

酸性電解機能水は EMMPRIN 分泌を誘導する

楠 正 文

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 佐藤秀一 教授, 浅野正岳 教授)

要旨: ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞(HSC3)を酸性電解機能水(acid-electrolyzed functional water: FW)で刺激することによって, extracellular matrix metalloproteinase inducer(EMMPRIN)の分泌が増強された。この現象はヒト子宮頸がん由来線維芽細胞(HeLa)においても同様に確認された。また、刺激を与えた細胞の培養上清および細胞溶解液中における、EMMPRIN濃度の測定および遺伝子発現の比較を行った結果、この増強は遺伝子の転写促進に依存したものではなく、あらかじめ細胞内に貯蔵されているEMMPRINが刺激に応じて細胞外へ放出されたものであることが明らかとなった。さらに、分泌されたEMMPRINの生物活性について検索したところ、ヒト単球性白血病由来株化細胞(THP-1)に対して各種のmatrix metalloproteinase(MMP)の発現を誘導することがわかった。一方でvascular endothelial growth factor(VEGF)については発現を抑制することがわかった。本研究の結果より、FW刺激はEMMPRINの分泌を介して創傷治癒の促進に関与する可能性が示された。また、一般に細胞死に際して放出される物質をalarminと総称するが、本研究の結果は、EMMPRINがalarminの一種である可能性を示唆するものであった。

キーワード: EMMPRIN, 酸性電解機能水, MMP

緒 言

癌細胞は、matrix metalloproteinase(MMP)によって周囲の組織を分解することで自身の浸潤性増殖を可能にする¹⁾。これまでMMPは腫瘍細胞によって産生されると考えられていたが、免疫組織学的検索の結果、主に間質線維芽細胞によって産生されることが明らかになった²⁾。一方、腫瘍細胞はMMPの発現を誘導するextracellular matrix metalloproteinase inducer(EMMPRIN)を産生するとされており、EMMPRINを介する腫瘍細胞と間質との相互作用は、腫瘍の進展において極めて重要な役割を有していると考えられる³⁾。

EMMPRINは、187アミノ酸残基(amino acid residue: aa)の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン(24 aa)および細胞質ドメイン(40 aa)からなる、分子質量28 kDaの膜貫通型糖タンパク質である^{4,5)}。また、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外領域には2つの免疫グロブリンドメインと3つのN-グリコシル化部位が存在する⁷⁾。EMMPRIN分子はグリコシル化の程度に応じて分子量が異なり、分子種の違いにより多様な生物学的機能を有するものと考えられている^{6,8)}。これまでの研究によると、EMMPRINは、腫瘍の進展における役割に加えて、発生、再生および創傷治癒など多面的な機能を有することが報告されている³⁾。

低濃度の食塩水を電気分解して得られる酸性電解機能水(acid-electrolyzed functional water: FW)は、殺菌作

用が強く皮膚や粘膜に対する為害性がないことから臨床領域で広く使用されている⁹⁾。近年は、生体に対する直接的なFWの効果について注目されており、ヒト子宮頸がん由来線維芽細胞(HeLa)においてbasic fibroblast growth factorの分泌を増強することが明らかになっている¹⁰⁾。しかし、口腔扁平上皮細胞に対するFWの影響は不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、FWの歯科領域における臨床応用を目的とし、創傷治癒促進作用を有するEMMPRINに着目して、ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞のEMMPRIN分泌に及ぼすFWの効果およびEMMPRINを介する細胞間相互作用について検討を行った。

材料および方法

1. 細胞培養およびFW刺激

本研究には、ヘルスサイエンス研究資源バンクより購入した、ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞であるHSC3、ヒト子宮頸がん由来線維芽細胞であるHeLaおよびヒト単球性白血病由来株化細胞であるTHP-1を用いた。細胞はRoswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640: Thermo Fisher Scientific) またはDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Thermo Fisher Scientific)に、10%ウシ胎児血清(fetal calf serum: FCS)および1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma Aldrich)を添加した10%FCS-RPMIおよび10%FCS-DMEMを用いて、5%CO₂、37°Cの条件下で培養した。

