

## 論文要旨等報告書

氏	吉澤 さゆり
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 3345 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	歯肉線維芽細胞上のヒト白血球抗原クラスII 分子を介したサイトカインの産生に関する細胞内シグナル伝達分子に関する研究

論文審査委員 教授 高柴 正悟 教授 福井 一博 助教授 久保田 聡

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

ヒトにおける主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex : MHC) であるヒト白血球抗原 human leukocyte antigen (HLA) class II分子は、抗原提示細胞上に発現し、外来性抗原をT細胞に提示することでT細胞を活性化する。しかし近年では、HLA-II分子は抗原を介してT細胞受容体と結合することでB細胞やマクロファージを活性化する機能を持つ受容体分子であることが明らかにされつつある。

HLA-II分子は、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) 上にも発現している。HGF上の本分子は、本来の役目である抗原を提示する能力を有さないが、HLA-抗原ペプチド-T細胞受容体複合体を形成することによって細胞内へシグナルを伝達する能力を有するので、HGFから種々のサイトカインやケモカインの産生に関与している。

しかしながら、HLA-II分子の細胞内ドメインが極めて短い上にリン酸化部位が存在しないことから、HLA-II分子は単独では細胞内にシグナルを伝達することはできないものと想定される。すなわちHLA-II分子は細胞内にシグナルを伝達する役目を持つ他の分子と会合しているものと考えられる。

抗原提示細胞においては、HLA-II分子と会合する分子やそれを介したシグナル伝達機構が明らかにされつつあるが、非抗原提示細胞における会合分子は一切明らかにされていない。そこで本研究は、HGFにおいてHLA-II分子と会合しており、HLA-II分子を介した刺激によって活性化を受けて、サイトカイン産生を誘導するような細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

- 1. 試薬** : 細胞膜上へのHLA-II分子の発現誘導には、組換えヒトinterferon (IFN)  $\gamma$  (R&D Systems) を用いた。抗HLA-II抗体としてマウス抗HLA-DRモノクローナル抗体 (Leinco) を、陰性対照抗体としてはIgGサブクラスが同じである抗原非特異的マウスIgG (IgG2a : BD PharMingen) を用いた。FAK阻害剤としては、luteolin (Extrasynthese) およびquercetin (Nakalai Tesque) を用いた。細胞内タンパク質のチロシンリン酸化の阻害には、 $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (SIGMA) を用いた。
- 2. HGFの培養** : HGFは健康なヒトの歯肉からNishimuraらの方法により分離・培養した。
- 3. 抗体マイクロアレイ解析** : 抗HLA-II抗体刺激によってリン酸化が増強されるタンパク質を抗体マイクロアレイ (Panorama<sup>TM</sup> Ab Microarray Cell Signaling : SIGMA) を用いて、網羅的に解析した。
- 4. 免疫沈降** : HLA-II分子と会合する分子の検出には、抗HLA-II抗体および陰性対照抗体を用いた免疫沈降の手法を用いた。細胞溶解液 [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM NaF, 5 mM EDTA, 0.4% proteinase inhibitor mixture (Roche Diagnostics GmbH), 1%CHAPS]

を用いてGFを可溶化し、その上清画分を回収した。得られたサンプルを抗HLA-II抗体あるいは陰性対照抗体と反応させ、HLA-II分子-会合分子複合体を、Protein A Magnetic beads (New England Biolabs) を用いて回収した。

5. **イムノプロット法**：リン酸化focal adhesion kinase (FAK) および総FAKの検出は、イムノプロット法を用いた。上述4で免疫沈降したタンパク質を還元状態でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて展開し、ポリビニリデン・ジフルオライド (PVDF膜：Millipore) 膜上に転写した。リン酸化FAKの検出には397残基のチロシンリン酸化部位 (pY397) を認識するウサギ抗ヒトリン酸化FAKポリクローナル抗体 (SIGMA) を、また総FAKの検出にはウサギ抗ヒトFAKポリクローナル抗体 (SIGMA) を、そして $\beta$ -アクチンの検出には、ウサギ抗アクチン抗体 (SIGMA) を一次抗体として用いた。また、HLA-II分子の検出には抗HLA-II抗体 (GeneTex, Inc., TX, USA) を一次抗体として用いた。二次抗体にはhorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギIg抗体またはHRP標識抗マウスIg抗体 (Amersham Biosciences) を用いた。反応タンパク質の検出にはECL蛍光システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、発光・感光操作を添付の説明書にしたがって行った。
6. **luteolinおよびquercetinによるFAKのリン酸化阻害作用の検討**：HGF中のFAKのリン酸化を阻害する候補薬剤として、フラボノイドの一種であるluteolinおよびquercetinを用いた。HGFをIFN- $\gamma$ で前処理した後に、0, 10, 20, 50, そして100  $\mu$ Mのluteolinまたはquercetinを含む培養液で48時間培養して、luteolinおよびquercetinを細胞に作用させた。その後、前述4と同様の操作で細胞タンパク質を抽出し、イムノプロット法にてリン酸化FAK, 総FAK, そして $\beta$ -actinを検出した。
7. **培養上清中のサイトカイン量の測定**：培養上清中のIL-6, MCP-1, そしてRANTESの量の測定は、human IL-6 ELISA kit, human MCP-1 ELISA kit, そしてhuman RANTES ELISA kit (以上, Endogen, Inc.) を用い、添付の使用説明書にしたがって行った。IFN- $\gamma$ で前処理したHGFを、luteolinを含む無血清培地にて細胞を48時間培養して、luteolinを作用させた後、抗HLA-II抗体あるいは陰性対照抗体を添加して細胞を刺激し、16時間後に培養上清を回収した。培養上清中のIL-6, MCP-1, およびRANTES量を前述の測定キットを用いて測定した。

