDS) を用いたポリアクリルアミドゲル {アクリルアミド濃度12 % (v/v) ; phospho-Akt, phospho-SHP2, 7.5 % (v/v) ; phospho-JAK1} 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 (PDVF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ転写した (4 °C, 100 V定電圧条件)。転写後のPDVF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, 室温にて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 °Cで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PDVF膜を浸漬し, 4 °Cで1時間振とうさせた。一次抗体としてラビット由来抗ヒトphospho-AktポリクローナルIgG抗体 (1 : 1,000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), ラビット由来抗ヒトphospho-SHP2ポリクローナルIgG抗体 (1 : 1,000, Cell Signaling Technology), ラビット由来抗ヒトphospho-JAK1ポリクローナルIgG抗体 (1 : 500, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) を用い, 二次抗体として, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビットIgG抗体 (1 : 2,000, GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, United Kingdom) を用いた。反応タンパク質の検出は, 高感度ケミルミネッセンス法 (enhanced chemiluminescence : ECL法, SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate : Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。使用したPDVF膜は抗体除去バッファー (Restore[™] Western Blot Stripping Buffer : Thermo Fisher Scientific) 中で室温にて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と同様の操作を行い, マウス由来抗ヒト β -actinポリクローナルIgG抗体 (1 : 10,000, Sigma) を用いて検出を行うことで, ゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認した。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無添加で且つ(+)-terrein未処理の0分時の黒化度を基準とした相対黒化度とした。

6. 統計解析

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はSheffe's testを用いて行った。各々の統計処理には、StatPlus (version 6.0, LEMON, Walnut, CA, USA) ソフトウェアを用いて検定を行い、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（表2，図1）

HGFsにおいてrIL-6は種々の成長因子のmRNA発現を誘導する傾向がみられた。そして、(+)-terreinはrIL-6によって誘導された成長因子のmRNA発現を抑制する傾向がみられた。（表2）

今回、材料と方法3項に示した基準（5倍以上の遺伝子発現が促進され、且つその遺伝子発現が(+)-terreinによって抑制されている）に則り、PCR arrayの候補成長因子のうち、VEGF-A，脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF），Dickkopf-related protein 1（DKK1），骨形成タンパク質1（bone morphogenetic protein 1：BMP1），小胞体アミノペプチダーゼ1（endoplasmic reticulum aminopeptidase 1：ERAP1），コロニー刺激因子1（colony stimulating factor 1：CSF1）の6因子を抽出した。PCR arrayの結果を検証するため、これら6因子の遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて追試した。上記6因子のうち、VEGF-AおよびCSF1の遺伝子発現は、rIL-6/rsIL-6R添加によって有意に増加し、(+)-terreinの添加によってそれらは有意に抑制された（図1：p<0.05）。VEGF-AおよびCSF1とも、約50%発現が抑制されていた。

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

rIL-6誘導性VEGF-AおよびCSF1のタンパク質産生に(+)-terreinが及ぼす影響についてELISA法を用いて検討を行った結果、それらの産生量はrIL-6/rsIL-6R添加によって有意に増加した。そして、(+)-terreinの添加によってそれらは有意に抑制された (図 2 : $p<0.05$)。VEGFは約50 % , CSF1は約66 %抑制していた。

3. (+)-terreinが影響したIL-6細胞内シグナル伝達系 (図3, 4, 5)

HGFsにおいて、(+)-terreinがrIL-6細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響について、ウエスタンブロット法を用いて検討を行ったところ、(+)-terreinはrIL-6誘導性のAkt (図 3 : $p<0.05$) , SHP2 (図4 : $p<0.05$) , JAK1 (図5 : $p<0.05$) のリン酸化を抑制した。Akt, SHP2は約50 % , JAK1は約60 %抑制していた。

考察

本研究では、抗IL-6作用によって抗炎症効果を有する可能性がある(+)-terreinの作用機序の解明を図った。具体的には、(+)-terreinがHGFsにおいてIL-6誘導性分子の発現に及ぼす影響と、IL-6細胞内シグナル伝達系における標的分子の解明を図った。これらを解明することで、IL-6が関連する炎症性疾患における(+)-terreinの作用効果と機序をより鮮明に導き出すことを試みた。本研究で得られた結果は次の2点である。HGFsにおいて、(+)-terreinはIL-6誘導性VEGFとCSF1の産生を抑制した。また、(+)-terreinはIL-6細胞内シグナル伝達系のうちJAK1, SHP2, そしてAktのリン酸化を抑制した。

