

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

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、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 のインヒビターとして働くリガンドとして知られている。Izawa らは IL-1Ra 欠損 (IL-1Ra KO) マウスに *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 菌 (*A.a.*) 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、野生型 (WT) マウスと比較し付着の喪失を伺わせる組織切片像を確認している。

歯周組織において、上皮性付着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 $\alpha_6\beta_4$ により構成されている。matrix metalloproteinases (MMPs) は細胞外マトリックスを破壊する酵素群である。骨芽細胞と線維芽細胞において、MMP-13 は IL-1 により産生誘導されることが報告されている。さらに、MMP のうち MMP-13 はラミニン 5 γ 2 鎖を分解することが知られている。

以上より、IL-1Ra は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詳細な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. 実験材料および方法

1. 細胞培養

ヒト口腔上皮細胞株である Ca9-22 細胞を培養した。

2. small interfering RNA (siRNA)

IL-1Ra siRNA および、control siRNA を Ca9-22 細胞に作用させた。形質導入後、IL-1Ra が RNA 干渉された細胞を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 を抽出した。18s rRNA、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、MMP-13、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) -1、TIMP-2 プライマープローブを用い測定した。

4. PCR array

Human Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT²Profile PCR Array を使用した。

5. ウェスタンブロット解析

IL-1Ra siRNA および control siRNA を形質導入した Ca9-22 細胞を 48 時間培養後、タンパクを回収した。その後、IL-1Ra 抗体、MMP-13 抗体、TIMP-1 抗体、TIMP-2 抗体、 β -actin 抗体を用いて反応させた。

6. 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。SensoLyte[®] Plus 520 MMP-13 assay kit を用い

MMP-13 の酵素活性を測定した。

7. 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) を添加し、6 時間培養した。

8. 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、上清を回収した。IL-1 α 、 β 量を ELISA 法により定量した。

9. IL-1 α 、 β 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 α 、 β 抗体及びアイソタイプコントロール抗体を培養液中に添加し 6 時間培養した。

10. 実験動物と実験方法

実験動物には 13 週齢雄 BALB/cA マウスおよび、IL-1Ra KO マウスを用いた。

11. *A.a.* の培養

A.a. (ATCC 29524 株) を嫌気条件下にて培養した。

12. 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 *A.a.* 菌体浮遊液を経口投与した。菌体浮遊液投与終了後に、下顎骨を採取した。

13. マウス下顎骨の病理組織学的解析

パラフィンブロックを作成し、MMP-13 抗体およびラミニン 5 抗体を用い免疫組織染色を行った。

1 4. 統計学的解析

全ての値は、平均値±標準偏差で表した。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。また、IL-1Ra タンパク発現もノックダウン群において著明に低下していた。

2. PCR array

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

形質導入後、各時間の 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。また、MMP-13

タンパク発現においてもコントロール群と比べノックダウン群において高い発現が確認された。

4. MMP-13 酵素活性測定

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

コントロール群と比較しノックダウン群において 12 時間後までの 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。また、TIMP-1、-2 タンパク発現においてもコントロール群と比べノックダウン群において著明な発現変化は確認されなかった。

6. IL-1Ra 添加による MMP-13 発現変化

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 の遺伝子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 α 遺伝子発現は有意に低下していたが、IL-1 β 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 α が 35 pg/mL、IL-1 β が 4 pg/mL、ノックダウン群では IL-1 α が 6 pg/mL、IL-1 β が 5 pg/mL であった。

8. IL-1 中和抗体による MMP-13 発現変化

IL-1 α および IL-1 β の中和抗体を作用させたいずれの群においても、中和抗体を添加していないノックダウン群と比べ MMP-13 の遺伝子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

MMP-13 の局在は、WT マウスの未処置群と *A.a.*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.a.*感染群の両群ともに多くの MMP-13 の局在が認められた。また、ラミニン 5 の局在は、WT マウスの未処置群と *A.a.*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.a.*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

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ことが分かった。Ca9-22 細胞のコントロール群での恒常的な IL-1 の産生量は IL-1 α が 35 pg/mL、IL-1 β が 4 pg/mL であったが、コントロール群と比較しノックダウン群での IL-1 α の産生量は有意に減少し、IL-1 β の産生量は変化を認めなかった。また、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。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、MMP-13 の局在は *A.a.*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.a.*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、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。このことから、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.a.*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 に対して抑制的に働くことで、MMP-13 によるラミニン 5 (上皮性付着の構成要素) の破壊を阻止するという生体防御的に重要な作用を示した。