

高田充歯科基礎医学奨励賞受賞講演

顎下腺における炎症性サイトカイン IL- β のプロセッシング*

姚 陳娟**

キーワード: IL- β , kallikrein, processing

Processing of IL-1 β by Tissue Kallikrein mK13 in the Mouse Submandibular Gland

Chenjuan YAO

Abstract : We have shown earlier that the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA is increased in the submandibular gland (SMG) after injection of lipopolysaccharide (LPS). In this present study we suggest that tissue kallikrein mK13 is a candidate of the processing enzyme for the precursor of IL-1 β (pro-IL-1 β) in the SMG. High levels of 17.5- and 20-kDa IL-1 β proteins were detected by Western blotting in the SMG, and saliva from LPS-injected mice. Despite this fact, pro-IL-1 β with a molecular size of 35-kDa was not detected in this tissue. The protein for IL-1 β -converting enzyme (ICE) was expressed only at a low level in the SMG as compared with its level in various epithelial tissues or LPS-stimulated macrophages. We detected the strong expression of members of kallikrein family (mK1, mK9, mK13, and mK22) in the SMG but not other tissues. By incubation with mK13, but not with mK1, mK9, nor mK22, the 35-kDa pro-IL-1 β was cleaved to give two major products with molecular masses of 17.5- and 22- kDa, which production was inhibited by PMSF, a serine protease inhibitor, but not by ICE inhibitors. The pro-IL-1 β peptide segment, which includes the putative processing site, was hydrolyzed at Leu¹¹³ and Leu¹¹⁴ by incubation with mK13. The immunohistochemistry and an autonomic therapy experiment showed that IL-1 β and kallikrein mK13 were co-localized in the secretory granules of granular convoluted tubular cells. Our present results thus suggest that kallikrein mK13 is a plausible candidate for the processing enzyme for pro-IL-1 β in the SMG of mice.

はじめに

口腔は生体の防御系における最初の関門である、特に、唾液は消化作用、抗菌作用、免疫力・組織修復力の維持、抗炎症作用、発ガン予防などの作用がある。近年、ショウジョウバエで同定された Toll 受容体, Toll-Like Receptor (TLR), が哺乳動物においても報告されている。この分子はヒトでは現在までに13種類が同定され、それぞれのリガンドが明らかになってきている。哺乳類の TLR は、哺乳類には存在しないが病原体でよく保存された特徴的な構造 (pathogen-associated molecular patterns ; PAMPS) を認識してあらゆる病原体の侵入

を感知する。TLRs は細菌細胞壁成分, flagellin, CpG DNA, peptidoglycan, bacterial lipopeptides, mycoplasmal lipopeptides, ssRNA, dsRNA など PAMPS の認識において、中心的役割を果たすことが知られている。TLR4 はグラム陰性桿菌の細胞膜に存在するエンドトキシン, リポ多糖体 (LPS), の受容体である¹⁻³⁾。本研究室では、LPS が顎下腺において、TLR4 を介して、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α , および IL-6) を誘導することを明らかにした⁴⁾。インターロイキンファミリーは、生体内において炎症・代謝、造血、免疫などの過程において多彩な生理的作用を示すことが知られている。IL-1 β を産生する

*本研究内容は著者学位論文の一部です。J. Biol. Chem. 281 (12): 7968-7976, 2006. に発表した。

**徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野

Department of Molecular Oral Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

細胞として、ケラチノサイト、リンパ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなどが存在する。インターロイキン1 (IL-1) には、 α と β の2種類のポリペプチドが存在する。IL-1 β 蛋白質は、前駆体である pro-IL-1 β としてまず翻訳された後、蛋白質分解酵素 (protease) により限定分解され、17.5-kDaの成熟・活性型 IL-1 β となる⁵⁻⁹⁾。本研究では、顎下腺における pro-IL-1 β のプロセッシングについて述べたい。

結 果

LPS 刺激マクロファージ抽出液中には pro-IL-1 β と考えられる35-kDaと28-kDaのバンドが検出された (fig. 1)。一方、顎下腺及びLPS刺激唾液中には17.5-kDaと20-kDaの分子量を有する大量の成熟型 IL-1 β が検出されたが、その前駆体 (35-kDaと28-kDa pro-IL-1 β) は検出されなかった。なお、この組織において、LPS刺激マクロファージと同様に pro-IL-1 β mRNA が検出された。従って、顎下腺において、pro-IL-1 β が合成され、成熟型にプロセッシングされた可能性が考えられた。