本研究で、(+)-terreinはHGFsにおいてIL-6誘導性VEGFとCSF1の産生を抑制した。まず、(+)-terreinが影響を与えるIL-6関連分子をPCR Arrayを用いて網羅的に解析し、VEGF, DKK1, BDNF, BMP1, ERAP1, CSF1の6因子を候補分子として抽出した。さらにリアルタイムPCR法にて検討したところ、DKK1, BDNF, BMP1, ERAP1については再現性が得られなかったが、VEGFとCSF1については再現性が得られた。また、VEGFとCSF1についてはELISA法による追試でも同様の傾向を得られた。さらに、HGFsにおいて(+)-terreinがIL-6誘導性VEGFの産生を抑制することは既に報告されている知見で

ある。したがって、一連の研究から得られた、(+)-terreinがIL-6誘導性CSF1の産生を抑制する、という知見は信頼に足るものであると考える。

CSF1はマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor : M-CSF) としても知られ、様々な生理作用を有する。骨髄中の造血幹細胞に作用してマクロファージへの分化を促進する役割や^{26, 27)}、骨髄由来の単球、マクロファージ系前駆細胞に作用して破骨細胞への分化を促進する役割を有する²⁸⁾。このように、CSF1はIL-6とともに、慢性歯周炎や関節リウマチなどの骨破壊を主病態とする慢性炎症性疾患の進展や持続に深く関連している^{29, 30)}。本研究で、真菌代謝産物である(+)-terreinはHGFsにおけるIL-6誘導性VEGF産生抑制に加えてCSF1の産生も抑制するという知見が得られた。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と考える。

IL-6刺激下でHGFsから産生されるVEGFは、細胞内シグナル伝達系の主要経路Ras/MAPKの一つである、p44/42 MAPK-CCAATエンハンサー結合蛋白(CCAAT/Enhancer Binding Protein : C/EBP) 経路およびc-Jun N末端キナーゼ (c-Jun N-terminal kinase : JNK) -アクチベータータンパク質1 (activator protein 1 : AP1) 経路によって誘導されることが知られている²⁴⁾。また、CSF1はIL-6刺激下において、

JAK-STATに主に誘導されることが知られていたが、近年ではp44/42 MAPKによる誘導がJAK-STATよりも約4倍高いという報告もされている³¹⁾。今回、(+)-terreinによって抑制されたIL-6誘導性VEGFとCSF1はともにp44/42 MAPKによって誘導されると考えられるため、同様にp44/42 MAPKに誘導される分子についても、同様の機序で抑制効果を発揮する可能性が考えられる。

HGFsの細胞内シグナル伝達系の主要経路にはJAK/STAT, Ras/MAPK, さらにPI3K/Aktが存在するが、(+)-terreinはHGFsにおけるIL-6シグナル伝達系のうち、JAK/STAT経路の末端分子であるSTAT3とRas/MAPKs経路の末端分子であるERK1/2のリン酸化を抑制することが報告されている²²⁾。したがって、本研究ではIL-6細胞内シグナル伝達系における(+)-terreinの標的分子解明のため、細胞内シグナル伝達系の下流に存在する分子から順に検討した。まず、(+)-terreinによる影響が解明できていない、主要経路の一つであるPI3K/Aktの末端分子であるAktの発現を調べたところ、(+)-terreinはIL-6誘導性Aktのリン酸化を抑制した。次にERK1/2とAktの上流に共通して存在するSHP2の発現を調べたところ、(+)-terreinはIL-6誘導性SHP2のリン酸化も抑制した。さらに、主要な細胞内シグナル伝達系の最上流に共通して存在するJAK1の発現を調べたところ、(+)-terreinはIL-6誘導性JAK1のリン酸化も抑制した。したがって

