

平成18年度
研究実績報告書

1. 線維芽細胞のTIMPs発現における炎症性サイトカインの影響に関する研究
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19年4月27日提出

線維芽細胞の TIMPs 発現における炎症性サイトカインの影響 に関する研究

吉田 直樹, 高林 ふみ代

Effects of inflammatory cytokine on TIMPs expression by fibroblasts

Naoki Yoshida, Fumiyo Takabayashi

緒言

高齢社会においては、QOL（生活の質）の向上が望まれている。口腔の機能を良好な状態に保つことによって、食事を、口から美味しく食べることができる。また、会話を楽しむことにも、繋がる。口腔の機能を良好な状態に保つための要素の一つとして、健全な歯列を保つことが重要である。抜歯の二大原因は、齶蝕と歯周病であり、特に、中高年者においては、歯周病が、歯を失う原因の第一位となっている。

歯周病の予防と治療の更なる向上は、健全な歯列を保つことに繋がる。予防と治療の向上を実現させるには、病態の詳細な解明が不可欠である。歯周病は、歯周組織の炎症性疾患であり、大きく歯肉炎と歯周炎の二つに分類される。歯肉炎は、歯肉の発赤、腫脹を主な症状とし、炎症は、歯肉に限局しているため、歯周組織の破壊は認められないものである。一方、歯周炎は、炎症が歯肉に留まらず、歯根膜や歯槽骨といった、深部組織にまで波及し、歯周組織の破壊を来す。歯周炎が重度になると、歯の動揺が著しくなり、咀嚼生涯を引き起こし、歯の自然脱落や抜歯せざるを得ない状態となる。

歯周組織は、歯肉、歯根膜、セメント質、歯槽骨から成り立っている。その成分は、コラーゲンを始めとした、細胞外マトリックスタンパク質を主体に構成されている。細胞外マトリックスタンパク質は、正常時においては、線維芽細胞等による、タンパク質の合成と、細胞外マトリックスタンパク質を分解できる酵素であるmatrix metalloproteinases (MMPs)による、分解によって、代謝が行われている。また、MMPsは、その阻害物質であるtissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) によって、厳密に調節されている。歯周炎時における、歯周組織破壊は、MMPsとTIMPsのバランスが崩れて、MMPsの活性が過剰になっていると考えられる。TIMPsは、これまでに、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、

TIMP-4 の四種類が発見されている。中でも、TIMP-3、TIMP-4の歯周組織における動態は、不明な点が多い^{1),2),3)}。

そこで、筆者は、培養線維芽細胞のTIMP-3およびTIMP-4の発現を、代表的な炎症性サイトカインのひとつである tumor necrosis factor- α (TNF- α)の存在下および、非存在下の系において、検討することにした。

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ガラスで被った⁴⁾。10%牛胎児血清を含む alpha minimum essential medium (MEM)を加え、5%炭酸ガス、95%大気、37℃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、同組成の培養液にTNF- α (100 ng/ml)を含むもの、コントロールとして、TNF- α を含まない培養液を用いて、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℃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, 1mM EDTA (pH 8.0)}に溶解した。

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

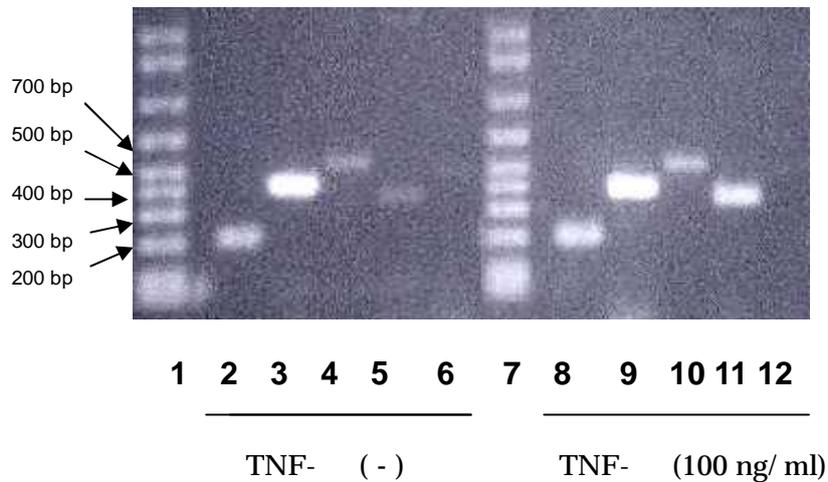
Total RNAを33 μ lの反応混合液(amersham pharmacia biotech社製, 0.2 μ gのNot I-d(T)₁₈ PrimerとMurine Reverse Transcriptaseを含む)中で、逆転写を行いcDNAを作成した。TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4の、それぞれのcDNAの一部およびコントロールとして、 β -actinのcDNAの一部を特異的なoligonucleotide primersによって、プログラマブル・サーマル・コントローラー(MJ RESEARCH, INC)を用いて増幅した。すなわち、94℃で1分間加熱した後、92℃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。

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。

TNF- α を添加していない群においては、コントロールとして用いた β -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。一方、TNF- α (100 ng/ml) を添加した群においては、添加していない群と比較して、TIMP-3 のバンドが増強されている結果が得られた (図 1)。



- Lane 1, 7 : Molecular weight standard (50-2000 bp ladder)
- Lane 2, 8 : β -actin mRNAの発現 (202 bp)
- Lane 3, 9 : TIMP-1 mRNAの発現 (386 bp)
- Lane 4, 10: TIMP-2 mRNAの発現 (496 bp)
- Lane 5, 11: TIMP-3 mRNAの発現 (340 bp)
- Lane 6, 12: TIMP-4 mRNAの発現 (463 bp)

図 1 . RT-PCR法による遺伝子発現の確認

線維芽細胞における TIMP-3 の発現が、TNF- α 存在下において増加している可能性が示された。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。今後、添加する TNF- α の濃度を変えることによる効果の違い、培養

時間における発現量の変化等、詳細な検討が必要である。

健全な歯周組織においては、恒常的に細胞外マトリックス成分を構成するタンパク質の代謝が行われている。つまり、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の産生と酵素による分解が厳密に調節されて、バランスが保たれている。分解の調節においては、内在的インヒビターである、TIMPs が関与している。

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 TIMPs の産生に比して、MMPs の産生が過剰になり、分解の方向に進んでいると考えられている^{5),6)}。

培養細胞を用いて、様々な状況下における、4種類の TIMPs の産生量の変化を調べることで歯周病の病態解明の一助になると考えられる。

文献

- 1) Verstappen, J. & Von den Hoff, J.W. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Their Biological Functions and Involvement in Oral Disease. *J. Dent. Res.*,85, 1074-1084,2006.
- 2) 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
- 3) Visse, R & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.*Circ. Res.*92, 827-839, 2003.
- 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) 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.
- 6) Page, R.C. The pathology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann. Periodontol.* 3, 108-120, 1998.