(受付: 平成30年1月15日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

HSC3 および HeLa は、24-well plate(IWAKI)上に 1×10^5 cells/well になるよう播種し、16時間培養したものを実験に供した。FW 刺激は、播種した細胞をリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)で2回洗浄した後、FW(pH2.7, 酸化還元電位 1,100 mV 以上、遊離有効塩素濃度 30 ppm; 三浦電子社製)で30秒間刺激することで行った。刺激後は、直ちに 10% FCS-RPMI を添加することによって作用を停止させ、溶液を吸引除去後、新しい培養液に交換し、さらに一定時間培養した。

2. サイトカインアレイ

HSC3 を 1×10^6 cells/10 cm dish となるよう播種し、前述の方法で刺激し、18時間培養した。その後培養上清を回収し、Human XL Cytokine Array kit (R&D systems)を用いてサイトカインアレイ実験を行った。画像は ChemiDoc XRS(BioRad)を用いて撮影した。

3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

HSC3 に対し、前述の方法で FW 刺激を与えた後、1, 6 および 12 時間培養を行い、培養上清を回収した。細胞溶解液は細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解用緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)で懸濁し、4°C, 15,000 × g で 3 分間遠心分離を行い、上清を回収することで調整した。EMMPRIN 濃度は、DuoSet ELISA Development System(R&D Systems)を用い、製造元のプロトコールに従って測定した。また、HeLa に対しても同様の実験を行った。

4. Real-time PCR

Total RNA は RNeasy mini kit(QIAGEN)を用いて抽出した。Complementary DNA は Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen)を用いて作製し、real-time PCR の試料とした¹¹⁾。Real-time PCR は、SYBR Green (TaKaRa)を用いて CFX96-Real-Time-System(BioRad)を用いて、95°C 3 分(1 サイクル)の加熱後、95°C 60 秒、60°C 30 秒および 72°C 60 秒(30 サイクル)の条件で行った。発現の強度はハウスキーピング遺伝子である β -actin の増幅量で補正し、相対的な比率として求めた。この研究で使用したプライマーを第 1 表に示す。

5. HSC3 由来の培養上清による THP-1 培養

FW 刺激または未刺激の HSC3 の培養上清を培養 3 時間後に回収した。この上清をそれぞれ conditioned medium(CM)+ および CM- とした。THP-1(1×10^6)を CM+ および CM- で 24 時間培養後細胞を回収し、total RNA を抽出した。Real-time PCR は 4. で示した方法を行った。

6. 統計処理

結果は平均値と標準誤差(standard error: SE)で示した。2 群間の比較は Student's *t*-test、多群間の比較には二元配置分散分析を行った後、Bonferroni 法を用いて有意差の検定を行った。なお、有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. FW 刺激により EMMPRIN 分泌は促進される

はじめに HSC3 を FW 刺激した後のサイトカイン分泌の変化をサイトカインアレイにより検索した。その結果、EMMPRIN の分泌が顕著に増強されたことがわかった(第 1 図)。そこで、この結果を ELISA により確認したところ、刺激後 1 時間で 1.7 ng/ml に達する有意な分泌が認められ、時間経過とともに暫時増加する傾向を示した(第 2 図)。一方、細胞溶解液中の EMMPRIN は刺激後 1 時間で 1.8 ng/ml にまで有意に減少し、未刺激群の約 57% に達した。

HeLa においても FW 刺激により EMMPRIN 分泌が促進されるか否かについて検討した。その結果、上皮系細胞である HSC3 と同様に、刺激後 1 時間で有意な分泌増強が認められ、時間経過とともに分泌量は増加した(第 3 図)。一方、細胞溶解液中の EMMPRIN 量は有意に減少し、HSC3 と同様の傾向を示した。

2. EMMPRIN の分泌増強は転写非依存的である

FW 刺激による EMMPRIN 分泌促進が転写レベルで調節されているか確認するため real-time PCR により遺伝子発現レベルの変化について検討した。HSC3 を FW で 30 秒間刺激した後、第 4 図に示した時間に total RNA を回収し検索した。その結果、EMMPRIN mRNA の発現は刺激の有無で大きな変化はなかった(第 4 図)。