(+)-terreinは、細胞内シグナル伝達系の最上流に存在するJAK1のリン酸化を抑制することで、抗IL-6効果を発揮する可能性が示唆された（図6）。

IL-6をはじめとする種々のサイトカインは細胞表面に発現している受容体に結合し、受容体に恒常的に結合しているJAKファミリーをリン酸化することによって、種々の生理的作用を伝達する³²⁾。JAKファミリーはJAK1, JAK2, JAK3, そしてチロシンキナーゼ2 (Tyrosine Kinase 2 : Tyk2) から構成されており、IL-2, IL-4, インターフェロン (Interferon : IFN) - α , IFN- β , 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α), さらに白血病阻止因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) ³³⁾など、その生理的作用の媒介は多岐に渡る。一方、JAKの遺伝子変異や過剰な機能亢進は、関節リウマチ³⁴⁾やアトピー性皮膚炎³⁵⁾などの自己免疫疾患や血液癌³⁶⁾などの悪性腫瘍の発症に関与していることが報告されている。例として、JAK1の欠損は神経細胞の分化異常³⁷⁾を、JAK2の病的活性化は造血前駆細胞の悪性形質転換³⁸⁾を起こすなど、多くの報告がされている。これらの疾患は従来の抗サイトカイン療法などでの効果が得られないことも多く、それら難治性疾患に対して近年JAK阻害剤の開発が進められており、日常臨床への応用も始まっている³⁹⁾。

JAK阻害剤は低分子化合物であるため経口投与可能であること、半減期が短く投与

しやすいこと、生物学的製剤と比較すると製造コストが低いなどの特徴が重要視される。一方、JAKはヒトの生体内に500以上存在するといわれるキナーゼの一つであるが、キナーゼの多くはその活性に重要なキナーゼドメインが類似した構造を有するため、JAK阻害剤は特異性が低く細胞毒性が高いと推測されていた⁴⁰⁾。JAKファミリーの中でもJAK3はリンパ球など血球系細胞に発現しており、JAK1とJAK2に比較すると局限しているため、JAK3阻害剤が主に研究されている。JAK3阻害剤は結果的にJAK1とJAK2の両者を抑制することも多く⁴⁰⁾、*in vivo*の実験において低濃度での特異的JAK阻害作用や少ない副作用が報告されたため実用化に至り始めた。しかし、その高い特異性や少ない副作用の機序は未だ不明な点が多い⁴⁰⁾。本研究から(+)-terreinがJAK阻害作用を有している可能性が考えられるが、IL-6のシグナル伝達系に関与するJAK1およびJAK2をはじめ、IL-6系に関与が少ない他のJAKファミリーへの影響を今後検討する必要がある。また、*in vivo*にて(+)-terreinの抗炎症効果および重篤な副作用発症の有無などを今後検討する必要がある。今後、JAK阻害剤と同様に広範囲の医療分野に応用できる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、さらに細胞内シグナル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示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御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の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御指導賜り，貴重な御助言と御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，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富川知子助教，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野の中山真彰助教，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

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)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- 第141回日本歯科保存学会秋期学術大会（2014年10月，山形）
- 第59回日本歯周病学会春期学術大会（2016年5月，鹿児島）

参考文献

- 1) Williams, R.C. : Periodontal Disease. *N. Eng. J. Med.*, **322**, 373-382, 1990.
- 2) Kesavalu, L., Chandrasekar, B., and Ebersole, J.L. : In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **17**, 177-180, 2002.
- 3) Kolaczowska, E., and Kuberski, P. : Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 159-175, 2013.
- 4) Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. : The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, **25**, 677-686, 2004.
- 5) Kishimoto, T. : The biology of interleukin-6. *Blood*, **74**, 1-10, 1989.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kishimoto, T. : Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells*, **12**, 37-44, 1994.

- 9) Murray, P.J. : The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.*, **178**, 2623-2629, 2007.
- 10) Fahmi, A., Smart, N., Punna, A., Jabr, R., Marber, M., and Heads, R. : p42/p44-MAPK and PI3K are sufficient for IL-6 family cytokines/gp130 to signal to hypertrophy and survival in cardiomyocytes in the absence of JAK/STAT activation. *Cell Signal.*, **25**, 898-909, 2013.
- 11) Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. : Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, **374**, 1-20, 2003.
- 12) Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Hashimoto, J., Azuma, J., and Kishimoto, T. : Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti interleukin-6 receptor antibody: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, **50**, 1761-1769, 2004.
- 13) Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., Matsumoto, T., Yamamura, T., Azuma, J., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Shimoyama, T., and Kishimoto, T. : A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology*, **126**, 986-996, 2004.
- 14) Campbell, I.L., Hobbs, M.V., Dockter, J., Oldstone, M.B., and Allison, J. : Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, **145**, 157-166, 1994.
- 15) Qureshi, I., Begum, T., and Noorani, R. : Isolation and identification of the metabolic

