

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 712 号	論文提出者 後藤 久嗣
論文題目  インターロイキン1レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) の コラゲナーゼ3 (MMP-13) 発現抑制について	

## I. 緒 言

インターロイキン-1 (Interleukin-1, IL-1) は、単球やマクロファージなどの免疫担当細胞だけでなく、線維芽細胞や上皮細胞からも産生され、炎症性メディエーターとして発熱、急性期タンパク質の産生誘導、血管内皮細胞への接着促進、免疫系細胞の増殖、造血機能の調節、および破骨細胞分化・活性化などの生理活性を示すことが知られている。

IL-1 は細胞内シグナル伝達を引き起こすリガンドであるのに対して、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) は IL-1 レセプターに結合し、IL-1 $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の IL-1 レセプターへの結合を阻害することにより、IL-1 の活性を調節し、IL-1 のインヒビターとして働くりガンドとして知られている。実際、臨床的に慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid, GCF) 中の IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-1Ra 産生量を歯周病の疾患重症度別に比較したところ、IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は歯周病の重症度と正の相関を示したのに対し、IL-1Ra は負の相関を示し、IL-1Ra の産生低下が歯周病の病態悪化に関与する可能性が示唆されている。さらに、IL-1Ra 産生量は侵襲性歯周炎患者の深い歯周ポケット内では、健全な歯周ポケット内と比べ、減少していることが報告されている。関節炎や大腸炎さらに肉芽腫性肺炎において、抗炎症性タンパクとして内在性 IL-1Ra が重要であるということも示されている。BALB/ca 背景の IL-1Ra 欠損 (IL-1Ra KO) マウスは、ヒトと似た関節炎を自然発症することが知られている。IL-1Ra KO マウスを病理組織学的解析すると、肉芽組織の侵襲による関節破壊を伴う滑膜と関節周囲の炎症が起こっていることが報告されている。Mizutani らは IL-1Ra KO マウス腹腔マクロファージを歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS で刺激したところ、培養上清中の TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生が野生型 (WT) マウスに比べて増加し、IL-1Ra は IL-1 以外の炎症性サイトカイン産生も間接的に制御していること、また IL-1Ra は PGE<sub>2</sub> とその受容体である EP4 産生を介して骨髄細胞の破骨細胞分化も制御していることを明らかにしている。Izawa らは IL-1Ra が破骨細胞分化に関与する RANKL、M-CSF 遺伝子発現を抑制し、骨芽細胞分化に関与する ALP、BSP、OCN、Runx2 遺伝子発現を促進することを示した。また、IL-1Ra KO マウスに *A. actinomycetemcomitans* を感染させ実験的歯周炎を惹起し、組織学的変化をみたところ付着の喪失を伺わせる組織切片像を確認している。

歯周病は、歯周病原細菌感染を引き金に、宿主の過剰な免疫応答により産生される炎症性サイトカインが、歯周組織破壊ひいては歯の喪失をきたす慢性炎症性疾患である。歯周組織において、生体内外の境界部である上皮性付着部分はエナメル質と上皮細胞がヘミデスモゾーム結合することで成り立っていることが知られている。そのヘミデスモゾーム結合は細胞外マトリックスであるラミニン 5 と、接着分子のインテグリン  $\alpha_6\beta_4$  により構成されることが報告されている。ラミニン 5 は免疫染色や in situ hybridization (ISH) 法により付着上皮の内側基板において同定されている。健常者の GCF 中のラミニン 5 の分解断片量と比較し、歯周炎患者の GCF 中のラミニン 5 の分解断片量が多いことが報告されており、歯周炎の進行に伴う付着の喪失所見と合致する。matrix metalloproteinases (MMPs) は細胞外マトリックスを破壊する酵素群であり、創傷治癒において正常組織においても作用する。骨芽細胞と線維芽細胞において、MMP-13 は IL-1 により誘発されることが報告されている。さらに、MMP のうち特に MMP-13 はラミニン 5 $\gamma$ 2 鎖を分解することが知られている。

