

# 培養歯根膜由来線維芽細胞による Stromelysin-1 発現に関する研究

吉田 直樹

## Expression of Stromelysin-1 in Cultured Periodontal Ligament Cells

YOSHIDA, Naoki

### 緒言

近年、我が国は、超高齢化社会に突入した。それに伴って、高齢者のQOLの向上が重要な課題としてとらえられている。QOLの向上において、口腔の機能を健全に保つことが重要であり、そのためには、健全な歯列を生涯保つということが、望まれる。

歯周疾患は、う蝕と共に、歯牙を失う、二大原因である。特に、中高年以降の者にとっては、歯周疾患による歯牙の喪失の割合が、増加する。よって、歯周疾患の予防および治療が適切に行われることが、健全な歯列を保つためには、重要である。

歯周疾患の最大の原因は、プラーク（歯垢）中の細菌である。種々の細菌の中でも、特に重要と考えられてきたのが、グラム陰性嫌気性桿菌であり、20年以上もの間、病原菌として研究されてきたが、近年、*Porphyromonas gingivalis*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Bacteroides forsythus*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)等が、宿主のマクロファージを刺激し、サイトカインの産生を高める。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。その一つとして、歯根膜由来線維芽細胞のマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)産生にも影響を及ぼす。

歯周炎に罹患すると、歯牙を支える歯周組織（歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質）が破壊される。歯周組織破壊には、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)が、重要な役割を演じている<sup>1), 2), 3)</sup>。Stromelysin-1は、MMPの分類では、MMP-3である。分解可能な基質が、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、III、IV、IX、X型コラーゲン等である。基質の種類が多いことは、MMP-3の特徴といえる。また、その活性は、他のMMPsと同様に、組織由来MMPs阻害物質(TIMPs)によって、精密に調節を受けている。

歯周炎における歯周組織破壊の機序に関して、MMPs と TIMPs のバランスが崩れる。すなわち、TIMPs に比して、MMPs の量が増加するために、分解系にかたよってしまうということが考えられている。

今回筆者は、培養歯根膜由来線維芽細胞の Stromelysin-1(MMP-3)の発現が、サイトカインによって、どのように影響を受けるかを検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞の採取

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、Somerman, M.J.ら<sup>4)</sup>の方法に従って行った。すなわち、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。

### 2. 細胞の培養

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、組織の小片を直径 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 ( $\alpha$ -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 3 から 9 代の細胞を使用した。

サイトカインの添加は、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、または、IL-1 $\beta$  (1.2 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°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。

### 4. 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。MMP-3 の cDNA の一部<sup>5)</sup> 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 (表 1) によって、プログラマブル・サーマル・コントロール(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。

表 1 . Primer Sequences Utilized for RT-PCR

Primer	Sequence (5' to 3')	Length of PCR Product (base pairs)
$\beta$ -actin		
Forward	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCTG	202
Reverse	GGAGCAATGATCTTGATCTTC	
MMP-3		
Forward	GTTAGGAGAAAGGACAGTGGTCCTG	405
Reverse	GGCATAGGCATGGGCCAAAACATT	

### 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、無刺激の場合に比して、IL-1 $\beta$  (1.2 ng/ ml) 刺激の条件下において、MMP-3 の発現量が増加していることが確認された。代表的な炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  によって、MMP-3 の発現が増加することは、炎症時における歯周組織破壊に MMP-3 が関与している可能性が考えられる。

MMP-1 は、歯周組織の主要な成分である I 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。MMP-1 は、IL-1 $\beta$  によって、発現が増加することが知られている<sup>5, 6)</sup>。

一方、MMP-3 は、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、III、IV、IX、X 型コラーゲン等の多種類の基質があることから、様々な歯周組織構成成分を分解できる可能性を持っていると考えられる。

歯根膜細胞の MMP-3 発現に関する研究としては、IL-1 $\beta$  と共に、代表的な炎症性サイトカインの一つである tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 刺激によって、発現が増加することが報告されている<sup>7)</sup>。また、basic fibroblast growth factor (bFGF) を培養細胞に添加する影響を調べた研究としては、bFGF の濃度依存的に MMP-3 の発現が増加することが報告されている<sup>8)</sup>。

炎症時に MMP-1 および MMP-3 が同時に発現の増加が認められることが、組織破壊において、重要である可能性がある。種々のサイトカイン添加に対する MMP-3 の発現の変化を、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

### 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) 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.
- 5) Richards, D. & Rutherford, R.B. Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. J. Periodont. Res., 25, 222-229, 1990.
- 6) Alvares, O., Klebe, R., Grant, G. & Cochran, D.L. Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. J. Periodontol., 66, 552-558, 1995.
- 7) Nishikawa, M., Yamaguchi, Y., Yoshitake, K. & Saeki, Y. Effects of TNF  $\alpha$  and prostaglandin E<sub>2</sub> on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J. Periodont. Res., 37, 167-176, 2002.
- 8) Shimazu, A. & Morishita, M. Basic fibroblast growth factor induces the expression of matrix metalloproteinase-3 in human periodontal ligament cells through the MEK2 mitogen-activated protein kinase pathway. J. Periodont. Res., 38, 122-129, 2003.