

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20622

研究課題名(和文)カベオリン-1を標的とした結合組織における炎症の抑制制御

研究課題名(英文)Inhibitory effects of inflammation by targeting caveolin-1 in connective tissue.

研究代表者

富川 知子(山口知子)(TOMIKAWA, Tomoko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90580267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL-6は歯周病の炎症病態を増悪させるサイトカインである。本研究では、マウス微弱炎症モデルを作成した結果、血清中IL-6濃度が上昇し、血清中カテプシンBとLの濃度が上昇することが明らかになった。臨床的検討では、歯肉炎患者群において、他群と比較した場合、血清中のカテプシンBの活性は高くなる傾向がみられた。以上から、IL-6によって増悪した歯周炎症には、カテプシンBが関与しており、またカテプシンBは歯肉炎のような結合組織における炎症の段階において最も関与していることが示唆された。将来、歯周病悪化を抑制制御し得る、また疾患の早期発見に寄与し得る可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In many inflammatory diseases, which affect connective tissues and bacterial infection-induced inflammatory periodontal disease, so-called periodontitis, tissues destruction is likely to be mediated by a variety of proteolytic enzymes which act in a synergistic manner to degrade connective tissue components including collagen and fibronectin. In the study, by weak chronic inflammatory mice model, we examined IL-6 concentration and cathepsinB and L activity in the serum. We examined the effects of IL-6 on the secretion of pro-cathepsin B and L activity. The cathepsinB activity of patients are measured, and compared to healthy people. We demonstrated that it is upregulated to cathepsinB activity in the serum gingivitis patients. Our findings indicate that cathepsinB would be a therapeutic target for IL-6-induced tissue destruction in periodontitis.

研究分野：歯周治療学

キーワード：慢性炎症 歯周病 カテプシンB IL-6

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔細菌の感染によって発症する炎症性疾患である。その病態形成の本態は、マクロファージやリンパ球などの炎症性細胞が担う免疫反応であり、歯周組織において様々なサイトカインを産生しながら相互にネットワークを形成する。一方、歯肉線維芽細胞は、歯周組織の構築細胞として存在する。歯周病が発症・進行すると、歯肉線維芽細胞は、様々なサイトカインの影響を受けるようになるが、炎症組織の中で、この細胞がどのような反応を示すのかはまだ不明な点が多い(図1)。

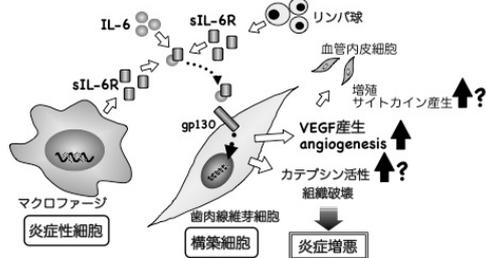


図1. IL-6 をとりまく歯周炎症の増悪メカニズム

これまで、歯周病病巣における歯肉線維芽細胞の動態について、代表的な炎症性サイトカインである IL-6 の作用の解明に携わってきた。歯肉線維芽細胞では、その細胞膜上に IL-6 レセプター (IL-6R) を発現しないので、IL-6 の刺激伝達には可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) の存在が必須である。sIL-6R はリンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞によって産生され、IL-6/sIL-6R 複合体の作用を受けた歯肉線維芽細胞は、膜上の IL-6 刺激伝達分子 gp130 のリン酸化を介して、下流の細胞内 IL-6 刺激伝達系が活性化する。

この一連の IL-6/sIL-6R trans-signaling cascade によって、IL-6/sIL-6R のシグナルを受けた歯肉線維芽細胞は、①VEGF の分泌を促進して、結合組織への血管浸潤を亢進する、②リソソーム酵素カテプシン B, L 合成を促進して、Phagocytosis (食食) した基質蛋白の分解・消化を亢進することが明らかとなった(図2)。さらに、③その産生には細胞膜蛋白カベオリン-1 が関与していることも報告してきた。