以上より、IL-1Ra は抗炎症作用ならびに骨吸収に対して抑制的に働き、歯周病の進行を制御

する重要な分子であることが示唆されるが、歯周病の病態において認められる付着の喪失についての検討は行われていない。そこで、本研究では、IL-1Ra が上皮性付着の喪失に与える影響について検討することとした。

## II. 材料および方法

### 1. Ca9-22細胞の培養方法

ヒト口腔上皮細胞株であるCa9-22細胞を10%牛胎仔血清 (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)、ペニシリン(100  $\mu$ g/mL, GIBCO-BRL, NY, USA) 添加のDulbecco's modified Eagle's medium を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。

### 2. small interfering RNA (siRNA)

Ca9-22細胞を6wellプレート上に1×10<sup>6</sup> cells/wellにて播種し、24時間培養した。その後、IL-1Ra siRNA (Stealth Select RNAi) および、control siRNA (RNAi Negative Control Medium) (共にInvitrogen, CA, USA) とLipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を混和し、24時間細胞に作用させ、同細胞へ形質導入した。形質導入後、細胞を回収し、6wellプレート上にIL-1RaがRNA干渉された細胞を1×10<sup>6</sup> cells/wellにて播種し時間経過別に試料を回収した。

### 3. real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

Ca9-22細胞からのTotal RNAはNucleoSpin RNA (Macherey-Nagel Inc., PA, USA) を用い、抽出した。RNAの純度および濃度評価は、Fluorospectrometer (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies inc, DE, USA) を用いA230/A260、A260/A280比を測定して評価した。その後、通法に従いSuperscript III RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いてcDNAを合成し、TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) およびTaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用い、95°C 1分、52°C 1分、72°C 30秒における40サイクルの反応を、ABI Prism7000 (Applied Biosystems) にて測定した。データ解析はCt値の差から相対定量を行う $\Delta\Delta$ Ct法を用いて行った。内在性コントロールとして18s rRNA特異的プライマープローブ、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1Ra、MMP-13、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -1、TIMP-2 プライマープローブ (Applied Biosystems) を用いた。

### 4. PCR array (Extracellular Matrix and Adhesion Molecules)

IL-1Ra siRNAおよびcontrol siRNAを形質導入したCa9-22細胞を6時間培養後、RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, MD, USA) を用いcDNAに逆転写した。そして、Human Extracellular Matrix and

Adhesion Molecules RT<sup>2</sup>Profile PCR Array (SABiosciences) を使用し、ABI Prism7000 (Applied Biosystems) にて測定した。

#### 5. 酵素活性測定

IL-1Ra siRNAおよびcontrol siRNAを形質導入したCa9-22細胞を24時間培養し、上清を回収した。そして、Sensolyte<sup>®</sup> Plus 520 MMP-13 assay kit (AnaSpec, CA, USA) を用いMMP-13の酵素活性を測定した。

#### 6. リコンビナントIL-1Ra添加試験

IL-1Ra siRNAおよびcontrol siRNAを形質導入したCa9-22細胞の培養液中にリコンビナントIL-1Ra (40 ng/ml, PeproTech, NJ, USA) を添加し、6時間培養した。その後、Total RNAを前述に従い回収し、qPCRにてMMP-13の遺伝子発現を測定した。

#### 7. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 解析

IL-1Ra siRNAおよびcontrol siRNAを形質導入したCa9-22細胞を24時間培養した。その培養上清を回収し、産生されたIL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ 量をELISA法により定量した (IL-1 $\alpha$ : Quantikine ELISA Human IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ : Quantikine ELISA Human IL-1 $\beta$ , R&D Systems, MN, USA) 。

