

平成17年度  
研究実績報告書

1. 線維芽細胞における TIMP-3 および TIMP-4 の発現に関する研究
2. 歯科衛生学科
3. 助教授 吉田直樹
4. 研究実績 別添のとおり

平成18年3月17日提出

# 線維芽細胞における TIMP-3 および TIMP-4 発現 に関する研究

吉田 直樹, 高林 ふみ代

## Expression of TIMP-3 and TIMP-4 by Fibroblasts

Naoki Yoshida Fumiyo Takabayashi

### 緒言

わが国の年齢別人口構成は、高齢社会の様相を呈するに至っている。高齢社会においては、高齢者のQOL（生活の質）の向上が重要であると考えられている。QOLの向上には、様々な要因が関与しているが、その一つとして、口腔の機能を健全な状態に保つことが必要と考えられている。口腔の機能が保たれることによって、日々の食事を楽しむことができる。更には、会話を行う、若々しい顔貌を保つ、といったことにも繋がる。

口腔の機能を健全に保つためには、健全な歯列を保持することが重要である。歯牙を失う、大きな原因として、歯周病とう蝕が挙げられる。歯周病の予防と治療の進歩は、歯牙の寿命を延ばすことに繋がる。

歯周病の中で、歯肉炎は、炎症が歯肉に留まり、歯周組織の破壊は、認められない。一方、歯周炎では、歯周組織の破壊が認められ、重度になると、歯牙を支持することができなくなるため、歯牙を抜歯せざるを得ない状態あるいは歯牙の自然脱落を招くこととなる。

歯周疾患の初発因子として重要であるのは、プラーク（歯垢）中の細菌である。種々の細菌の中で、関与が大きいのが、グラム陰性嫌気性桿菌である。その中でも、特に、近年、*Porphyromonas gingivalis*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Tannerella forsythensis*の3種類が注目されている。これらグラム陰性嫌気性桿菌の細胞壁の成分であるリポ多糖(LPS)等は、宿主のマクロファージを刺激する。

刺激を受けたマクロファージは、サイトカインの産生が高められる。産生されたサイトカインは、種々の細胞に働きかけ、様々な影響を及ぼす。

歯周組織中に存在する線維芽細胞は、様々なサイトカインの刺激によって、産生する

マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)の量が増加する。

歯周組織はコラーゲンを始めとする細胞外マトリックスから成り立っている。正常時においては、細胞外マトリックスは、MMPsの酵素作用による分解と、TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases)によるMMPsの酵素活性の阻害が厳密に調節され、正常な代謝が行われている。それに対して、歯周炎における歯周組織破壊の際には、両者のバランスが崩れ、分解の方に傾いてしまうことによると考えられている<sup>1)</sup>。

これまで、TIMPs は、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 および TIMP-4 の 4 種類が発見されている<sup>2)</sup>。

今回筆者は、TIMPs の中でも、線維芽細胞における発現が明らかにされていない、TIMP-3 および TIMP-4 に着目し、線維芽細胞におけるこの二種類の TIMPs の発現を調べることにした。

## 材料および方法

### 1. 細胞の培養

歯根膜由来線維芽細胞の採取は、智歯の歯根膜から、採取した。すなわち、智歯の抜歯の後、他の細胞（歯肉由来歯根膜細胞、上皮細胞等）が混入するのを避ける目的で、歯根の中央 1/3 の部分に付着している（歯冠側 1/3 および根尖側 1/3 は用いない）健全な歯根膜組織を、メスにて掻き取り、得られた組織を、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 回漱いだ後、組織の薄片を直径 35 mm 培養用皿に置きカバーグラスで被った<sup>3)</sup>。10%牛胎児血清を含む alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)を加え、5%炭酸ガス、95%大気、37°Cにて、培養した。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 10 代以内のものを使用した。

細胞は、継代をしていく際に、細胞を直径 10 cm 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、同組成の培養液で、更に 24 時間培養したものをを用いた。

### 2. 細胞の回収および RNA の抽出

単層の培養細胞に 1.5 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°C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°C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, 1mM EDTA (pH 8.0)}に溶解した。

### 3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA を 33  $\mu$ l の反応混合液 (amersham pharmacia biotech 社製, 0.2  $\mu$ g の Not I-d(T)<sub>18</sub> Primer と Murine Reverse Transcriptase を含む) 中で、逆転写を行い cDNA を作

成した。TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4 の、それぞれの cDNA の一部およびコントロールとして、 $\beta$ -actin の cDNA の一部を特異的な oligonucleotide primers 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°Cで1分間加熱した後、92°Cで40秒の熱変性、60°Cで40秒のアニーリング、75°C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。

### 結果および考察

目的遺伝子を増幅した産物の確認を、1.5%アガロース電気泳動で行った結果、増幅産物と思われるバンドが確認された。

コントロールとして用いた  $\beta$ -actin に比して、TIMP-1 は同程度以上、TIMP-2 および TIMP-3 は、低いレベル、TIMP-4 は極わずか、確認できた (図1)。



**1    2    3    4    5    6**

Lane 1: TIMP-1 mRNAの発現 (386 bp)

Lane 2: TIMP-2 mRNAの発現 (496 bp)

Lane 3: TIMP-3 mRNAの発現 (340 bp)

Lane 4: TIMP-4 mRNAの発現 (463 bp)

Lane 5:  $\beta$ -actin mRNAの発現 (202 bp)

Lane 6: Molecular weight standard

(50-2000 bp ladder)

図1. RT-PCR法による遺伝子発現の確認

歯根膜由来線維芽細胞における TIMP-1 および TIMP-2 の発現は、以前にも報告があるが<sup>4)</sup>、TIMP-3 および TIMP-4 に関しては、不明である。RT-PCR によって mRNA の発現が確認された TIMP-3 タンパク質が産生されているのか、興味深い。

健全な歯周組織においては、コラーゲンを始めとする、細胞外マトリックス成分構成タンパク質と共に、TIMP-1 の産生が、充分行われていると考えられている。一方、歯周炎による歯周組織破壊が起こっている組織においては、細胞外マトリックス成分構成タンパク質や TIMP-1 の産生に比して、MMPs の産生が過剰になっていると考えられている<sup>5)</sup>。

TIMP-1 のみならず、TIMP-2、TIMP-3 および TIMP-4 の産生が健全な歯周組織と歯周炎の組織で、違いがあるのかを知るために、まずは、今回用いたように細胞培養系において、詳細に検討することが必要である。

## 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) Visse, R & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.Circ. Res.92, 827-839, 2003.
- 3) 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.
- 4) Nomura, T., Takahashi, T. & Hara, K. Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA in human gingival tissue. J. Periodont. Res. 28, 354-362, 1993.
- 5) Page, R.C. The pathology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. Ann. Periodontol. 3, 108-120, 1998.