

学位論文題名

HSC-2細胞の炎症反応における
マクロファージ遊走阻止因子の役割について
学位論文内容の要旨

【背景と目的】

口腔上皮細胞は、様々な刺激や口腔常在菌に対して物理的防御機構として機能するだけでなく、Toll-like receptor などにより細菌やウイルス成分を認識することで自然免疫反応を誘導し、炎症性サイトカインの産生等を介して口腔内での生体防御に関与することが報告されている。炎症性サイトカインのマクロファージ遊走阻止因子(Macrophage Migration Inhibitory Factor ;MIF)は、炎症や自然免疫反応において重要な役割を担っていることが知られているが、これまで口腔上皮での炎症、免疫応答における MIF の関わりは検討されていない。本研究では、口腔上皮での炎症反応における MIF の役割を探る目的で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 細胞を用い、MIF が LPS 誘発性の炎症反応に及ぼす影響を解析した。

【材料と方法】

HSC-2 細胞は HSRRB より購入し、10%FBS 含有 MEM 中で培養した。HSC-2 細胞を LPS 刺激 (10 µg/ml) した場合の、培養上清中の IL-8 量の測定は DuoSet ELISA Development System、MIF 量の測定は IDLISA Human MIF Immunoassay kit を使用した。また、mRNA 量は AGPC 法で total RNA を抽出し、Random primer を用いて cDNA 合成後、Applied Biosystems 7300 システムを用いた Real-time PCR 法により検出した。MIF siRNA およびスクランブル siRNA は、QIAGEN から購入し、HSC-2 細胞への導入は、HiPerFect Transfection Reagent を用いて行った。

【結果】

HSC-2 細胞を LPS 刺激することにより、IL-8 mRNA は LPS 刺激後 2 時間をピークに発現が亢進しその後減少し、IL-8 分泌量は 4 時間以降 72 時間まで有意に分泌が増加し続けることを認めた。また、MIF mRNA 発現量は、LPS 刺激の有無に関わらず、12 時間もしくは 24 時間以降増加し、MIF 分泌量は LPS 刺激によりコントロールと比較して、12 時間以降に分泌が若干増加する傾向が観察された。以上より HSC-2 細胞では LPS 刺激に応答して IL-8 mRNA

発現が上昇し、分泌が亢進する事が示された。また、MIF は mRNA 発現量、分泌量とも LPS 刺激により殆ど変化しないことが分かった。

次に siRNA (5 nM) による MIF ノックダウン条件下での、LPS 誘導時の MIF mRNA 量と IL-8 mRNA 量との変化を解析した結果、MIF mRNA は 7 割から 8 割程度、siRNA による発現抑制が観察された。また、LPS 刺激で誘導される IL-8 mRNA 発現は、MIF siRNA の導入により、スクランブル siRNA を導入した場合と比較し、約 5 割抑制された。次に MIF ノックダウン条件下における LPS 誘導性の IL-8 分泌量を解析した結果、MIF siRNA を導入した場合、スクランブル siRNA と比較して約 3 割抑制された。

最後に MIF のノックダウンが HSC-2 細胞における TLR4 の発現量に影響を及ぼしているか否かの検討を行った。MIF ノックダウン条件下における TLR4 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した結果、MIF siRNA の導入による TLR4 の発現に著しい変化は認められなかった。

【考察】

本研究は口腔上皮の LPS 誘発性炎症反応における MIF の役割を解析するために、HSC-2 細胞を使用した。HSC-2 細胞では LPS 刺激により IL-8 の mRNA および分泌を亢進させること、更に MIF ノックダウン条件下で LPS 刺激による IL-8 の mRNA 発現と分泌が抑制される結果を得ており、口腔上皮細胞においても MIF が LPS で誘発される炎症反応に促進的に機能する可能性が示された。

炎症部位では好中球の活性化や遊走、T 細胞の遊走を制御する主要なケモカインである IL-8 が発現することが報告されており、本研究の MIF のノックダウンが IL-8 の発現・分泌を抑制するという結果から考えると、MIF は他の臓器の場合と同様に口腔内の炎症反応の制御に関与していることが示唆された。

これまでの報告から、MIF が炎症反応の制御に重要な役割を果たしていることが示されているが、それが如何なるメカニズムによって制御されているのかについては現在不明な点が多い。サイトカインとして細胞外に分泌された MIF は、CD74 レセプターを介する経路やエンドサイトーシスを介する経路で細胞内に情報を伝え機能を発揮すると考えられている。一方、サイトカインとしての機能以外にも MIF は細胞内において JAB1 などのタンパク質と結合し、シグナル伝達や遺伝子発現の制御に関与していることが知られている。このように MIF は多様な機能を有しているが、本研究で得られた知見である、MIF のノックダウンにより IL-8 の遺伝子発現・分泌が減少するという現象が、どのような経路を介しているのかは現在明らかではない。MIF ノックアウトマウスでは TLR4 mRNA の発現が低下しており、その結果 LPS 感受性が低下していることが報告されているが、本研究の HSC-2 細胞における MIF のノックダウン実験の結果からは、TLR4 発現低下はみられておらず、ノックアウトマウスの場合とは異なるメカニズムが関与していることを示唆している。炎症時の IL-8 遺伝子発現を制御するシグナル伝達には、NF- κ B 系および MAPK 系が主に関与することが知られている。これまでの研究から、MIF は MAPK シグナルのうち、ERK を介したシグナル伝達の選択的活性化に関与しているこ

とが報告されており、HSC-2 細胞の場合も MIF のノックダウンが LPS による ERK の活性化を抑制することにより IL-8 の発現を抑制している可能性が考えられ、今後の更なる解析が必要である。

