

氏名	目黒道生
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 7 9 号
学位授与の日付	平成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	IFN- γ 誘導によるHLA-DR分子を介したヒト歯肉線維芽細胞からのRANTES産生に関わるシグナル伝達の研究
論文審査委員	教授 滝川 正春 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

【緒言】

抗原提示細胞 (APC) 上に発現しているヒト白血球抗原クラス II 分子は、抗原ペプチドと複合体を形成して T 細胞の抗原認識に関わる。さらに近年、この複合体を形成した HLA クラス II 分子は APC 内へシグナルを伝達するレセプター分子としても機能するということが明らかとなりつつある。ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) は、interferon- γ (IFN- γ) の存在下で細胞膜表面に HLA クラス II 分子を発現するが、抗原ペプチドが存在しても T 細胞の増殖を誘導しない。しかし、抗 HLA クラス II 抗体によって HLA クラス II 分子間の架橋を誘導すること、また HLA クラス II 分子-抗原ペプチド-T 細胞レセプター複合体を形成することによって、HGF はケモカインである regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES) や interleukin (IL) -8 等を産生することが知られている (Ohyama ら, Cytokine, 2001)。したがって、HGF が発現する HLA クラス II 分子のレセプター分子としての機能を解明することは、非 APC 細胞における HLA クラス II 分子の生理的役割の解明へつながらる。本研究は、その一端として、その際の RANTES 産生に関わるシグナル伝達経路を調べることを目的とした。

【材料および方法】

- 1. 試薬:** ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)上の HLA クラス II 分子の発現誘導に recombinant human IFN- γ を用いた。HLA-DR 分子と抗 HLA-DR 抗体との架橋にマウス抗 HLA-DR モノクローナル抗体 (clone: L243, IgG2a) を、その陰性対照として抗原非特異的マウス IgG2a を用いた。HGF からの RANTES 産生性を評価する際の陽性対照として *Escherichia coli* lipopolysaccharide, recombinant human tumor necrosis factor- α , および recombinant human IL-1 β を用いた。PTK 阻害剤として genistein を、PKC 阻害剤として GF109203X を、Src family 阻害剤として PP2 を、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤として SP600125 を用いた。
- 2. HGF の調製と刺激:** HGF は、研究目的および使用方法を十分に説明して了承を得た上で、健康なヒトの歯肉から分離して培養した。細胞は Nishimura (J Dent Res, 1996) らの記載にしたがって調整した。研究には、5 から 8 回継代培養した細胞を用いた。INF- γ で前処理することによって、HGF の細胞膜表面に HLA クラス II 分子の発現を誘導した。HLA-DR 分子を介した HGF への刺激伝達は、Ohyama らの記載にしたがって行った。
- 3. 培養上清中の RANTES 量の測定:** 市販の酵素免疫測定法 (ELISA) キットを用いて行った。なお、培養上清は抗 HLA-DR 抗体を加えてから 16 時間後に回収した。
- 4. イムノブロット法:** HGF タンパク質は、0.5% NP-40 を含む細胞溶解緩衝液を用いて可溶化し、SDS-PAGE で展開して PVDF 膜に転写した。目的とするタンパク質の検出は、一次抗体としてマウス抗リン酸化チロシン抗体、マウス抗リン酸化 JNK 抗体、ラビット抗 JNK 抗体、あるいはラビット抗アクチン抗体を用い、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス Ig 抗体あるいは HRP 標識抗ラビット Ig 抗体を用いて行った。

5. **RANTES mRNA の検出：** 逆転写-ポリメラーゼチェーンリアクション法によって行った。すなわち、培養 HGF から TRIZOL®RNA 分離キット (GIBCO) を用いて RNA を抽出し、mRNA を逆転写した後、RANTES の cDNA に特異的なプライマーを用いた PCR 法を行うことによって cDNA を増幅した。増幅した cDNA は、アガロース電気泳動法によって分離して確認した。
6. **統計処理：** 阻害剤を作用させた HGF と阻害剤を作用させない HGF からの HLA クラス II 分子を介した刺激による RANTES 産生量の違いを、Student's *t* 検定によって検定した。