#### 【結果】

抗HLA-II抗体でHGFを刺激すると、細胞内FAKのリン酸化が増強した。FAKは、抗HLA-II抗体でHLA-II分子-結合蛋白複合体を免疫沈降した際に共沈降する分子として検出された。luteolinは抗HLA-II抗体で刺激したHGFにおけるFAKのリン酸化を抑制したが、quercetinはそのリン酸化に影響を与えなかった。さらに、luteolinは抗HLA-II抗体刺激によって誘導されるHGFからのIL-6, MCP-1, およびRANTESの産生量を濃度依存的に抑制した。

#### 【考察】

一般にFAKは細胞膜直下の細胞質に存在するシグナル伝達であり、シグナル伝達に関わる多くの分子を活性化することが知られている。本研究によってHLA-II分子を介した刺激もFAKを介して細胞内に伝達される可能性が示された。HGFにおいてHLA-II分子を介した刺激によって誘導されるRANTES産生には、FAKからJNKを介したシグナル伝達に関与する可能性があるものと考えられた。またIL-6やMCP-1の産生には、FAKからJNKを介さずに他の分子を介したシグナル伝達関与するのかもしれない。そして、luteolinによってFAKシグナルを抑制することでHLA-II分子を介したサイトカイン産生が抑制されたことから、FAKのリン酸化を抑制することを介して歯周炎等における炎症反応が制御できる可能性が示唆された。

#### 【結論】

本研究の結果から、HGF上のHLA-II分子と会合し、HLA-II分子を介した刺激によって活性化を受け、サイトカイン産生に関係する細胞内シグナル伝達分子は、FAKであることが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト白血球抗原 human leukocyte antigen クラスII分子 (HLA-II分子) は、抗原提示能だけでなく、抗原を介してT細胞受容体と結合することで、B細胞やマクロファージを活性化する機能を持つ受容体分子でもあることが明らかにされつつある。

HLA-II分子は、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) 上にも発現しており、抗原提示能はないものの、HLA分子—抗原ペプチド—T細胞受容体の複合体を形成することによって細胞内へシグナルを伝達し、種々のサイトカインやケモカインの産生に関与している。したがって、HGF上のHLA-II分子は炎症の進展や制御に何らかの役割を担う可能性が考えられる。

しかしながら、HLA-II分子の細胞内ドメインが極めて短い上にリン酸化部位が存在しないことから、HLA-II分子は単独では細胞内にシグナルを伝達することはできないものと想定される。したがって、HLA-II分子は細胞内にシグナルを伝達する役目を持つ他の分子と会合しているものと考えられる。これらを明らかにすることは、非抗原提示細胞上に発現するHLA-II分子の生理的意義を明らかにする上で重要である。

本研究は、HGFにおいてHLA-II分子と会合しており、HLA-II分子を介した刺激によって活性化を受けて、サイトカイン産生を誘導するような細胞内シグナル伝達分子を明らかにすることを目的とした。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) 細胞膜上のHLA-II分子と会合している分子は、FAKであった
- 2) FAKは、HLA-II分子を介した刺激を細胞内に伝達した
- 3) フラボノイドの一種であるluteolinは、FAKのリン酸化を阻害した
- 4) FAKのリン酸化をluteolinによって阻害すると、HLA-II分子を介した刺激によって誘導されるIL-6, MCP-1, そしてRANTESの産生が抑制された

これらのことから、HGF上のHLA-II分子と会合し、HLA-II分子を介した刺激によって活性化を受け、サイトカイン産生に関係する細胞内シグナル伝達分子は、FAKであることが明らかになった。また、FAKのリン酸化を抑制することを介して炎症性サイトカイン産生を制御するで、HLA-II分子が強く発現しているとされる慢性歯周炎やリウマチ性関節炎といった慢性炎症性疾患における炎症反応の制御に臨床応用できる可能性が示唆された。このように本研究は非抗原提示細胞であるHGF上のHLA-II分子が歯周炎の病態形成に深く関与することを示唆した。

以上によって、本申請論文は学位論文として価値があると認められた。