#### 8. IL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ 中和抗体添加試験

IL-1Ra siRNAおよびcontrol siRNAを形質導入したCa9-22細胞に対し、抗IL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ 抗体及びアイソタイプコントロール抗体 (R&D Systems) を培養液中に添加し6時間培養後、Total RNAを前述に従い回収し、qPCRにてMMP-13の遺伝子発現を測定した。

#### 9. 実験動物と実験方法

実験動物には13週齢雄 BALB/cAマウス (日本クレア、東京) および、東京大学医科学研究所より供与されたIL-1Ra KOマウスを用いた。なお、全ての動物実験は、愛知学院大学歯学部動物

実験実施規定に従って行われた。また本実験は同大学動物実験委員会により承認された(動物実験計画承認番号: AGUD271号)。

#### 1 0. *A. actinomycetemcomitans*の培養方法

*A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29524 株)の培養には1% yeast extract (Difco Laboratories, MI, USA)を添加したbrain heart infusion (Difco Laboratories)を液体培地として使用し、37°C、嫌気条件下にて培養した。細菌数は、OD値を600 nm値にて分光光度計を用いて測定し、換算して求めた。

#### 1 1. 実験的歯周炎の惹起方法

13週齢IL-1Ra KOマウスとWTマウスの口腔内にカルボキシメチルセルロース溶液を用いて調製した*A. actinomycetemcomitans* (ATCC29524 株)菌体浮遊液( $1 \times 10^{10}$ CFU/ml)を1日おきに5回経口投与した。菌体浮遊液投与終了45日後に、ジエチルエーテル吸入およびペントバルビタール(ソムノペンチル®; 共立製薬、東京)を腹腔内注射(40 mg/kg)し全身麻酔下で屠殺し、下顎骨を採取した。また未処置群として同週齢のIL-1Ra KOマウスとWTマウスを用い、菌投与群と同時期に屠殺した。

#### 1 2. マウス下顎骨の病理組織学的解析

下顎骨を10%中性緩衝ホルマリン液にて一週間浸漬固定した。組織は、10%に希釈したethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)溶液にて2週間脱灰した。その後、滅菌蒸留水にて希釈した上昇エタノール系列で脱水、キシレンにて置換し、パラフィン包埋してパラフィンブロックを作成した。ミクロトームにて厚さ4 $\mu$ mの連続切片を作成した。組織切片は一次抗体にウサギ抗マウスMMP-13抗体(Santa Cruz Biotechnology)およびウサギ抗マウスラミニン5抗体(Abcam Inc., MA, USA)を用い、二次抗体にHistofine simple stain mouse MAX-PO (R)(Nichirei、東京)を使用し免疫組織染色を行い、光学顕微鏡下で下顎臼歯周囲の組織を観察した。

#### 1 3. 統計学的解析

全ての値は、平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。統計学的解析には統計解析ソフトPASW Statistics 18 (SPSS、東京)を用い、多重比較における検定にはone-way ANOVAとBonferroni's multiple comparison testを、2群間比較にはStudent *t* testを使用し、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

### III. 結 果

#### 1. IL-1Ra siRNA 形質導入

control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (コントロール群) と比較し IL-1Ra siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞群 (ノックダウン群) において IL-1Ra 遺伝子発現が有意に低下していた。以上の結果より、IL-1Ra siRNA 形質導入により IL-1Ra 発現は抑制されたことが示された。

## 2. PCR array (Extracellular Matrix and Adhesion Molecules)

IL-1Ra siRNA および control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞の細胞外マトリックスと接着分子に関する遺伝子発現の半網羅的検索を PCR array を用いて測定した。その結果、コントロール群と比較し、ノックダウン群において MMP-13 の最も高い発現増加を認めた。また、内因性の MMP 阻害因子である TIMP-1、-2 に関しては、顕著な発現変化は認められなかった。

## 3. MMP-13 発現

PCR array の結果より MMP-13 の高い遺伝子発現が認められたことから、時間経過別に qPCR 法にて MMP-13 遺伝子発現を測定した。その結果、1、3、6、12、24 時間後の MMP-13 発現は、いずれもコントロール群と比較しノックダウン群において遺伝子発現増加が認められた。

