

論文の内容の要旨

氏名：齋 木 あかり

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：骨芽細胞において EMMPRIN は bFGF により誘導される IL-6 分泌を抑制する

歯肉、セメント質、歯根膜および歯槽骨という4つの異なる組織で構成される歯周組織は、口腔内で歯を支持している。重層扁平上皮細胞（SSEC）、線維芽細胞、骨芽細胞および破骨細胞はそれぞれの組織において、サイトカインおよびケモカイン分泌を介して機能的に協調している。こうした細胞間のクロストークは、口腔内の恒常性維持のために極めて重要である。

電解酸性機能水（FW）は食塩水を電解することにより生成され、高い殺菌効果があり、臨床領域で広く用いられている。熱傷モデルでは、FW が創傷治癒を促進するという報告があるが、そのメカニズムは完全には解明されていない。このモデルでは線維芽細胞が直接 FW に曝露されており、口腔内に形成された潰瘍において、歯肉線維芽細胞が口腔環境に直接暴露されるという状況に酷似している。こうしたことから、実験的に線維芽細胞への FW の効果を検討することにより、創傷治癒促進の詳細なメカニズムの解明につながる可能性がある。

そこで、本研究では子宮頸がん由来線維芽細胞 HeLa を用いて、FW（pH 2.7、酸化還元電位 1,100 mV 以上、遊離有効塩素濃度 30 ppm；三浦電子）刺激によるサイトカイン分泌の変化を調べた。サイトカインアレイによる解析で、basic fibroblast growth factor（bFGF）および extracellular matrix metalloproteinase inducer（EMMPRIN）の発現増強が認められた。この結果を確認するために、HeLa 細胞を PBS で2回洗浄した後、FW を 1 ml 加え、30 秒間作用後、10%FCS DMEM 1 ml を添加し、刺激を停止した。この溶液を吸引除去した後、新しい培養液に交換し、さらに 1 時間培養した。その培養上清中の bFGF および EMMPRIN の濃度を ELISA kit（R&D systems）を用いて定量した。その結果、bFGF はコントロール（12 pg/ml）と比較して 1 時間後に 180 pg/ml、一方、EMMPRIN はコントロール（0.08 ng/ml）と比較して 1 時間後に 1.8 ng/ml と有意に増加した。

マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 MC3T3-E1 に bFGF を作用させると、interleukin-6（IL-6）および vascular endothelial growth factor（VEGF）の分泌を誘導することが明らかにされている。そこで、FW で刺激した HeLa 細胞の培養上清を用いて、MC3T3-E1 を刺激し、両分子の分泌変化について検討した。ところが、予想に反して、IL-6 および VEGF のどちらの分泌も増強されなかった。この結果は、MC3T3-E1 細胞が bFGF 及び EMMPRIN に対して反応性を失っている可能性があると考えた。そこで、細胞を recombinant human(rh) bFGF(0, 1, 3, 10 nM)または rh EMMPRIN(0, 0.5 µg/ml)の存在下、非存在下で培養したところ、rh bFGF は IL-6 および VEGF の分泌を誘導した。このことは、MC3T3-E1 細胞が少なくとも bFGF に対しては反応性を喪失していないことを示すものであった。そこで次に、bFGF および EMMPRIN のクロストークの可能性について検討した。MC3T3-E1 細胞を rh bFGF 単独および rh EMMPRIN 共存下で培養し、IL-6 の分泌変化について検索した。その結果、rh bFGF による IL-6 の分泌誘導は rh EMMPRIN 存在下では顕著に抑制されることが明らかとなった。この現象の転写レベルでの調節について real-time PCR によって検索したところ、rh bFGF（3 nM）による単独刺激では、IL-6 の mRNA 発現が 6.5 倍に誘導されたのに対し、rh EMMPRIN 共存下では、IL-6 の mRNA 発現が顕著に減少した。そこでさらに、bFGF の下流のシグナル伝達経路について検討するため、MC3T3-E1 細胞を転写因子 NF-κB 特異的阻害剤 L-1-4'-tosylamino-phenylethyl-chloromethyl ketone（TPCK）と mitogen-activated protein kinase（MEK）阻害剤（U0126）で前処理し、IL-6 の分泌に対する効果について検討した。その結果、TPCK は 1 µM で有意に IL-6 の分泌を抑制したのに対して、MEK 阻害剤には IL-6 の分泌抑制効果は認められなかった。

これらの結果に基づき、さらに NF-κB のシグナル伝達における rh EMMPRIN の影響について検討した。細胞を rh bFGF で刺激した際、NF-κB の p65 サブユニットのリン酸化の状態を Western blot 法

で検討した。rh bFGF 刺激は p65 のリン酸化を増強したのに対して、rh EMMPRIN 共存下ではこれを顕著に抑制した。

本研究で、FW 刺激は HeLa 細胞による bFGF および EMMPRIN 分泌を顕著に増強することが明らかになった。bFGF は極めて多様な生物学的効果を有している。本研究、すなわち支持組織の中核をなす線維芽細胞から放出された bFGF が、周囲組織を保護し、さらなる損傷またはアポトーシスから生体を保護する可能性を示唆したことは重要である。一方、EMMPRIN は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、発生過程や病態発生において重要な役割を担っている。FW 誘導 EMMPRIN による MC3T3-E1 細胞における MMPs 誘導の可能性については現在検討中である。

IL-6 は骨代謝にとって重要な因子である。以前の報告では MC3T3-E1 細胞において bFGF により IL-6 が誘導されることが証明されており、このシグナル伝達には、プロテインキナーゼ C とホスホリパーゼ C の活性化が重要であるとされている。本実験では bFGF 誘導 IL-6 分泌は EMMPRIN によって顕著に阻害された。このメカニズムについてさらに検討を加えたところ、bFGF に誘導された IL-6 の分泌は NF- κ B 阻害剤によって顕著に阻害された。これらの結果は IL-6 の分泌に対する NF- κ B の重要性を示した報告と一致している。また、EMMPRIN が bFGF に誘導される NF- κ B p65 サブユニットのリン酸化を阻害することが明らかとなった。

本研究では、当初 FW の生物学的活性について検討することを目的としていたが、FW により誘導される bFGF シグナル系の下流で NF- κ B が活性化され、EMMPRIN がその活性化を阻害することが明らかとなった。このことは、bFGF および EMMPRIN 間のクロストークの存在を示唆するものであった。FW によって誘導される bFGF が IL-6 産生を通じて創傷治癒を促進するのであれば、FW によって同時に誘導される EMMPRIN をどのように抑制するかという点は、FW の臨床応用を考えたとき、極めて重要な問題であると考えられる。