論文の内容の要旨

氏名：楠　　正文
博士の専攻分野の名称：博士（歯学）
論文題名：酸性電解機能水は EMMPRIN 分泌を誘導する

酸性電解機能水（acid-electrolyzed functional water : FW）は，食塩水を電気分解することにより生成され，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で広く用いられている。また，熱傷モデルにおいては，受傷後の感染が FW によって防止されることにより，創傷治癒を促進することが報告されている。しかし, FW の創傷治癒促進作用についてのメカニズムは解明されていない。

創傷治癒の促進作用を有するタンパク質として，extracellular matrix metalloproteinase inducer（EMMPRIN）が挙げられる。EMMPRIN は，膜貫通型の糖タンパク質で matrix metalloproteinase（MMP）の発現を誘導することによって，組織のリモデリングを活性化し，創傷治癒を促進させることが報告されている。

そこで本研究では，FW が創傷治癒を促進するメカニズムの解明を目的とし，上皮細胞と線維芽細胞の EMMPRIN 発現に及ぼす FW の影響を検討した。また上皮細胞が分泌する EMMPRIN が単球細胞の MMP と vascular endothelial growth factor（VEGF）発現に及ぼす影響についても調べた。

実験には，口腔扁平上皮癌由来株化細胞（HSC3），ヒト子宮頸がん由来線維芽細胞（HeLa），ヒト単球性白血病由来株化細胞（THP-1）を用いた。細胞に対する FW の刺激は，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（pH 2.7, 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，直ちに培地を添加することにより作用を停止させ，溶液を吸引除去後，新しい培地に交換し，さらに一定時間培養した。サイトカインアレイは, HSC3 を刺激後 18 時間培養し，培養上清を回収し実験に供した。ELISA は, HSC3 ならびに HeLa に対して，刺激後 1, 6 および 12 時間の培養上清および細胞溶解液を用いて行った。細胞溶解液の調整は，細胞を PBS で洗浄後，細胞溶解用緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 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行った。Real-time PCR は, FW 刺激後の HSC3 を, 0.5, 1, 6 および 12 時間培養し，細胞溶解液から total RNA を抽出し, complementary DNA を作製することで行った。このようにして得られた FW 刺激後の HSC3 の培養上清を conditioned medium（CM）+, また未刺激の培養上清を CM− とした。これらのサンプルを用いて THP-1 を 24 時間培養し，精製した total RNA を用いて, MMP1, 2, 8, 9, 13, 14 および VEGF の発現を real-time PCR で調べた。

サイトカインアレイの結果, FW 刺激により, HSC3 の EMMPRIN 発現は顕著に増強した。この結果を ELISA で確認したところ，HSC3 では培養上清において刺激後 1 時間で対照群の 0.2 ng/ml に対して 1.7 ng/ml に達する分泌を認め，時間経過とともに増加する傾向を示した。対照的に，細胞溶解液においては刺激後 1 時間で対照群の 3.1 ng/ml に対して 1.8 ng/ml にまで減少した。また HeLa においても, HSC3 と同様に細胞上清では時間経過とともに EMMPRIN 分泌量は増加し，細胞溶解液では EMMPRIN 量は減少した。次いで, EMMPRIN 分泌の増強が転写レベルで調節されている可能性について検討した結果, EMMPRIN mRNA の発現は刺激の有無で統計的に有意な差はみられなかった。さらに, FW 刺激により発現誘導された EMMPRIN が THP-1 において生物学的活性を有しているか否か検討した結果, CM− と比較して CM+ では MMP1, 2, 8, 9, 13 および 14 の発現が有意に増強された。また，同様に処理したサンプルにおける 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。

本実験の結果，HSC3 および HeLa では FW 刺激により培養上清中の EMMPRIN 分泌は増加し，細胞溶解液中の EMMPRIN 濃度は減少した。また，分泌増加に必要な FW 刺激時間はわずか 30 秒程度であり，EMMPRIN の発現増強は転写非依存的であったことから，細胞内に貯蔵された EMMPRIN が放出されたと考えられた。また，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 の発現を増強させ, VEGF の発現を減少させることが示された。したがって，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。