3. 分泌された EMMPRIN の生物活性

FW により分泌誘導された EMMPRIN が生物学的活性を有しているか否かについて検討した。すなわち、

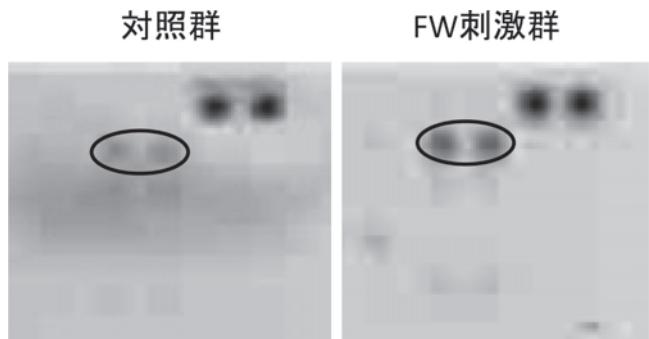
第 1 表 使用した各プライマーの塩基配列

Gene		5'	-3'
β -actin	Forward	GGA GCA AGT ATC TTG ATC TTG	
	Reverse	GGA GCA AGT ATC TTG ATC TTG	
MMP1	Forward	GGG GCT TTG ATG TAC CCT AGC	
	Reverse	TGT CAC ACG CTT TTG GGG TTT	
MMP2	Forward	CCC ACT GCG GTT TTC TCG AAT	
	Reverse	CAA AGG GGT ATC CAT CGC CAT	
MMP8	Forward	TGC TCT TAC TCC ATG TGC ACA	
	Reverse	TCC AGG TAG TCC TGA ACA GTT	
MMP9	Forward	GGG ACG CAG ACA TCG TCA	
	Reverse	TCG TCA TCC TCG AAA TGG	
MMP13	Forward	TCC TGA TGT GGG TGA ATA CAA	
	Reverse	GCC ATC GTG AAG TCT GGT AAA	
MMP14	Forward	CGA GGT GCC CTA TGC CTA	
	Reverse	CTC GGC AGA GTC AAA GTG	
VEGF	Forward	AGG GCA GAA TCA TCA CGA AGT	
	Reverse	AGG GTC TCG ATT GGA TGG CA	

HSC3由来のCM-およびCM+でTHP-1を培養し、各種MMP分子の発現増強についてreal-time PCRにより検索した。その結果、CM-と比較してCM+では有意にMMP1, 2, 8, 9, 13, 14の発現が増強された(第5図)。また、同様に処理したサンプルにおけるvascular endothelial growth factor(VEGF)発現について検討したところ、VEGFの発現は有意に減少した(第5図)。

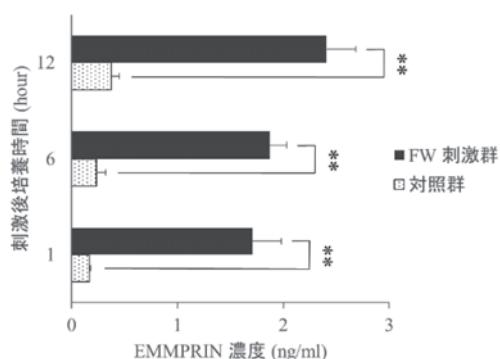
考 察

FW刺激により、HSC3およびHeLaによる培養上清中へのEMMPRIN分泌が有意に増強された。これに反して細胞溶解液中のEMMPRINは有意に減少したことから、分泌されたEMMPRINは細胞内に貯蔵されていたものがFW刺激により放出されたものであると予想

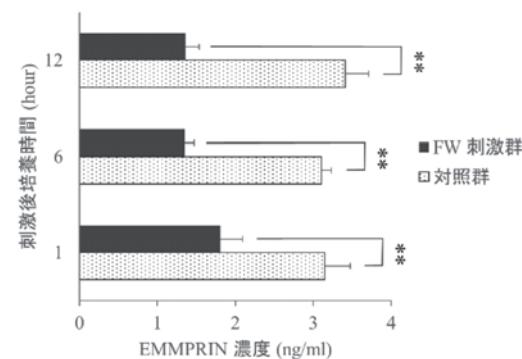


第1図 FW刺激によるサイトカイン発現の網羅的な解析
HSC3をPBS(対照群)またはFW(FW刺激群)で30秒間刺激した。10% FCS-RPMIで作用を停止させ、18時間培養後に上清を回収し、サイトカインアレイ実験を行った。図上の囲みはEMMPRINを示す。