## 4. MMP-13 酵素活性測定

MMP-13 の酵素活性測定を行ったところ、コントロール群と比較しノックダウン群において有意に高い MMP-13 の酵素活性が認められた。

## 5. TIMP 発現

PCR array の結果において TIMP-1、-2 の有意な遺伝子発現変化は認められなかったが、MMP の制御に重要な因子であることから、時間経過別に qPCR 法にて TIMP-1、-2 遺伝子発現を測定した。その結果、コントロール群と比較しノックダウン群において 1、3、6、12 時間後の TIMP-1、-2 遺伝子発現の顕著な発現変化は認められなかった。24 時間後においては、TIMP-2 は同様に発現変化は認められなかったが TIMP-1 は有意に減少していた。

## 6. IL-1Ra 添加による MMP-13 発現変化

siRNA 形質導入後に培養液中にリコンビナント IL-1Ra を添加、6 時間培養し qPCR にて MMP-13 遺伝子発現を測定した。その結果、ノックダウン群にリコンビナント IL-1Ra を添加した群は、添加していないノックダウン群に比べ有意に MMP-13 の発現が抑制されていた。

#### 7. IL-1 発現

コントロール群と比較しノックダウン群において 3、6、24 時間後の IL-1 $\alpha$  遺伝子発現は有意に低下していたが、IL-1 $\beta$  遺伝子発現変化は認められなかった。また、コントロール群における IL-1 の産生量は IL-1 $\alpha$  が 35 pg/mL、IL-1 $\beta$  が 4 pg/mL、ノックダウン群では IL-1 $\alpha$  が 6 pg/mL、IL-1 $\beta$  が 5 pg/mL であった。このことより、IL-1 の恒常的な産生が確認された。IL-1Ra をノックダウンすることで産生量が有意に低下したのは IL-1 $\alpha$  のみであり IL-1 $\beta$  の産生量は低下しなかった。

#### 8. IL-1 中和抗体による MMP-13 発現変化

IL-1 の恒常的な産生が確認されたので、IL-1 の影響による MMP-13 遺伝子発現変化を確認した。IL-1 中和抗体を添加し、6 時間培養し MMP-13 遺伝子発現変化を qPCR 法にて調べた。その結果、IL-1 $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の中和抗体を作用させたいずれの群において、中和抗体を添加していないノックダウン群と比べ MMP-13 の発現変化は認められなかった。

#### 9. 実験的歯周炎惹起 IL-1Ra KO マウスにおける MMP-13 とラミニン 5 の局在比較

接合上皮部における MMP-13 の局在は、WT マウスの未処置群と *A. actinomycetemcomitans* 感染群の両群においてほとんど認められなかった。IL-1Ra KO マウスでは未処置群と *A. actinomycetemcomitans* 感染群の両群ともに多くの MMP-13 の局在が認められた。さらに、未処置 IL-1Ra KO マウス群と比較して *A. actinomycetemcomitans* 感染 IL-1Ra KO マウス群において、より根尖側に多くの MMP-13 の局在が認められた。また、接合上皮部における上皮性付着の構成成分であるラミニン 5 の局在は、WT マウスの未処置群と *A. actinomycetemcomitans* 感染群の両群において多く認められた。一方、IL-1Ra KO マウスでは未処置群と *A. actinomycetemcomitans* 感染群の両群ともに、ラミニン 5 の局在はほとんど認められなかった。

### IV. 考 察

一般的に、IL-1Ra は IL-1 による細胞内シグナル伝達を阻害し、IL-1 の誘導による MMP-13 発現を抑制する。しかし、今回の実験により IL-1 を介さず直接的に MMP-13 発現を抑制するという、IL-1Ra の新たな作用を示した。