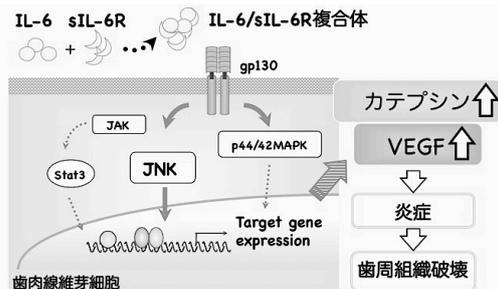


図2. IL-6/sIL-6R trans-signaling cascade

近年、カテプシンは主にリソソーム内で作用する酵素であるが、これは前駆体として細胞外へ分泌され、細胞外基質の分解にも関与していることが知られている。近年、カテ

ピンは主にリソソーム内で作用する酵素であるが、これは前駆体として細胞外へ分泌され、細胞外基質の分解にも関与していることが知られている。

VEGF は、angiogenesis と呼ばれる強力な血管新生能・血管透過性をもつサイトカインであり、炎症増悪因子であることが知られている。また、リソソーム酵素カテプシンはコラーゲン線維を主体とした結合組織を破壊することが知られている。これらのことから、IL-6 誘導性の VEGF 産生の亢進とカテプシン酵素の活性促進は歯周炎症悪化をきたすメカニズムとして重要であると考えられる。

これらの研究結果から、歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性カテプシン産生および VEGF 産生を制御し得る治療戦略を確立することが、歯肉炎症の人為的/積極的な制御を想定した新規の歯周炎サイトカイン療法の発展に繋がると考える。これらの研究結果から、歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性カテプシン産生および VEGF 産生を制御し得る治療戦略を確立することが、歯肉炎症の人為的/積極的な制御を想定した新規の歯周炎サイトカイン療法の発展に繋がると考えた(図3)。

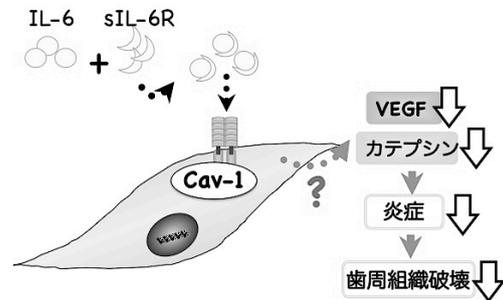


図3. カベオリン-1 による歯周炎症悪化の抑制

2. 研究の目的

研究の最終目標は、インターロイキン (IL) -6 をとりまく歯周炎症のメカニズムを解明し、その制御を目指すものである。IL-6 は歯周病の炎症病態を増悪させるサイトカインであり、これまで、申請者のグループは、歯周病病巣における歯肉線維芽細胞の動態について、IL-6 の作用を中心に解明してきた。これまで、IL-6 は歯肉線維芽細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) やカテプシン産生を亢進することが明らかにされている。本研究では、これまで得られた知見をもとに、IL-6 刺激伝達経路の一翼を担うカベオリン-1 およびカテプシン B に着目し、結合組織における炎症の抑制効果を検討した。

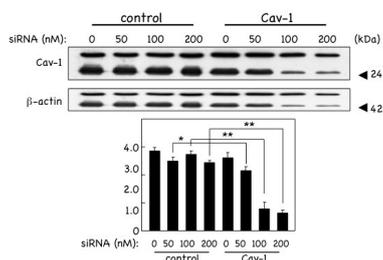
3. 研究の方法

使用した細胞は、臨床的に健康なヒト歯肉組織から分離・培養した線維芽細胞様細胞をヒト歯肉線維芽細胞として用いた。その培養は通法にしたがい行った。

カベオリン-1 の発現抑制細胞は、申請者が確立した方法にしたがって、カベオリン-1 を

標的とする small interfering RNA (siRNA) を細胞に導入して樹立したものをを用いた。siRNA の導入は、市販のカベオリン-1 siRNA (0-200 nM) を用いて、リポフェクション法により行った。また、siRNA の導入効率、ウエスタンブロット法によって評価した (図 4)。