IL-1 β のプロセッシング酵素として、IL-1 β converting enzyme (ICEあるいは caspase-1) はよく知られている^{7, 8)}。Western blot 解析によると、肺、脾臓、肝臓、腎臓、胃及びLPS刺激したマクロファージなどの組織において、本酵素の強い発現が認められたが、顎下腺ではその発現レベルはきわめて低いことが明らかになった (fig. 2)。この結果から、ICEが顎下腺における pro-IL-1 β のプロセッシングに関与している可能性は低いことが示唆された。そこで、顎下腺に発現している他の蛋白質分解酵素についてその発現レベルを種々の組織と比較検討した。

まず、顎下腺ではカリクレインが強く発現していることが知られているので、その family の4種類の酵素 (mK1, mK9, mK13 および mK22) についてそれらの各組織における発現を調べた。顎下腺においてこれら4種のカリクレインは強く発現していたが、肺、脾臓、肝臓、腎臓、胃、及びLPS刺激マクロファージなどの組織においてその発現はほとんど認められなかった (fig. 3)。従って、顎下腺においてはICEの代わりにカリクレインが pro-IL-1 β のプロセッシングに関与している可能性が考えられた。次にこの仮説を証明するため、*in vitro*の実験を行った。

カリクレイン family の4種類の酵素 (mK1, mK9, mK13, および mK22) と pro-IL-1 β を含むLPS刺激マクロファージ抽出液を *in vitro* において incubate すると、mK13が酵素濃度依存的に17.5-kDaの活性型 IL-1 β を産生することが分かった (fig. 4)。mK1とmK22は incubation により、活性型 IL-1 β を与えなかった。また、mK9により産生された断片は17.5-kDaより小さいものであった。

mK13によって pro-IL-1 β は切断され、活性型と同じ分子量を有する17.5-kDa IL-1 β が産生されたが、LPS刺

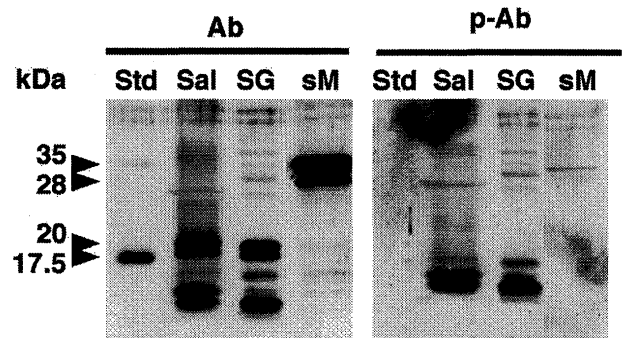


fig. 1 マウス各組織における IL-1 β の発現
マウス顎下腺抽出液およびLPS刺激マクロファージ抽出液、またはLPS刺激した唾液 (それぞれ10 μ g蛋白質) を Western blotting によって解析した。Ab, anti-recombinant マウス IL-1 β 抗体; p-Ab, 抗原吸収した anti-recombinant マウス IL-1 β 抗体。Std, 標準品 (recombinant mouse IL-1 β 5 ng); Sal, LPS刺激したマウス唾液; SG, 顎下腺; sM, LPS刺激マクロファージ抽出液。

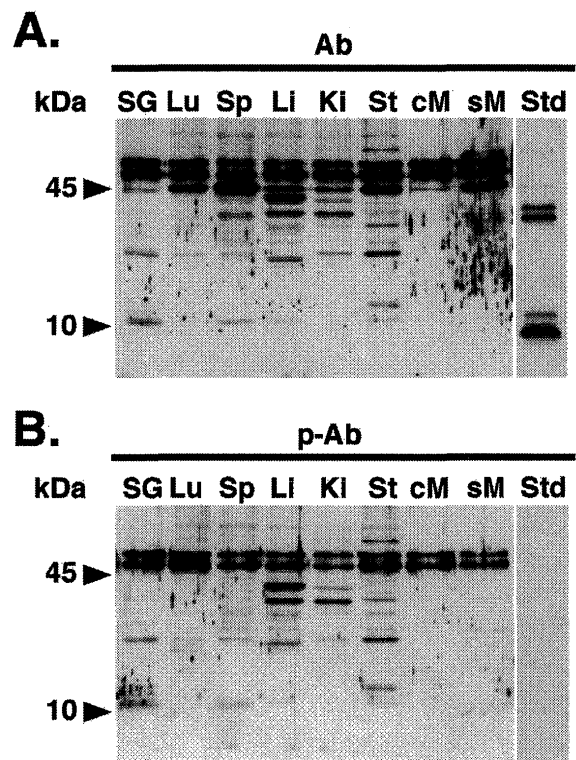


fig. 2 マウス各組織における ICE の発現
マウス各組織抽出液およびLPS刺激マクロファージ抽出液 (それぞれ10 μ g蛋白質) を Western blotting によって解析した。A, polyclonal goat anti-mouse ICE 抗体; B, blocking peptide で吸収した ICE 抗体。SG, 顎下腺; Lu, 肺; Sp, 脾臓; Li, 肝臓; Ki, 腎臓; St, 胃; cM, control macrophage 抽出液; sM, LPS刺激マクロファージ抽出液; Std, 標準品 (活性型 recombinant mouse ICE)。