【結論】

HSC-2 細胞を LPS 刺激することにより、①IL-8 および MIF の遺伝子発現・分泌の有意な亢進が観察された。②siRNA で内在性 MIF 遺伝子の発現をノックダウンした場合、IL-8 の遺伝子発現・分泌の抑制がみられ、その条件下で TLR 4 の mRNA の発現抑制は認められなかった。以上より HSC-2 細胞において、MIF は LPS 刺激による IL-8 の mRNA 発現および分泌を促進していると考えられ、口腔上皮の炎症反応の制御に MIF が関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 柴 田 健一郎

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 武 田 宏 司 (薬学研究院)

学 位 論 文 題 名

HSC-2細胞の炎症反応における

マクロファージ遊走阻止因子の役割について

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

マクロファージ遊走阻止因子(Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF)は、炎症や自然免疫反応において重要な役割を担っている。これまで口腔上皮での炎症、免疫応答における MIF の関わりは検討されていない。本研究では、口腔上皮での炎症反応における MIF の役割を探る目的で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 細胞を用い、MIF が LPS 誘発性の炎症反応に及ぼす影響を解析した。

HSC-2 細胞は、10%FBS 含有 MEM 中で培養し、LPS 刺激($10\mu\text{g/ml}$)した場合の、培養上清中の IL-8 量の測定は DuoSet ELISA Development System、MIF 量の測定は IDLISA Human MIF Immunoassay kit を使用した。また、mRNA 量は ISOGEN 法で total RNA を抽出し、Random primer を用いて cDNA 合成後、Applied Biosystems 7300 システムを用いた Real-time PCR 法により検出した。MIF siRNA およびスクランブル siRNA は、QIAGEN から購入し、HSC-2 細胞への導入は、HiPerFect Transfection Reagent を用いて行った。

HSC-2 細胞を LPS 刺激することにより、IL-8 mRNA は LPS 刺激後 2 時間をピークに発現が亢進しその後減少し、IL-8 分泌量は 4 時間以降 72 時間まで有意に分泌が増加し続けた。また、MIF mRNA 発現量は、LPS 刺激の有無に関わらず、12 時間もしくは 24 時間以降増加し、MIF 分泌量は LPS 刺激によりコントロールと比較して、12 時間以降に分泌が若干増加する傾向があった。以上より HSC-2 細胞では LPS 刺激に応答して IL-8 mRNA 発現が上昇し、分泌が亢進する事が示された。また、MIF は mRNA 発現量、分泌量とも LPS 刺激により殆ど変化しないことが分かった。

次に siRNA(5 nM)による MIF ノックダウン条件下での、LPS 誘導時の MIF mRNA 量と IL-8 mRNA 量との変化を解析した結果、MIF mRNA は 7~8 割程度、siRNA による発現抑制が観察された。また、LPS 刺激で誘導される IL-8 mRNA 発現は、MIF siRNA の導入により、スクランブル siRNA を導入した場合と比

較し、約 5 割抑制された。MIF ノックダウン条件下における LPS 誘導性の IL-8 分泌量を解析した結果、MIF siRNA を導入した場合、スクランブル siRNA と比較して約 3 割抑制された。

MIF ノックダウン条件下における TLR4 mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した結果、MIF siRNA の導入による TLR4 の発現に著しい変化はなかった。

炎症部位では好中球の活性化や遊走、T 細胞の遊走を制御する IL-8 が発現することが報告されており、本研究の MIF のノックダウンが IL-8 の発現・分泌を抑制するという結果から考えると、MIF は他の臓器の場合と同様に口腔内の炎症反応の制御に関与していることが示唆された。これまでの報告から、MIF が炎症反応の制御に重要な役割を果たしていることが示されているが、それが如何なるメカニズムによって制御されているのかは現在不明な点が多い。サイトカインとして細胞外に分泌された MIF は、CD74 レセプターやエンドサイトーシスを介する経路で細胞内に情報を伝え機能を発揮すると考えられている。一方、MIF は細胞内において JAB1 などのタンパク質と結合し、シグナル伝達や遺伝子発現の制御に関与していることが知られている。MIF のノックダウンにより IL-8 の遺伝子発現・分泌が減少するという現象が、どのような経路を介しているのかは現在明らかではない。MIF ノックアウトマウスでは TLR4 mRNA の発現が低下しており、その結果 LPS 感受性が低下していることが報告されているが、本研究の結果は、ノックアウトマウスの場合とは異なるメカニズムが関与していることを示唆している。これまで MIF は ERK を介したシグナル伝達の選択的活性化に関与していることが報告されており、HSC-2 細胞の場合も MIF のノックダウンが LPS による ERK の活性化を抑制することにより IL-8 の発現を抑制している可能性が考えられ、今後の更なる解析が必要である。

HSC-2 細胞を LPS 刺激することにより、①IL-8 および MIF の遺伝子発現・分泌の有意な亢進が観察された。②siRNA で内在性 MIF 遺伝子の発現をノックダウンした場合、IL-8 の遺伝子発現・分泌の抑制がみられ、その条件下で TLR4 の mRNA の発現抑制は認められなかった。以上より HSC-2 細胞において、MIF は LPS 刺激による IL-8 の mRNA 発現および分泌を促進していると考えられ、口腔上皮の炎症反応の制御に MIF が関与していることが示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1) CD74 と MIF との関係について、2) TLR シグナルと MIF との関係について、3) HSC-2 細胞における TLR の発現について、4) MIF ノックアウトマウスと TLR4 との関係について、5) MIF と TLR2 との関係について等であった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、口腔上皮の炎症反応の制御に MIF が関与していることを示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は病態解明のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。