

歯根膜由来線維芽細胞のゼラチナーゼ産生に対する

インターロイキン1 - 刺激の影響（2）

吉田 直樹

The Effect of Interleukin 1- on Gelatinase Expression by Periodontal
Ligament Fibroblasts (2)

YOSHIDA, Naoki

緒言

プラーク（歯垢）中の歯周病関連細菌が、歯周炎の発症および進行において関与していることは、明らかである。

細菌の病原因子は、重要であるが、歯周組織局所における炎症反応や免疫反応を調節する因子として、サイトカインが重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。グラム陰性桿菌の細胞壁のリポ多糖(LPS)の刺激によって、マクロファージが代表的なサイトカインのひとつであるインターロイキン1 - （IL-1）を産生することが知られている。

IL-1 は歯周組織局所の細胞に働いて、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)の産生に影響をおよぼすことが知られている。

歯周炎における歯周組織破壊には、MMPs と呼ばれる酵素群が、重要な役割を演じている^{1), 2), 3)}。歯周炎や慢性関節リウマチ、悪性腫瘍の転移においては、MMPs が過剰に分泌されていると考えられている。

現在までに、20 種類を超える MMPs が発見されている。MMPs は コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシン、膜型 MMPs、その他の5群に大きく分類される。その中で、ゼラチナーゼ群 (MMP-2, MMP-9)は、ゼラチン分解活性を有するのみならず、基底膜の主要な成分である 型コラーゲンも分解することできる。そのことから、悪性腫瘍の

浸潤転移において、重要な役割を演じていると考えられ、特に当該分野の研究者が精力的に研究を進めてきた。

今回筆者は、培養歯根膜由来線維芽細胞を IL-1 および Transforming Growth Factor-1 (TGF-1) で刺激することによって、MMP-2 の産生がどのように影響を受けるか、RT-PCR 法を用いて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

ヒト歯根膜由来線維芽細胞の採取は、智歯の抜歯（術前に患者から、歯牙と歯根膜を実験に使用することに同意を得ている）の後、歯根の中央 1 / 3 の部分に付着している健全な歯根膜組織を、メスにて掻き取った⁴⁾。採取した歯根膜細胞を、抗生物質（100 mg/ml penicillin G, 100 U/ml Streptomycin, 2.5 mg/ml amphotericin B）を含むリン酸緩衝液にて 5 回漱いた後、組織の薄片を直径 35 mm 培養用皿に置きカバーガラスで被った。10% 牛胎児血清を含む alpha minimum essential medium (α-MEM) を加え、5% 炭酸ガス、95% 大気、37℃にて、培養した。⁴⁾ 培養細胞が、コンフルエントに達した時点で、継代を行った。実験には、継代が 3 から 8 代の細胞を使用した。

2. サイトカインの添加

細胞を直径 36 mm 培養用皿に播種し、コンフルエントに達した後、培養液を、牛胎児血清を含まず、0.2 % lacto albumin hydrolysate を含み、他の組成は上記と変わらない培養液に交換し、24 時間培養を行った後、同組成の培養液に、無添加、IL-1 (1.2 ng/ml) 添加、または TGF-1 (5 ng/ml) を添加し、24 時間培養した。

3. 細胞の回収および RNA の抽出

単層の培養細胞に 1 ml の ISOGEN 溶液 (NIPPON GENE 社) を加えて溶解させ、0.2 ml のクロロホルムを混合し、12,000 g で 15 分間、4℃において遠心した。RNA を含む水相を採取し、イソプロパノールを加え、12,000 g で 15 分間、4℃において遠心することによって total RNA を、沈殿させた。沈殿物 (total RNA) を 70% エタノールで洗浄し、TE {10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)} に溶解した。

4. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA を 33 μl の反応混合液 (amersham pharmacia biotech 社製, 0.2 μg の Not I-d(T)₁₈ Primer と Murine Reverse Transcriptase を含む) 中で、逆転写を行い cDNA を作成した。MMP-1, MMP-2, および β-actin cDNA を特異的な oligonucleotide primers (表 1) によって、プログラマブル・サーマル・コントローラー (MJ RESEARCH, INC) を用いて増幅した。すなわち、94℃で 1 分間加熱した後、92℃で 40 秒の熱変性、60℃で 40 秒のアニールリング、75℃で 1 分 30 秒の伸長反応を 1 サイクルとして、30 サイクル、増幅を行った。

増幅した cDNA を 1.5 % アガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色し、紫外

線照射下で、検出した。

表 1 .

Primer Sequences Utilized for RT-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')	Length of PCR Product (base pairs)
-actin		
Forward	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	202
Reverse	GGAGCAATGATCTTGATCTTC	
MMP-1		
Forward	CATCCAAGCCATATATGGACGTTCC	611
Reverse	TCTGGAGAGTCAAAATTCTCTTCGT	
MMP-2		
Forward	CCTCTCCACTGCCTTCGATACACC	162
Reverse	AGCATCTATTCTTGGGCACCG	

結果および考察

RT-PCR の結果、ヒト培養歯根膜線維芽細胞において、無刺激、IL-1 (1.2 ng/ ml)刺激、TGF- 1(5 ng/ml)のいずれの条件下でも、対照として用いたハウスキーピング遺伝子である -actin の発現が確認された。MMP-1 の発現は、無刺激に比して、IL-1 (1.2 ng/ ml)刺激下において、発現量が増加していた。MMP-2 は、無刺激においては、発現が確認できなかったのに対して、IL-1 (1.2 ng/ ml)刺激および TGF- 1(5 ng/ml)刺激下では、発現が確認された(図 1)。前回報告した、ゼラチンザイモグラフィーにおける結果では、無刺激下においても、ゼラチン分解活性が認められた。また、その分子量から活性は、MMP-2 由来と考えられた。mRNA 発現と酵素活性に関して、無刺激時の結果が異なる理由としては両実験間の感度の差である可能性が考えられるが、詳細に検討する必要がある。

MMP-1 は、歯周組織の主要な成分である Ⅲ型コラーゲンを分解することができることから、歯周炎における歯周組織破壊に関するキーエンザイムと考えられている。一方、MMP-2 は、Ⅲ型コラーゲンを分解できること、ゼラチンや、その他数種類の結合組織成分を分解できることから、歯周組織代謝において、MMP-1 と共同して働いている可能性がある一方、異なった役割を担っている可能性も考えられ、不明な点が多い。MMP-2 の役割に関して、今後、さらに検討する必要がある。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Lane 1: Molecular weight standard (50-2000 bp ladder)

Lane 2-4: 無刺激.

Lane 5-7: IL-1 (1.2 ng/ml) 刺激.

Lane 8-10: TGF- β 1 (5 ng/ml) 刺激

Lane 2,5,8: β -actin 発現 (202 bp),

Lane 3,6,9: MMP-1 発現 (611 bp),

Lane 4,7,10: MMP-2 発現 (162 bp)

図1 各条件下における β -actin, MMP-1 および MMP-2 mRNA の発現

文献

- 1) 吉田直樹：歯周疾患における Matrix Metalloproteinases の役割 . 静岡県立大学短期大学部 研究紀要, 第 14-2 号 (2000 年度) 53-61, 2001
- 2) Nagase, H. in Zinc Metalloproteases in Health and Disease (ed. Hooper, N.M.) 153-204 (Taylor and Francis, London, 1996).
- 3) Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M. K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Enger, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 4, 197-250, 1993.
- 4) Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R. & Foster, R.A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J. Dent. Res., 67, 66-70, 1988.

(2003 年 3 月 20 日 受理)