主にラミニン 5 とインテグリン  $\alpha_6\beta_4$  から成るヘミデスモゾーム結合で構成される上皮性付着に対して IL-1Ra が与える影響を調べたところ、IL-1Ra 発現を抑制することで細胞外マトリックスと接着分子に関する遺伝子のうち MMP-13 が最も影響を受けるということが分かった。MMP-13

はラミニン5に特有な構成成分である、ラミニン5  $\gamma$ 2鎖を分解し、上皮性付着の喪失を引き起こすということが報告されている。しかし、これまでにIL-1RaがMMP-13を直接的に抑制するという報告はされていないため、今回、IL-1Raの重要な役割を示したことになる。

Ca9-22細胞の恒常的なIL-1の産生量はIL-1 $\alpha$ が35 pg/mL、IL-1 $\beta$ が4 pg/mLであった。しかし、IL-1Raをノックダウンすることで産生量が低下したのはIL-1 $\alpha$ のみでありIL-1 $\beta$ の産生量は低下しなかった。Sommaらの報告によると、IL-1Ra KOマウスにおけるIL-1 $\beta$ の産生量はWTマウスと比べ顕著な差はみられず、IL-1RaはIL-1 $\beta$ の産生量を調節していない可能性がある。しかしながら、本講座からの以前の報告によるとIL-1Ra KOマウスとWTマウスの腹腔マクロファージが産生するIL-1 $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の産生量に顕著な差が認められた。さらに、IL-1RaがLPS刺激によるIL-1 $\beta$ 産生を抑制し、細菌感染による防御に関する報告も存在する。この結果の不一致は、細胞種の違いや腹腔マクロファージの回収条件によるものかもしれないと考えた。

IL-1の中和抗体を作用させた結果、明らかなMMP-13発現抑制作用は認められなかった。このことから、IL-1RaのノックダウンによるMMP-13発現増加はIL-1の影響によるとは考えられないと考察した。また、コントロール群での恒常的なIL-1 $\alpha$ 、 $\beta$ の産生量に対し、ノックダウン群でのIL-1 $\alpha$ の産生量は有意に減少し、IL-1 $\beta$ の産生量は変化を認めなかった。本研究において、顕著なIL-1の発現増加が認められなかったため、MMP-13の発現増加にIL-1が影響したとは考えにくい。IL-1受容体を介したIL-1Raの特異的な作用は未だ解明中ではあるが、今回の結果よりMMP-13の発現抑制に対してIL-1Raが直接的に関与している可能性が示唆された。

動物実験にて、接合上皮部におけるMMP-13とラミニン5の局在を調べた。その結果、接合上皮部におけるMMP-13の局在は*A. actinomycetemcomitans*感染IL-1Ra KOマウスにおいて最も多く確認された。さらに、未処置IL-1Ra KOマウスと比較して*A. actinomycetemcomitans*感染IL-1Ra KOマウスにおいて、より根尖側にMMP-13の局在が認められた。また、接合上皮部におけるラミニン5の局在はWTマウスにおいて顕著に認められた。一方でIL-1Ra KOマウスにおいてほとんどその局在は認められなかった。このことから、MMP-13とラミニン5の局在は相反し、MMP-13の発現増加に伴いラミニン5の発現が低下すると考えられた。さらに、*A. actinomycetemcomitans*感染により炎症反応が促進された歯周組織において、IL-1Raの欠落状態は付着の喪失に対してより促進的に作用することが分かった。

歯周組織において、IL-1RaはMMP-13の作用を抑制するという生体防御的に重要な作用を示した。今回の結果から、欧米等で関節リウマチの治療薬として利用されているアナキンラのようなIL-1Ra製剤を用いた歯周治療は有用であると考えられ、今後更なる検討が必要である。

## V. まとめ

IL-1RaはMMP-13の機能を阻害することで付着の喪失抑制による歯周組織の保護に対して重要な役割を担っていることが明らかとなり、将来アナキンラのようなIL-1Raを用いた歯周病治療薬としての可能性が示唆された。