

静岡県立大学短期大学部

特別研究報告書（13・14年度） - 29

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（1）

吉田 直樹

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

YOSHIDA, Naoki

緒言

近年、我が国は、世界の最長寿国の一つとなった。我が国の平均寿命は、明治、大正時代には低い水準にあったが、戦後昭和20年代（1945～1954年）には著しい伸びがみられた。その後も、着実な伸びを示し、1984年には女性の平均寿命は、80年を超えた。そして、現在では、男女共に世界第1位になっている。それに伴い、我が国の人口構成における、高齢者の比率が高くなってきている。

高齢者における生活の質の向上（QOL）には、歯と口腔の健康の保持増進が関与している。生涯に渡って自分の歯で咀嚼し、食事を楽しんだり、良好な発語・発音を基礎とした楽しい会話を楽しんだり、若々しい顔貌を保つといったことを可能にするためには、健全な歯列を保つことが、重要である。

生涯に渡って健全な歯列を保つためには、歯牙の喪失原因を明らかにし、それを防止することが重要である。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、歯周疾患の病因解明は、重要である。

歯牙は、エナメル質、象牙質、セメント質、歯髓の四つの構成成分から成り立っている。咀嚼の際に、歯牙には大きな外力が加わる。それを支持する組織は、歯周組織と呼ば

れ、歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質の四つの組織から成り立っている。歯周組織は、細胞成分（線維芽細胞等）と細胞外マトリックスが主要な構成成分である。細胞外マトリックスは、コラーゲンに富んだタンパクから成り立っている。

歯周組織に生じる病気は歯周疾患とよばれる。歯周疾患のほとんどは、歯垢中の細菌が原因となって生じた炎症性疾患であり、大きく、歯肉炎と歯周炎に分類される。歯肉炎は、炎症が歯肉のみに限局している段階のものである。一方、歯周炎は、歯肉に初発した炎症が、歯根膜や歯槽骨などの深部組織にまでおよんだものであり、歯周組織が破壊される。歯周炎の進行が高度になってくると、歯牙の動揺が著しくなり十分な咀嚼機能が営めなくなる。ついには、抜歯せざるを得ない状態になったり、自然脱落する場合も見られる。

歯周炎におけ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)と呼ばれる酵素群が、重要な役割を演じていると考えられている^{1), 2), 3)}。本来、MMPs は、コラーゲンをはじめとした、結合組織成分のタンパクを分解する酵素であり、生理的な胚発生や、組織の再構築といった個体の正常な機能において重要な役割を担っている。そして、MMPs の活性は、活性の阻害物質である、tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)によって、精密に調節を受けている。

歯周炎や関節炎、悪性腫瘍の転移においては、MMPs と TIMPs のバランスが崩れてしまい、組織を過剰に分解する方向にかたよっ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ている。

歯周組織には、歯肉上皮細胞下の基底膜や、上皮下結合組織中の毛細血管壁基底膜に型コラーゲンが存在していることから、歯根膜細胞の産生するゼラチナーゼ群が、歯周炎における歯周組織破壊に関与する可能性が高いと考えられる。

そこで今回筆者は、培養歯根膜由来線維芽細胞をインターロイキン1 - (IL-1)で刺激することによって、ゼラチナーゼの産生にどのような影響を与えるかを検討する。

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。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 °C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. IL-1 の添加

細胞を直径 60 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、IL-1 (1.2 ng/ml)を添加し、24 時間培養した。

3. ゼラチンザイモグラフィー⁵⁾

ゼラチン分解活性を検討するために、最終濃度 0.8%のゼラチンを含む SDS ゲルを調整した。

被験サンプルは、無刺激および IL-1 刺激後の **conditioned medium** を SDS-PAGE サンプルバッファー（還元剤を含まないもの）と混合した。そして、電気泳動分析に供した。なお、サンプルは、泳動前に、加熱沸騰の処理は、行わなかった。

電気泳動は、室温下で行った。電気泳動の後、ゲルは、50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 2.5% Triton X-100(v/v), pH 7.6 の組成を有するバッファーで2回すすぎ、さらに、Triton X-100 を除いた同バッファーで、短時間（5分間）すすぎ、50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 1 mM aminophenylmercuric acetate(APMA), 1% Triton X-100, 0.02% NaN₃, pH 7.6 の組成を有するバッファー中で、37 °C、16 時間、インキュベーションを行った。インキュベーションの後、0.1% **Coomassie Brilliant Blue** を含む、50% **methanol**, 25% **acetic acid**(v/v)で染色し、30% **methanol**, 1% **formic acid**(v/v)で脱色した。ゼラチン分解活性の認められる範囲は、周囲が、青色に染色されているのに対し、部分的に染色がされていない事によって示された。

結果および考察

ゼラチンザイモグラフィーの結果、37 °C、16 時間のインキュベーションを行った後に、無刺激、IL-1 (1.2 ng/ml)刺激、のいずれにおいても、同一の分子量の位置にゼラチン分解活性が認められた。また、同酵素活性は、インキュベーション時に、20 mM EDTA を加えると、完全に消失したことから、酵素は、メタロプロテアーゼである可能性が示唆された。

今回の条件において、ゼラチン分解活性は、IL-1 刺激および無刺激の、いずれにおいても、**conditioned medium** 中に認められた。この結果は、ゼラチン分解活性を有する酵素が、歯根膜由来線維芽細胞によって細胞外に分泌されたことを示している。また、ゼラチン分解活性を示す分子量から、潜在型の MMP-2 は認められず、活性型 MMP-2 であると推測される。今後、ゼラチン分解酵素の発現に関して、更に調査する必要がある。

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) Hibbs, M.S., Hasty, K.A., Seyer, J.M., Kang, A.H., and Mainardi, C.L. Biochemical and Immunological Characterization of the Secreted Forms of Human Neutrophil Gelatinase. J. Biol.Chem., 260, 2493-2500, 1985.

(2003 年 3 月 20 日 受理)