【結果】

1. **HGF 上の HLA-DR 分子を抗 HLA-DR 抗体で架橋した際の HGF からの RANTES 産生性：** IFN- γ で 72 時間処理した HGF は、抗 HLA-DR 抗体の存在下で培養すると、抗体の濃度依存的に RANTES を産生した。
2. **PTK 阻害剤および PKC 阻害剤が RANTES 産生へ及ぼす影響：** HGF からの RANTES 産生量は、PTK 阻害剤である genistein の濃度に依存して減少した。なお、genistein の濃度は、HGF に対して細胞毒性を示さず、かつ PTK を特異的に阻害する濃度とし、100 μ M を最大とした。この濃度下で、RANTES 産生量は 50%減少した。
3. **チロシンリン酸化タンパク質の検出：** 特異的にチロシンリン酸化が増強した細胞タンパク質は、分子量が 54 および 27 kDa のタンパク質であった。
4. **JNK 阻害剤および Src 阻害剤が RANTES 産生へ及ぼす影響：** HGF からの RANTES 産生量は、JNK 阻害剤である SP600125 の濃度に依存して減少した。なお、SP600125 の濃度は、HGF に対して細胞毒性を示さず、かつ JNK を特異的に阻害する濃度とし、20 μ M を最大とした。この濃度下において、RANTES 産生量は 80%減少した。
5. **JNK 阻害剤が RANTES の mRNA 発現へ及ぼす影響：** 20 μ M の SP600125 存在下で HGF を抗 HLA-DR 抗体で刺激すると、細胞刺激 3 時間後の RANTES mRNA の発現が観察されなくなった。
6. **JNK-2 タンパク質のリン酸化：** HGF 上の HLA-DR 分子を抗 HLA-DR 抗体で架橋すると、刺激 5 分後から分子量 54 kDa の JNK-2 の活性化部位のリン酸化が増強した。この傾向は 120 分後においても持続していた。

【考察】

HGF 上の HLA クラス II 分子を抗 HLA-DR 抗体で架橋させた際の RANTES 産生量が、PTK 阻害剤処理によって減少した。このことから、この刺激によって誘導されるシグナル伝達経路に PTK が関与していることが示唆された。同様の刺激によって、54-kDa および 27-kDa のタンパク質のチロシン残基がリン酸化を受け、さらに、JNK-2 がリン酸化を受けた。この JNK-2 の分子量は 54-kDa であり、チロシンリン酸化を受けたタンパク質の分子量と一致した。JNK 阻害剤処理下における抗 HLA-DR 抗体の刺激によって、RANTES mRNA の発現が阻害され、さらに、RANTES 産生量が減少した。以上のことから、HGF において HLA クラス II 分子を介した刺激による RANTES 産生へ至るシグナル伝達経路には、JNK-2 が関与していることが示唆された。

HLA クラス II 分子を介したシグナル伝達には、HLA クラス II 分子自体の細胞内ドメインにシグナル伝達部位が存在しないことから、この分子と会合している他の分子が関与するものと考えられている。今後、JNK-2 に至るシグナル伝達経路の上流を調べることによってこの分子が明らかになるとともに、HLA クラス II 分子を介したシグナル伝達の全容が明らかになるものと考ええる。

RANTES は、T 細胞、単球、および好酸球の炎症局所への遊走と浸潤を誘導することが知られている。今回の結果と Ohyama らの報告を併せ考えると、歯周炎組織中において HGF 上の HLA クラス II 分子は、慢性炎症病巣の成立や維持に関与していると考ええる。

【結論】

HGF において、HLA クラス II 分子を介した刺激によって誘導される RANTES 産生には、JNK-2 が関与する。

論文審査結果の要旨

近年、抗原提示細胞（APC）上に発現しているヒト白血球抗原（HLA）クラス II 分子は、T 細胞の抗原認識に関わる以外に APC 内へシグナルを伝達するレセプター分子としても機能するということが明らかとなりつつある。非 APC 上に発現誘導される HLA クラス II 分子は抗原提示はしないがレセプター分子として機能することが知られているが、そのシグナル伝達経路は未だ解明されていない。

本研究は、非 APC における HLA クラス II 分子を介するシグナル伝達経路を解明する一環として、非 APC であるヒト歯肉線維芽細胞（HGF）を用い、HLA クラス II 分子を介して誘導される RANTES 産生に関わるシグナル伝達経路を調べることが目的とした。

本研究において得られた結果は次の通りである。

HGF において IFN- γ 誘導による HLA-DR 分子を抗 HLA-DR 抗体で架橋すると、1) RANTES の産生は亢進し、この作用は protein tyrosine kinase (PTK) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤存在下で抑制された。

2) 分子量 54 kDa の JNK-2 がリン酸化を受けて活性化した。

以上の結果は、HGF において、HLA クラス II 分子を介した刺激によって誘導される RANTES 産生には、JNK-2 が関与している可能性を示唆するものである。本研究は、非 APC 上の HLA クラス II 分子を介したシグナル伝達に関わる分子を同定したものであり、非 APC 上に発現誘導される HLA クラス II 分子が果たす生理的役割の解明に端緒を開いた点で意義ある研究と言える。

したがって、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。