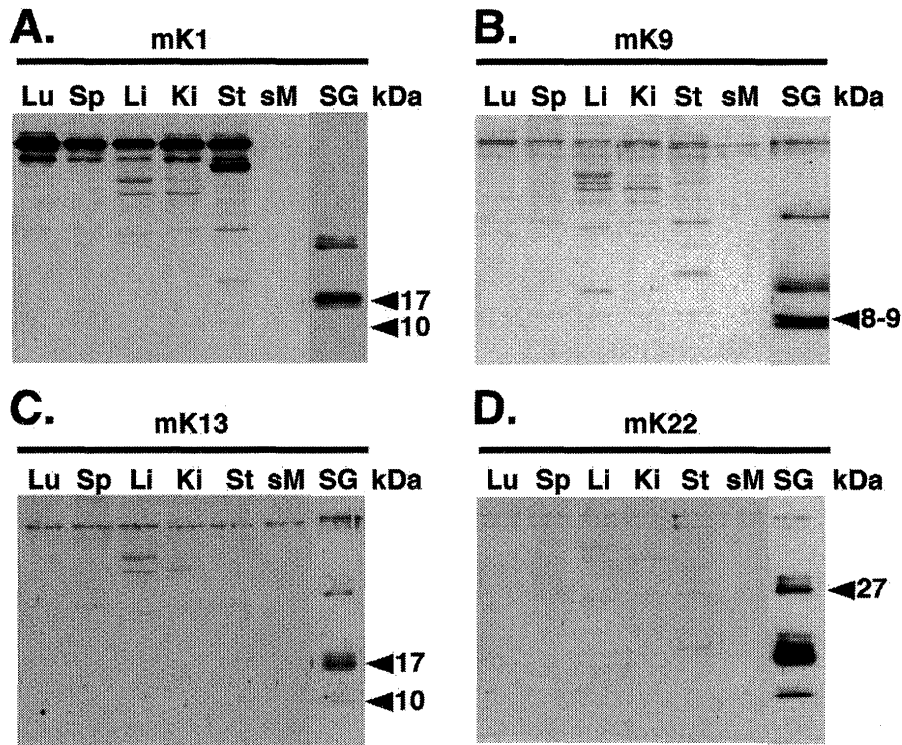


fig. 3 マウス各組織におけるカリクレインの発現
 マウス各組織抽出液および LPS 刺激マクロファージ抽出液を Western blotting によって解析した。A, 抗 mK1 特異抗体; B, 抗 mK9 特異抗体; C, 抗 mK13 特異抗体; D, 抗 mK22 特異抗体。Lu, 肺; Sp, 脾臓; Li, 肝臓; Ki, 腎臓; St, 胃; sM, LPS 刺激マクロファージ抽出液; SG, 顎下腺。用いた Lu, Sp, Li, Ki, St, と sM の蛋白質量は 10 μ g, SG 蛋白質量は 1 μ g。