A

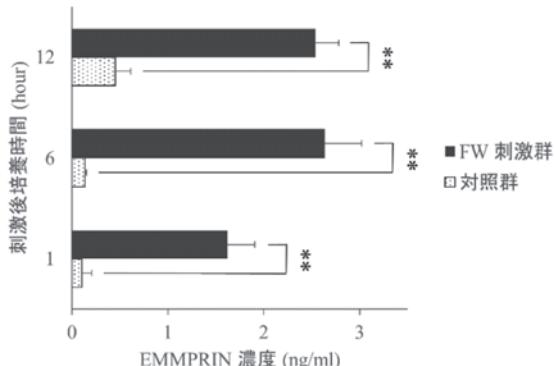


B

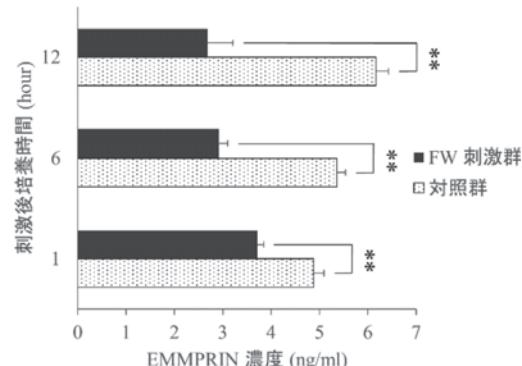


第2図 HSC3におけるFW刺激によるEMMPRINタンパク発現量の経時的变化
HSC3をPBSまたはFWで30秒間刺激した。10% FCS-RPMIで作用を停止させ、1, 6, 12時間培養後に細胞上清(A)および細胞溶解液(B)を回収し、ELISAを行った。(**p < 0.01)