- products of *Aspergillus pulvinus* Kwon and Fennel. Comparative studies of production of terrein and ergosterol in different media. *J. Sci. Industr. Res.*, **19**, 120-122, 1976.
- 16) Arakawa, M., Someno, T., Kawada, M., and Ikeda, D. : A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **61**, 442-448, 2008.
 - 17) Park, S.H., Kim, D.S., Kim, W.G., Ryoo, I.J., Lee, D.H., Huh, C.H., Youn, S.W., Yoo, I.D., and Park, K.C. : Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 2878-2885, 2004.
 - 18) Kamata, S., Sakai, H., and Hirota, A. : Isolation of acetylaranotin, bisdethiodi(methylthio)-acetylaranotin and terrein as plant growth inhibitors from a strain of *Aspergillus terreus*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2637-2638, 1983.
 - 19) Lee, J.C., Yu, M.K., Lee, R., Lee, Y.H., Jeon, J.G., Lee, M.H., Jhee, E.C., Yoo, I.D., and Yi, H.K. : Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J. Endod.*, **34**, 433-437, 2008.
 - 20) Raistrick, H., and Smtih, G. : Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.*, **29**, 606-611, 1935.
 - 21) Altenbach, H-J., and Holzapfel, W. : Synthesis of (+)-terrein from L-tartaric acid. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **29**, 67-68, 1990.
 - 22) Mandai, H., Omori, K., Yamamoto, D., Tsumura, T., Murota, K., Yamamoto, S., Mitsudo, K., Ibaragi, S., Sasaki, A., Maeda, H., Takashiba, S., and Suga, S. : Synthetic

- (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor induced-secretion of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 5338-5344, 2014.
- 23) Johnson, R.B., Serio, F.G., and Dai, X. : Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J. Periodontol.*, **70**, 848-852, 1999.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) Stanley, E.R. : Action of the colony-stimulating factor, CSF-1. *Ciba. Found Symp.*, **118**, 29-41, 1986.
- 27) Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., Palucka, and A.K. : IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.*, **1**, 510-514, 2000.
- 28) Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Yamasaki, A. : Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J. Exp. Med.*, **173**, 1291-1294, 1991.

- 29) Mitrasinovic, O.M., Perez, G.V., Zhao, F., Lee, Y.L., Poon, C., Murphy, and G.M, Jr. : Overexpression of macrophage colony-stimulating factor receptor on microglial cells induces an inflammatory response. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30142-30149, 2001.
- 30) Lenda, D.M., Kikawada, E., Stanley, E.R., and Kelley, V.R. : Reduced macrophage recruitment, proliferation, and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation. *J. Immunol.*, **170**, 3254-3262, 2003.
- 31) Jenkins, B, J., Grail, D., Inglese, M., Quilici, C., Bozinovsli, S., Wong, P., and Emst, M. : Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 1453-1463, 2004.
- 32) Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V.E, 3rd., Silvennoinen, O., and O'Shea, J.J. : The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.*, **5**, 253, 2004.
- 33) Onishi, K., and Zandstra P.W. : LIF signaling in stem cells and development. *Development*, **142**, 2230-2236, 2015.
- 34) Walker, J.G., and Smith, M.D. : The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. *J. Reumatol.*, **32**, 1650-1653, 2005.
- 35) Yasuda, T., Fukada, T., Nishida, K., Nakayama, M., Matsuda, M., Miura, I., Dainichi, T., Fukuda, S., Kabashima, K., Nakaoka, S., Bin, B.H., Kubo, M., Ohno, H., Hasegawa, T., Ohara, O., Koseki, H., Wakana, S., and Yoshida, H. : Hyperactivation of JAK1 tyrosine kinase induces stepwise, progressive pruritic dermatitis. *J. Clin. Invest.*, **126**,

2064-2076, 2016.

- 36) Morgan, K.J., and Gilliland, D.G. : A role for JAK2 mutations in myeloproliferative diseases. *Annu. Rev. Med.*, **59**, 213-222, 2008.
- 37) Taga, T., and Fukuda, S. : Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **28**, 249-256, 2005.
- 38) Levine, R.L., Wadleigh, M., Coombs, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Frhling, S., Dhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., and Gilliland, D.G. : Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, **7**, 387-397, 2005.
- 39) O'Shea, J.J., and Plenge, R. : JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*, **36**, 542-550, 2012.
- 40) Yamaoka, K., and Tanaka, Y. : Jak inhibitor; possibility and mechanism as a new disease modifying anti-rheumatic drug. *J. Clin. Immunol.*, **32**, 85-91, 2009.