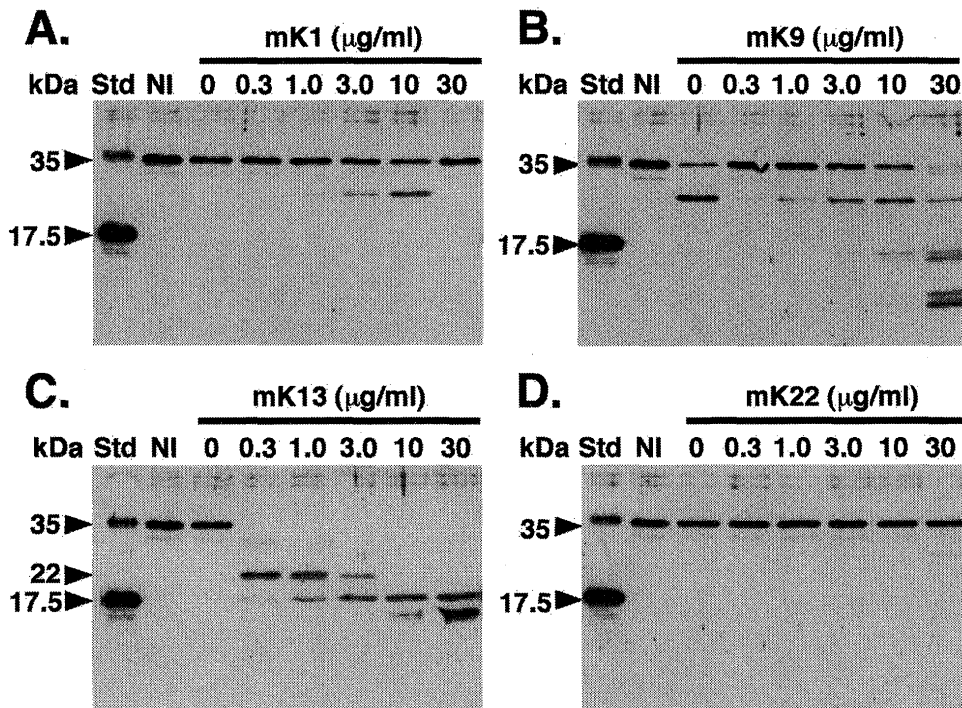


fig. 4 mK1, mK9, mK13, および mK22 による pro-IL-1 β の切断
 mK1, mK9, mK13, および mK22 と LPS 刺激マクロファージ抽出液 (1.5 μ g 蛋白質) を 37 $^{\circ}$ C で一時間反応させた。反応物を Western blotting によって解析した。A, mK1; B, mK9; C, mK13; D, mK22。Std, 標準品 (5 ng recombinant mouse IL-1 β); NI, カリクレイン無添加, 反応なし。

激マクロファージ抽出液中には caspase-1の前駆体が含まれている。mK13 は ICE 前駆体に作用して、これを活性化し、その結果生じた活性化 ICE により、pro-IL-1 β が IL-1 β に変換された可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するため、ICE 阻害剤と mK13 阻害剤を用いて実験を行った (fig. 5)。まず、2種類の ICE 阻害剤の存在下、マクロファージ抽出液と mK13 を incubate した場合、阻害剤を含まないコントロールとほぼ同様に 17.5-kDa IL-1 β が産生された (fig. 5A, lanes 4, 6, 7)。なお、このとき用いた濃度の2種 ICE 阻害剤は ICE による pro-IL-1 β の processing を完全に阻害した (fig. 5B, lanes 4, 6, 7)。また、逆に serine protease 阻害剤存在下では、mK13による pro-IL-1 β の processing は完全に阻害

された (fig. 5A, lanes 4, 5)。以上より、mK13 による 17.5-kDa IL-1 β の産生はこのカリクレインが pro-IL-1 β に直接作用し、切断したことによることが明らかになった。

さらに、我々は processing 酵素切断箇所近傍を含む pro-IL-1 β ペプチドと mK13 を incubate し、反応産物を HPLC により分析した。この実験から mK13 によって、二つのペプチド断片が与えられることが明らかとなった。ペプチド断片の sequence から mK13 による pro-IL-1 β の processing 部位は Leu¹¹³-Leu¹¹⁴の間であると考えられた。

他方、免疫組織化学によりカリクレイン mK13 と IL-1 β の顎下腺における局在を調べた結果、顆粒性導管の分泌顆粒が mK13 抗体とサイトカイン IL-1 β 抗体に陽性反応を示した。なお、抗体を抗原吸収したコントロールでは反応は認められなかった。この結果、mK13 と IL-1 β は共に顆粒性導管細胞の分泌顆粒に局在することが明らかになった。さらに、交感神経 α -アゴニストは顆粒性導管の分泌顆粒内容物を分泌させることが知られている⁹⁾ので、我々は上記免疫組織化学の結果を確認するために、マウスに種々のアゴニストを投与し、顎下腺及び唾液中の IL-1 β 及び mK13 の動態を調べた。交感神経 α -アゴニストにより IL-1 β および mK13 は共に唾液中に大量が分泌され、顎下腺から消失した。この実験からも IL-1 β および mK13 は共に顆粒性導管の分泌顆粒中に局在することが明らかとなった。尚、交感神経 β -アゴニストであるイソプロテレノールおよび副交感神経ムスカリンアゴニストのピロカルピンはいずれも mK13 と IL-1 β を分泌させなかった。