A

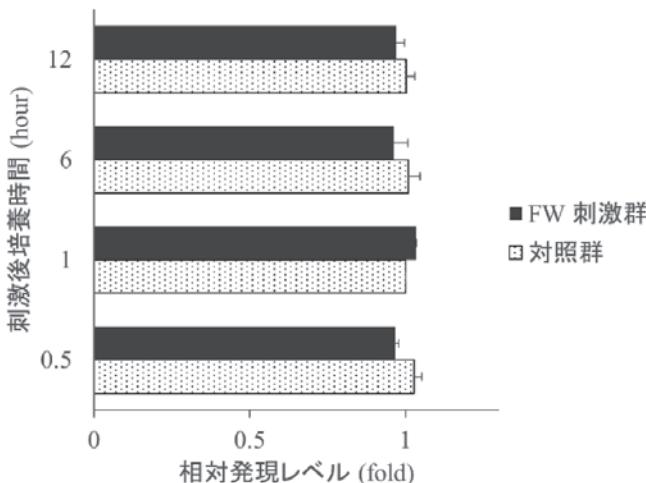


B

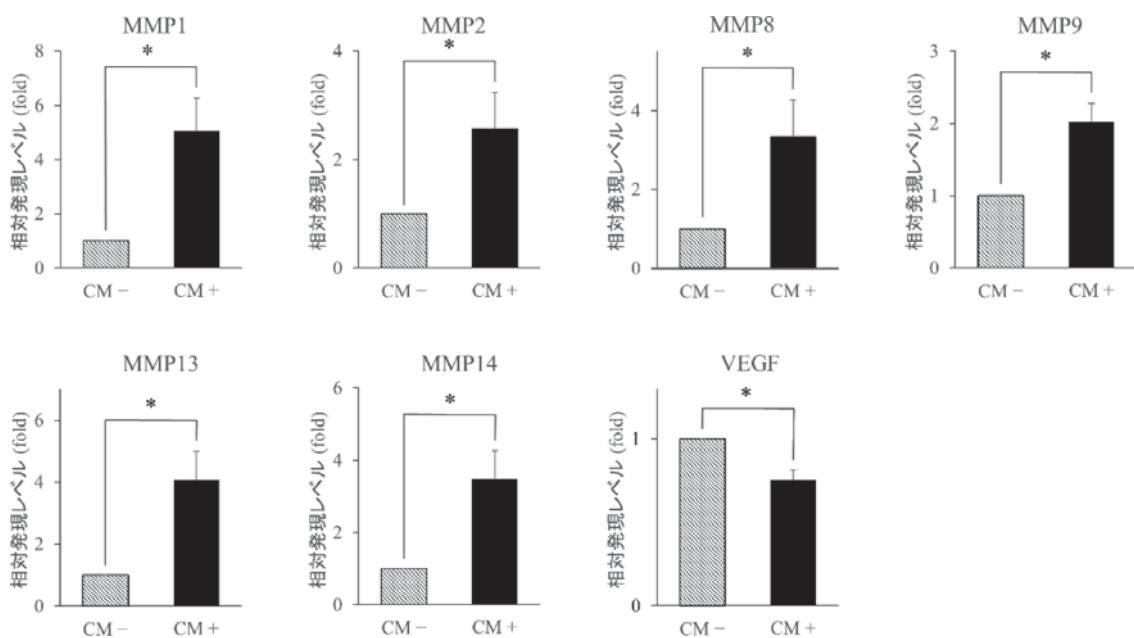


第3図 HeLaにおけるFW刺激によるEMMPRINタンパク発現量の経時的变化
HeLaをPBSまたはFWで30秒間刺激した。10% FCS-RPMIで作用を停止させ、1, 6, 12時間培養後に細胞上清(A)および細胞溶解液(B)を回収し、ELISAを行った。(**p < 0.01)

された。このことは、FW 刺激後の EMMPRIN mRNA の発現増強が real-time PCR による検索で認められなかったことにより裏付けられた。EMMPrin 分子は I 型の膜貫通型タンパク質であり⁴⁶⁾、通常は細胞外領域が酵素的に切断されて分泌されるものと考えられる。本研究での FW 刺激時間は 30 秒間と極めて短時間であり、酵素的切断を想定するには時間的にあまりにも短いと考え



第4図 HSC3 における FW 刺激による EMMPRIN mRNA 発現の経時的変化
HSC3 を PBS または FW で 30 秒間刺激した。10% FCS-RPMI で作用を停止させ、0.5, 1, 6, 12 時間培養後に total RNA を抽出し、real-time PCR を行った。



第5図 THP-1 における FW で分泌誘導された EMMPRIN による遺伝子発現の変化
THP-1 を CM + または CM - で 24 時間処理し、total RNA を抽出後、real-time PCR を行った。各標的遺伝子の基礎発現レベルを 1 とし、 β -actin に対する相対発現レベルを fold-induction として示した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

られる。一般的に、膜貫通型タンパク質を溶出するには、界面活性剤の存在が不可欠であり、たとえ界面活性剤を用いてもすべての膜貫通型タンパク質は溶出されないとされている。FW による 30 秒間の刺激により EMMPRIN が培養上清中に放出されたという事実は極めて特異な現象であり興味深い。

細胞傷害や壞死に際して細胞から放出される分子は alarmin と総称され、周囲に自身の置かれた危機的状況を周知することで迅速な免疫応答を促す役割を演じているとされている¹²⁾。本研究の結果は、FW の刺激に応じて細胞外に放出された EMMPRIN が周囲の細胞や組織に危機的状況を知らしめるという alarmin の機能を有しており¹²⁾、EMMPrin は alarmin の一種である可能性が示唆された。典型的な alarmin である IL-1 α は、細胞膜に結合していることが報告されている¹²⁾。これは細胞膜上に存在するレクチン様分子と IL-1 α 分子の糖鎖に存在するマンノースが結合することによるものであるが¹³⁾、EMMPrin 分子がグリコシル化の程度によって種々の分子種を有すること、また FW 刺激後の培養上清中に大量に分泌されることを考え併せると、EMMPrin の細胞内局在についても今後検討する必要がある。

EMMPrin の最も重要な機能は、MMP の産生を誘導することである⁴⁾。FW 刺激後に放出された EMMPrin が機能的であるかどうかを調べるために、FW 刺激または未刺激の HSC3 由来の培養上清を用いて THP-1 を培養したところ、THP-1 における MMP の発現を顕著に誘導

