

論 文 内 容 要 旨

題 目

S100A9 Increases IL-6 and RANKL Expressions through MAPKs and STAT3 Signaling Pathways in Osteocyte-like Cells

(S100A9は、骨細胞様細胞においてMAPKsおよびSTAT3シグナル伝達経路を介してIL-6およびRANKLの発現を増加させる)

著 者

高木 亮輔

内容要旨

【目的】

S100A8およびS100A9タンパク質は、カルシウム結合タンパク質のサブユニットであり、それらのヘテロ複合体は、カルプロテクチンとして知られ、そのレセプターであるTLR4 (Toll-like receptor 4)およびRAGE (Receptor of Advanced Glycation End-products)に結合することにより、様々な炎症性メディエーターの発現を増強させることが知られている。最近の研究では、歯周炎患者の歯肉溝滲出液で高レベルのカルプロテクチンが検出され、*P. orphyromonas gingivalis* (*Pg*) 感染マウスの血管でも高レベルのS100A8およびS100A9が検出されたことが報告されている。これらの知見は、歯周炎患者におけるカルプロテクチンの発現レベルは、*Pg*由来LPSなどの病原因子によって増加することから、カルプロテクチンが歯周組織の炎症反応において重要な役割を果たすことを示唆している。

骨細胞は哺乳類の骨組織の主要な細胞成分であり、種々のサイトカインの発現により骨代謝は調節されているが、骨代謝におけるカルプロテクチンの役割に関する報告はほとんどない。

本研究では、S100A8およびS100A9が骨細胞における炎症誘発性および骨代謝関連因子の発現に及ぼす影響を調べた。

【方法】

細胞はマウス骨細胞株MLO-Y4-A2を使用し、10%FBSと抗生剤を添加した $\alpha$ -MEM培地で培養した。刺激因子として市販のリコンビナントS100A8およびS100A9を、ポジティブコントロールとして市販の*Pg*由来LPSを使用した。細胞毒性についてはcell counting kitを用いて検討した。また遺伝子発現は、通法に従って総RNAの抽出と逆転写反応を行った後、定量的リアルタイムPCRにて解析を行った。タンパク発現は、細胞上清の回収および全細胞タンパクを抽出した後、ELISA法やウェスタンブロット法にて解析した。シグナル伝達経路に関しては、それぞれの特異的阻害剤を用いた。また、S100A9のレセプターであるRAGEとTLR4の関与については、各レセプターのsiRNAの導入により解析を行った。すべての

統計分析は、ANOVAおよびTukey-Kramer法を用い、P値が0.05未満を有意差ありと判断した。

#### 【結果】

50 nMのS100A8およびS100A9と500 ng/mlの*Pg*由来LPSは、骨細胞の細胞生存率に影響を与えなかった。S100A9刺激により、炎症性サイトカインであるIL-6および骨代謝関連因子であるRANKLのmRNA発現及び蛋白産生が、濃度依存的に増強された。しかし、S100A9刺激は、そのレセプターであるRAGEとTLR4発現には影響しなかった。細胞にsiRAGEやsiTLR4を導入することにより、S100A9誘導性IL-6及びRANKLの遺伝子発現と蛋白の産生が有意に抑制された。シグナル伝達経路の解析の結果、ウェスタンブロット法により、p38とERK、STAT3のリン酸化の亢進を認めたが、JNKの明らかなリン酸化の亢進は認められなかった。p38とERK、STAT3のそれぞれの特異的阻害剤により、S100A9誘導性IL-6とRANKLの遺伝子発現と蛋白産生の増強は有意に抑制されたが、JNK特異的阻害剤では有意差は認めなかった。

#### 【考察及び結論】

マウス骨細胞様細胞に対して、S100A9がp38、ERKおよびSTAT3シグナル伝達経路を活性化し、IL-6およびRANKLの遺伝子発現と蛋白の産生を増強させることが明らかになった。これらから、骨細胞におけるS100A9-RAGE、-TLR4経路が、歯周病の炎症状態や歯槽骨吸収を増悪させる可能性を有することが示唆された。