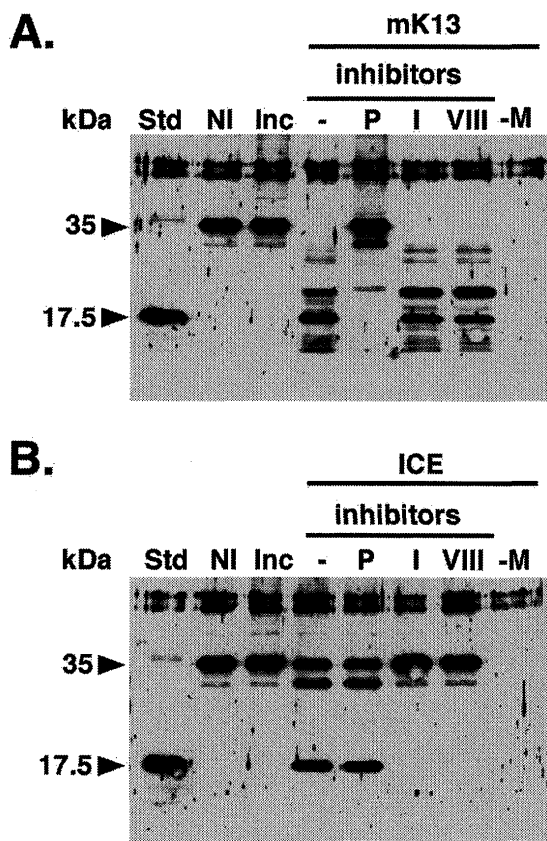


fig. 5 mK13 および ICE による pro-IL-1 β 切断と阻害剤による影響

酵素 (1.5 μ g/ml mK13 または 50 U/ml ICE) を阻害剤と室温で30分反応し、10 μ l LPS 刺激マクロファージ抽出液 (0.5 μ g/ μ l protein) 37 $^{\circ}$ C で3時間反応させた。反応物を Western blotting によって解析した。A, 1.5 μ g/ml mK13 と反応; B, 50 U/ml ICE と反応。Std, 標準品 (5 ng recombinant mouse IL-1 β); NI, 酵素無添加, 反応なし; Inc, 酵素無添加, incubation。-, 酵素添加, 阻害剤無添加; P, 50 μ M PMSF; I, 5 μ M caspase-1 inhibitor I; VIII, 2.5 μ M caspase-1 inhibitor VIII; -M, マクロファージ抽出液なし。

まとめ

有害微生物などの主たる進入路の一つである口腔には確実な防御システムが要求される。本研究などから口腔粘膜などの局所炎症時、遊離するエンドトキシンは TLR4 を介して唾液腺、特に顎下腺に作用し、IL-1 β , TNF- α , および IL-6 等サイトカインを誘導し、唾液中に分泌させると考えられた。分泌されたサイトカインは、口腔粘膜細胞に作用し、defensin など抗菌ペプチドを誘導させると考えられる。これらのことから「口腔-唾液腺経路 (Oral cavity-salivary gland axis)」を経た防御システム、炎症修復機構が存在する可能性が示唆された。今後口腔の健康の維持、疾病予防に本経路が果たす役割をより詳細に究明する予定である。

謝辞

稿を終わるにあたり、御校閲・御教示を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学分野細井教授に深く感謝致します。また、数々の御支援を頂いた口腔分子生理学分野の関係諸先生方、教職員の方々に感謝致します。

参考文献

- 1) Lynn WA and Golenbock DT: Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol Today* 13, 271-276 (1992)
- 2) Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH and Kluk MJ: Lysophospholipids-receptor revelations. *Science* 294, 1875-1878 (2001)
- 3) Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN and Wilson JM: Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* 168, 810-815 (2002)
- 4) Yao C, Li X, Kwartarini M, Kosugi-Tanaka C, Akamatsu T, Kanamori N and Hosoi K: Lipopolysaccharide-induced elevation and secretion of interleukin-1 β in the submandibular gland of male mice. *Immunology* 116, 213-222 (2005)
- 5) Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ and Hopp TP: A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 β . *J Biol Chem* 264, 5323-5326 (1989)
- 6) Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA and Schmidt JA: Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 β convertase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5227-5231 (1989)
- 7) Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van NK, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K and Black RA: Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 256, 97-100 (1992)
- 8) Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJ, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, MacCross M, Mumford RA, Schmidt JA and Tocci MJ: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774 (1992)
- 9) Hosoi K, Aoyama K, Tomomura A and Ueha T: Effect of autonomic agents on the amount of androgen-dependent granules in convoluted tubular cells of the mouse submandibular gland. *Can J Physiol Pharmacol* 56, 634-641 (1978)