図の説明

図1. IL-6関連遺伝子発現に(+)-terreinが及ぼす影響

PCR Arrayの結果にてrIL-6刺激により5倍以上の遺伝子発現が促進され、且つその遺伝子発現が (+) -terreinによって抑制されている遺伝子については、リアルタイムPCR法にてさらに検討した。mRNA発現量はGAPDHのmRNA量を内部対照として検量線法にて定量し、相対発現量として示した。

A : VEGF-Aの相対発現量

B : CSF1の相対発現量

C : DKK1の相対発現量,

D : BDNFの相対発現量

E : BMP1の相対発現量

F : ERAP1の相対発現量

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。それぞれの相対発現量の違いは、ANOVA/Sheffe's testを用いて検定した。 * , $p < 0.05$

図2. IL-6関連タンパク質産生に(+)-terreinが及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に, rIL-6/rsIL-6R (各50 ng/mL) を添加し, 24時間培養後に回収した培養上清中のVEGF-AおよびCSF1量をELISA法にて定量した。

A : VEGF-Aの産生量

B : CSF1の産生量

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。それぞれの産生量の違いは, ANOVA/Sheffe's testを用いて検定した。 * , $p < 0.05$

図3. (+)-terreinがIL-6誘導性Aktのリン酸化に及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に, rIL-6/rsIL-6R (各50 ng/mL) を添加し, 5分培養後に回収したタンパク質中のphospho-Aktの産生量をウエスタンブロット法にて調べた。

A : phospho-Aktのウエスタンブロット像 (一人のドナーから得たHGFsを用いた実験結果の代表例 ; β -actinのウエスタンブロット像はゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認したものである)

B : 相対黒化度で示したphospho-Akt産生量

検出されたバンドの強度は、解析ソフトImage Jを用いて黒化度を数値化し、rIL-6/rsIL-6R無添加且つ(+)-terrein未処理0分を1.0とした比率で相対黒化度を算出した。

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。それぞれの産生量の違いは、ANOVA/Sheffe's testを用いて検定した。 * , p<0.05

図4. (+)-terreinがIL-6誘導性SHP2のリン酸化に及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に、rIL-6/rsIL-6R (各50 ng/mL) を添加し、5分培養後に回収したタンパク質中のphospho-SHP2の産生量をウエスタンブロット法にて調べた。

A : phospho-SHP2のウエスタンブロット像 (一人のドナーから得たHGFsを用いた実験結果の代表例 ; β -actinのウエスタンブロット像はゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認したものである)

B : 相対黒化度で示したphospho-SHP2産生量

検出されたバンドの強度は、解析ソフトImage Jを用いて黒化度を数値化し、rIL-6/rsIL-6R無添加且つ(+)-terrein未処理0分を1.0とした比率で相対黒化度を算出した。

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。それぞれの産生量の違いは、ANOVA/Sheffe's testを用いて検定した。 * , $p < 0.05$

図5. (+)-terreinがIL-6誘導性JAK1のリン酸化に及ぼす影響

HGFs (5.0×10^4 cells/cm²) を(+)-terrein (10 μ M) で30分前処理した後に、rIL-6/rsIL-6R (各50 ng/mL) を添加し、1分培養後に回収したタンパク質中のphospho-JAK1の産生量をウエスタンブロット法にて調べた。

A : phospho-JAK1のウエスタンブロット像 (一人のドナーから得たHGFsを用いた実験結果の代表例 ; β -actinのウエスタンブロット像はゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認したものである)

B : 相対黒化度で示したphospho-JAK1産生量

検出されたバンドの強度は、解析ソフトImage Jを用いて黒化度を数値化し、rIL-6/rsIL-6R無添加且つ(+)-terrein未処理0分を1.0とした比率で相対黒化度を算出した。

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。それぞれの産生量の違いは、ANOVA/Sheffe's testを用いて検定した。 * , $p < 0.05$

図6. HGFsにおけるIL-6刺激伝達経路と, (+)-terreinの標的分子

VEGFおよびCSF1はRas/MAPKによって誘導されるタンパク質である。 (+)-terreinはHGFsにおいてIL-6細胞内シグナル伝達系の最上流に位置するJAK1のリン酸化を抑制することで, IL-6誘導性VEGFおよびCSF1の産生を抑制し, 抗IL-6作用を発揮する可能性が示唆された。