導した。すなわち分泌増強されたEMMPRINは生物学的活性を維持しており、創傷治癒を促進する可能性が示された。しかし一方で、血管新生因子であるVEGF発現は抑制され、この結果は従来の報告とは相いれないものであった^{14, 15)}。EMMPRINの機能はその受容体であるreceptor for advanced glycation end productまたはtoll-like receptor 4に結合することにより発揮されるが³⁾、本研究で用いたTHP-1におけるこれらレセプターの発現またはその下流のシグナル伝達系がこれまでの報告で用いられてきた細胞とは異なっていることがVEGF発現減少の原因である可能性が考えられる。また、EMMPRINは肺癌において骨髄由来免疫細胞の癌領域への遊走を促進するとされており¹⁴⁾、癌細胞の増殖抑制に関与している可能性が指摘されている。VEGFはその血管新生作用により癌の進展に寄与するとされているが、EMMPRINの作用によりその発現が抑制されるのであれば、癌の進展を抑制する可能性があり極めて興味深い。

結論

本研究では、上皮細胞と線維芽細胞のEMMPRIN発現に及ぼすFWの影響および上皮細胞が分泌するEMMPRINが単球細胞のMMPとVEGF発現に及ぼす影響について検討を行った。その結果以下の結論を得た。

1. HSC3 および HeLa では FW 刺激により培養上清中のEMMPRIN 分泌は有意に増加し、細胞溶解液中のEMMPRIN 濃度は有意に減少した。
2. EMMPRIN の発現増強は転写非依存的であった。
3. FW によって HSC3 から分泌されたEMMPRIN は THP-1 の MMP1, 2, 8, 9, 13 および 14 の発現を有意に増強させ、VEGF の発現を有意に減少させた。

以上のことから、FW 刺激は上皮および線維芽細胞からEMMPRINを放出させ、さらに単球に対し MMP 発現を誘導することにより、創傷治癒促進に関与する可能性が示された。また、EMMPRINは、周囲細胞や組織に危険を知らせる分子群であるalarminのひとつである可能性も示唆された。

本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座 佐藤秀一教授ならびに同学部病理学講座 浅野正岳教授に謹んで心より感謝申し上げます。また、本研究に対して多大なご協力を頂いた歯周病学講座員ならびに病理学講座員に深く感謝の意を表します。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

文献

- 1) Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.
- 2) Basset P, Wolf C, Chambon P (1993) Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Treat* 24, 185-193.
- 3) Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 83, 283-295.
- 4) Fossum S, Mallett S, Barclay AN (1991) The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur J Immunol* 21, 671-679.
- 5) Miyauchi T, Masuzawa Y, Muramatsu T (1991) The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem* 110, 770-774.
- 6) Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 55, 434-439.
- 7) Muramatsu T, Miyauchi T (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 18, 981-987.
- 8) Sun J, Hemler ME (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 61, 2276-2281.
- 9) Kubota A, Goda T, Tsuru T, Yonekura T, Yagi M, Kawahara H, Yoneda A, Tazuke Y, Tani G, Ishii T, Umeda S, Hirano K (2015) Efficacy and safety of strong acid electrolyzed water for peritoneal lavage to prevent surgical site infection in patients with perforated appendicitis. *Surg Today* 45, 876-879.
- 10) Saiki A, Motoyoshi M, Motozawa K, Okamura T, Ueki K, Shimizu N, Asano M (2017) EMMPRIN inhibits bFGF-induced IL-6 secretion in an osteoblastic cell line, MC3 T3-E1. *Int J Med Sci* 14, 1173-1180.
- 11) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K (2009) Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 156, 294-302.
- 12) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarms: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 13) Brody DT, Durum SK (1989) Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J Immunol* 143, 1183-1187.
- 14) Tang Y, Nakada MT, Rafferty P, Laraio J, McCabe FL, Millar H, Cunningham M, Snyder LA, Bugelski P, Yan L (2006) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3 K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer Res* 4, 371-377.
- 15) Chen Y, Gou X, Kong DK, Wang X, Wang J, Chen Z, Huang C, Zhou J (2015) EMMPRIN regulates tumor growth and metastasis by recruiting bone marrow-derived cells through paracrine signaling of SDF-1 and VEGF. *Oncotarget* 6, 32575-32585.