

氏名	小林 寛也	
学位	博士	
専門分野の名称	歯学	
学位授与番号	博甲第4520号	
学位授与の日付	平成24年3月23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(文部省令)第4条第1項該当)	
学位論文題目	活性型 Matrix metalloproteinase-3 がヒト単球系細胞株 THP-1 における可溶性インターロイキン-6 受容体の産生に及ぼす影響に関する研究	
学位論文審査委員	教授 滝川 正春	教授 高柴 正悟
	准教授 辻極 秀次	

学位論文内容の要旨

【緒言】

インターロイキン6 (IL-6) は様々な細胞に作用して、歯周病の病態形成に関与する炎症性サイトカインである。IL-6 の細胞内シグナル伝達には、標的細胞膜上に存在する IL-6 受容体 (IL-6R) と結合した後、そのシグナル伝達分子 gp130 が活性化する経路 (IL-6 classical-signaling) と、細胞外領域において可溶性 IL-6R (sIL-6R) と IL-6 が二量体を形成した後細胞膜上の gp130 と結合して活性化する経路 (IL-6 trans-signaling) が知られている。sIL-6R は IL-6 シグナルのアゴニスト作用を有することから、IL-6 によって惹起される様々な炎症反応を増強する。

sIL-6R は細胞膜上に発現する IL-6R の細胞外ドメインが切断酵素によって細胞膜付近で切断されるシェディング、または転写過程における選択的スプライシングによって産生される。近年、内因性の matrix metalloproteinase (MMP) 阻害因子の一つである Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) -3 が sIL-6R の産生を抑制し、また、プロテアーゼの一種である A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 17 が IL-6R のシェディングに関与していると報告されているが、詳細なメカニズムは不明である。

歯周組織の主要細胞であるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) において IL-1 β や腫瘍壊死因子 (TNF- α) などのサイトカインは、MMP-3 の産生を亢進することが報告されている。MMP-3 はタンパク質分解酵素の一種であり、コラーゲン分解や他の MMPs を活性化することが知られている。その一方で、Fas リガンドや N-メチル D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体をシェディングすることを示唆する報告もある。

そこで本研究では、炎症期における歯周組織において産生が亢進している MMP-3 が IL-6 のアゴニストとして作用する sIL-6R の産生を誘導し、歯周炎症の悪化に関与するという仮説を立て、MMP-3 が sIL-6R の産生性に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

1. 細胞および培養: ヒト単球系細胞株 THP-1 はウシ胎児血清を 10% の割合に含む RPMI1640 (Invitrogen) を用いて、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 存在下で培養した。マクロファージ様細胞への分化は、最終濃度が 10 nM になるように phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) で細胞を刺激し、24 時間後の付着細胞を実験に供した。また、HGF はウシ胎児血清を 10% の割合に含む DMEM 培地 (Invitrogen) を用いて、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 存在下で培養した。

2. 試薬: MMP-3 Inhibitor II, TNF- α Proteinase Inhibitor-1 (TAPI-1) およびリコンビナントヒト MMP-3 Catalytic Domain (rhMMP-3) は Calbiochem から購入した。rhIL-6, rhsIL-6R および rhTNF- α は R&D Systems から購入した。マウス由来抗ヒト IL-6R モノクローナル抗体およびマウス由来 IgG1 κ アイソタイプコントロールモノクローナル抗体は BD Biosciences から購入した。
3. MMP-3 産生の定量: HGF に rhIL-6/rhsIL-6R (各 50 ng/ml) または rhTNF- α (10 ng/ml) を添加した際の培養上清中の MMP-3 量は市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。
4. 細胞増殖活性の検討: THP-1 に MMP-3 Inhibitor II, TAPI-1 および rhMMP-3 を添加した際の細胞増殖活性は, MTT 法を用いて検討した。
5. MMP-3, ADAM17 の mRNA 発現の検出: MMP-3 Inhibitor II (100 nM), TAPI-1 (10 μ M) を添加した THP-1 から標的遺伝子を抽出し, 遺伝子の増幅産物を作製した。mRNA 発現は, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検出した。
6. IL-6R および sIL-6R の mRNA 発現の定量: MMP-3 Inhibitor II (100 nM), TAPI-1 (10 μ M) および rhMMP-3 (0-500 ng/ml) を添加した THP-1 から標的遺伝子を抽出し, 遺伝子の増幅産物を作製した。mRNA 発現は, Real-time RT-PCR 法を用いて定量した。
7. sIL-6R 産生の定量: THP-1 に MMP-3 Inhibitor II (100 nM), TAPI-1 (10 μ M) および rhMMP-3 (0-500 ng/ml) を添加した際の培養上清中の sIL-6R 量は, 市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。
8. IL-6R 発現の検出: THP-1 に MMP-3 Inhibitor II (100 nM), TAPI-1 (10 μ M) および rhMMP-3 (500 ng/ml) を添加した際の IL-6R 発現は, フローサイトメトリー法を用いて検出した。
9. 統計処理: 各実験系における有意差は, 対応のない群間の Student's *t*-test を用いて検定した。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】

