

線維芽細胞の Matrix metalloproteinase-3,-10,-11 発現 に関する研究

吉田 直樹, 竹下 誠一郎, 高林 ふみ代

Expression of Matrix metalloproteinase-3,-10,-11 of Fibroblasts

Naoki Yoshida Seiichiro Takeshita Fumiyo Takabayashi

緒言

口腔の二大疾患として、う蝕と歯周疾患がある。両疾患は、歯を失う最大の原因となっている。特に、中高年以降では、歯周疾患による歯の喪失の割合が増大する。健全な歯列を長年にわたって維持するためには、歯周疾患の予防および治療は、重要なものの 1 つと考えられる。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る。近年、*Porphyromonas gingivalis*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Tannerella forsythensis* の 3 種類が特に注目されている。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)の量が変化する。

歯周疾患は、歯肉炎と歯周炎に大別される。歯肉炎は、炎症が歯肉に留まっており、組織の破壊は認められない。一方歯周炎は、炎症が深部歯周組織に波及し、組織の破壊が起こる。歯周組織は、歯牙を支持する組織である。歯周組織の破壊が進むと、歯の動揺が生じ、重度になると歯牙の保存が不可能になる。歯周組織破壊には、MMPs が、重要な役割を演じている^{1), 2), 3)}。MMPs は、ドメイン構造の類似性や、基質特異性から、1) コラゲナーゼ群、2) ゼラチナーゼ群、3) ストロメリシン群、4) 最小ドメイン、5) 膜結合型、6) その他の MMP の各群に小分類されている。

歯周組織を構成するタンパク質の中で、量的に最も多いのが線維形成コラーゲンであ

る（特にⅠ型コラーゲンとⅢ型コラーゲンが多い）。コラゲナーゼ群は、それらのコラーゲンを分解することができることから、歯周組織破壊における最も重要な酵素と見なされている。

ゼラチナーゼ群は、名前の由来通り、ゼラチン（変性したコラーゲン）を分解することができるが、更に、Ⅳ型（基底膜）コラーゲンを分解することができるという特徴を有する。

ストロメリシン群は、コラゲナーゼ群やゼラチナーゼ群の MMP と比べると、基質が、多岐にわたっていることが特徴であり、Stromelysin-1(MMP-3)、Stromelysin-2(MMP-10)、Stromelysin-3(MMP-11)の3つの酵素がある。ドメイン構造は、N末端からC末端へ、順番に、シグナルペプチド、プロペプチド、キャタリティックドメイン、リンカー、ヘモペキシン様ドメインとなっており、共通部分が多いのであるが、Stromelysin-3(MMP-11)だけが、プロペプチドのC末端に RX(K/R)R という配列を有し、細胞内で、フューリンによる活性化がなされるといった特徴がある⁴⁾。

ストロメリシン群の MMPs も、他の MMPs と同様に、組織由来 MMPs 阻害物質 (TIMPs)と、1 : 1 のモル比で、複合体を形成し、活性が阻害される。

このメカニズムによって、MMPs の活性は精密に調節を受け、結合組織（細胞外マトリックス）の turn over が調節されている。

歯周炎における歯周組織破壊は、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。

今回筆者らは、培養歯根膜由来線維芽細胞の MMP-3、MMP-10、および MMP-11 の発現を mRNA レベルで検討した。

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、智歯の抜歯の後、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 (α -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7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)を添加し、更に24時間培養した。

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 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。MMP-3、MMP-10、MMP-11 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°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

RT-PCR の結果、培養歯根膜線維芽細胞において、TNF- α (100 ng/ml)刺激の条件下において、MMP-3 および MMP-10 の mRNA が発現していることが確認された。一方、同一条件において、MMP-11 の mRNA の発現は、確認できなかった。

歯根膜細胞における MMP-3 の発現に関して、tumor necrosis factor- α (TNF- α)刺激によって、発現が増加することが報告されている⁵⁾。

さらに、今回、TNF- α 存在下で、MMP-10 の発現が mRNA レベルで確認された。今後、他のサイトカインによる発現への影響等、検討の余地がある。

今回の条件では、MMP-11 の mRNA の発現は、確認できなかったのであるが、歯根膜由来線維芽細胞では他のサイトカインの刺激によっても、MMP-11 が発現しないのか、あるいは、ある種のサイトカイン存在下や、ある条件下では、発現が誘導されるのかは不明である。

ストロメリシン群である、Stromelysin-1(MMP-3)、Stromelysin-2(MMP-10)、Stromelysin-3(MMP-11)は、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、等の様々な歯周組織の構成成分を分解することができる。線維形成コラーゲンを分解できる、コラゲナーゼ群の MMPs とは異なった、重要な役割を担っている可能性も考えられる。

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) Pei,D.& Weiss,S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.Nature,375,244-247, 1995.
- 5) Nishikawa, M.,Yamaguchi, Y.,Yoshitake,K. &Saeki,Y. Effects of TNF α and prostaglandin E₂ on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts.J. Periodont. Res.,37, 167-176, 2002.