図 4. カベオリン-1siRNA によるカベオリン-1 抑制系の確率



カベオリン-1 発現抑制細胞を IL-6/sIL-6R により刺激した後、48 時間後の培養上清を回収した。これらの上清中のカテプシン B, L および VEGF 分泌量は、ウエスタンブロット法および ELISA 法を用いて定量した。

上記と同様に刺激・培養上清の回収を行う。上清中のカテプシン活性は Barrett らの方法 (Barrett AJ *et al*, Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol*, 1981) によって測定した。

マウス (C57BL/6 : 8 週齢) 右肢筋に 100  $\mu$  l のテレピン油を注射し、慢性炎症を発症させる (図 5)。慢性炎症の評価は、血清学的に行う。血清中の IL-6 濃度が上昇していることを確認した後、血清中の前駆体カテプシンおよび VEGF 分泌量を測定した。

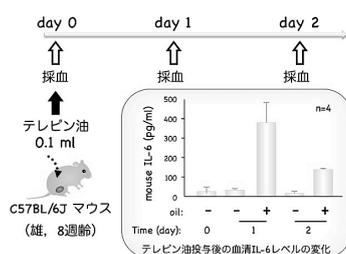


図 5. マウス微弱炎症モデルの構築

岡山大学病院歯周科の歯周病患者を対象に、十分なインフォームドコンセントを行い、同意取得後に、その血清をサンプルとした。対照として健常者の血清中のカテプシンおよび IL-6 の量を比較検討することによって、歯周病の状態とカテプシンの分泌量の相関関係を検討した。

カテプシン活性は、Barrett らの記載 (Barrett AJ *et al*, Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol*, 1981) に従って測定した。対照として採取した健常者の歯肉、血清中のカテプシン B, L, および IL-6 の量を比較検討することによって、歯周病の状態とカテプシンの分泌量の相関関係を検討した。

#### 4. 研究成果

歯肉線維芽細胞において、IL-6 によってカテプシン B および L および VEGF 分泌が劇的に亢進すること、そして、その亢進はカベオリン-1 発現抑制によって抑制されることを見いだした。また、p44/42 MAPK 及び JNK のシグナル伝達経路の阻害においてもこの亢進が抑制されることが分かった。このことは、IL-6 trans-signaling の制御によって、IL-6 の作用を抑制できる可能性を示唆するものである。

動物実験において、マウス微弱炎症モデル (IL-6 炎症モデル) を作成した結果、血清中 IL-6 濃度が上昇するとともに、血清中の前駆体カテプシン B と L の濃度は低下し、血清中のカテプシン B と L の濃度が上昇することも明らかとなった。

臨床的検討において、歯周病患者および歯肉炎患者群において、健常者群と比較した場合、血清中の高感度 IL-6 が高値となり、高感度 CRP の値は高感度 IL-6 の値と相関する傾向がみられた。また、歯肉炎患者において、歯周病患者群および健常者群と比較した場合、血清中のカテプシン B の活性は高くなる傾向がみられた。

以上のことから、IL-6 によって増悪した歯周炎症には、カテプシン B が関与しており、またカテプシン B は歯肉炎のような結合組織における炎症の段階において最も関与していることが示唆された。これによって、将来、歯周病悪化を制御抑制し得ること、また歯周病前段階での疾患の早期発見に寄与し得る可能性があることが考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕  
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富川 知子 (TOMIKAWA, Tomoko)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90580267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大森 一弘 (OMORI, Kazuhiro)  
後藤 絢香 (GTO, Ayaka)  
伊東 有希 (ITO, Yuki)  
中村 亜里紗 (NAKAMURA, Arisa)  
河村 麻理 (KAWAMURA, Mari)