HGF において, 以下の 1 点を示した。

1. rhIL-6 / rhsIL-6R は有意に MMP-3 の産生を亢進した

マクロファージ様に分化させた THP-1 において, 以下の 4 点を示した。

1. MMP-3 および ADAM17 の mRNA は恒常的に発現しており, MMP-3 Inhibitor II および TAPI-1 はその mRNA 発現に影響を及ぼさなかった
2. MMP-3 Inhibitor II, TAPI-1 および rhMMP-3 は IL-6R および sIL-6R の mRNA 発現に影響を及ぼさなかった
3. MMP-3 Inhibitor II は sIL-6R の産生に影響を及ぼさなかったが, rhMMP-3 は有意に sIL-6R の産生を亢進した
4. MMP-3 Inhibitor II は IL-6R 発現量に変化を及ぼさなかったが, rhMMP-3 は IL-6R 発現を減少した

【考察と結論】

マクロファージ様 THP-1 細胞において, 活性型 MMP-3 が細胞膜上の IL-6R をシェディングし, sIL-6R の産生を亢進する可能性が示唆された。すなわち, 活性化された MMP-3 は細胞外基質の分解のみならず, 炎症組織に集積した免疫担当細胞に外因性の切断酵素として作用することによって sIL-6R の産生を亢進し, 歯周炎症の悪化に関与する可能性が考えられる。

学位論文審査結果の要旨

歯周病は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炎症性疾患である。歯周病に罹患した組織では、様々な炎症性サイトカインが産生されており、相互にネットワークを形成している。炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-6 (IL-6) は、標的細胞膜上に存在する IL-6 受容体 (IL-6R), あるいは、細胞外領域において可溶性 IL-6R (sIL-6R) と結合することで、細胞内にシグナルを伝達する。

sIL-6R は IL-6 のアゴニストとして作用し、蛋白質切断酵素によるシェディング、または、選択的スプライシングによって産生されることが報告されているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い。

また、歯周組織を構築する主な細胞であるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) は、IL-1 β などのサイトカインに応答して matrix metalloproteinase (MMP) -3 の産生を亢進することが知られている。MMP-3 は細胞外マトリックスの分解に関与しているが、細胞膜上に発現する蛋白質のシェディングにも関与しているという報告がある。

本研究では、炎症期における歯周組織において産生が亢進している MMP-3 が IL-6 のアゴニストとして作用する sIL-6R の産生を誘導し、歯周炎の悪化に関与するとの仮説を立てて研究を行った。

研究結果は、以下の内容であった。

HGFにおいて、

- 1) IL-6/sIL-6Rは、無添加時と比較してMMP-3の産生を亢進させた ($p<0.05$)。

マクロファージ様細胞に分化誘導したTHP-1において、

- 1) MMP-3阻害剤および活性型MMP-3は、IL-6RおよびsIL-6RのmRNA発現に影響を及ぼさなかった。
- 2) 活性型MMP-3は、無添加群と比較してsIL-6Rの産生を亢進させた ($p<0.05$)。
- 3) 活性型MMP-3は、無添加群と比較して細胞膜上のIL-6Rの発現を減少させた。

以上のことから、活性型 MMP-3 は、マクロファージ様細胞に分化した THP-1 において、細胞膜上の IL-6R をシェディングすることで sIL-6R の産生を亢進する可能性が示唆された。また、産生が亢進した sIL-6R が IL-6 と複合体を形成し、HGF に作用すると再び MMP-3 の産生を増強し、その結果、集積したマクロファージやリンパ球に対して MMP-3 がパラクリン作用を示し、さらなる sIL-6R 産生亢進に繋がるという慢性炎症の遷延化にいたるカスケード機構が示唆される。これらの新たな成果は、慢性炎症の遷延化の病態の理解に寄与している。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文が博士 (歯学) の学位論文として価値があるものと認めた。