

歯周組織由来線維芽細胞による Tissue Inhibitors of
Metalloproteinases 発現における
Transforming Growth Factor- 1
の影響について

吉田直樹

Effects of Transforming Growth Factor- 1 on Tissue Inhibitors of
Metalloproteinases expression by fibroblasts
derived from periodontal tissue.

Naoki Yoshida

緒言

わが国は、非常に急速に高齢社会を迎えた。わが静岡県においても同様の状況である。高齢社会においては、高齢者が、よりよい質の生活をおくれることが望まれている。そのためには、健康の増進、疾患の予防や治療の向上が不可欠である。

生活の質 (Quality of Life: QOL) の向上には、様々なことが関係しているが、口腔の機能を良好に保つことが重要なもののひとつとして考えられている。それによって、食べ物を美味しく食べることが可能になる。楽しく、会話することも可能になる。口腔の機能を保つためには、健全な歯列を保つことが望まれる。そのためには、歯牙を良好に保つことと同時に、歯周組織が健全であることが必要である。

歯周炎は、歯周組織を破壊する疾患であり、罹患率も高い。歯周炎の予防、治療のレベルが向上することは、ひいては、日本国民、静岡県民の健全な歯列を保つことに繋がる。

近年、歯周組織再生療法が、注目を浴びている。エナメルマトリックスタンパクや、線維芽細胞増殖因子を用いることによって、歯周組織の再生が可能であるという報告がなされている。

また、宿主の細胞が産生するサイトカインのひとつである、Transforming Growth Factor- (TGF-) は、コラーゲンの合成を高めることが知られており、歯周組織の再生において重要な役割を担っていると考えられている。

一方で、Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) は、歯周組織の成分を分解する

Matrix Metalloproteinases (MMPs) の活性を阻害することから、歯周組織の再生において、重要な役割を担っている可能性がある。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)}。

今回、われわれは、TGF- β が、歯周組織由来線維芽細胞が産生する TIMP-3 の量に、いかなる影響を与えているかを解析することを試みた。

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、組織の小片を直径 35 mm 培養用皿に置きカバーグラスで被った³⁾。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℃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 6 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 TGF- β 1 (5 ng/ml) を含むものを、コントロールとして、TGF- β 1 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

単層の培養細胞から、NucleoSpinTM RNA/Protein (MACHERY-NAGEL 社)を用いて、マニュアル通りに、細胞の回収および RNA の抽出を行った。すなわち、培養上清を吸引除去した後、リン酸緩衝液にて 1 回洗浄した後に cell lysis を行い、lysate を濾過、70% エタノールで洗浄し、RNA 結合カラムにアプライし、結合させた。脱塩の後、DNase によって、DNA を消化し、その後、DNase の不活性化を行った。洗浄を行った後、TE {10 mM Tris-HCl , 1mM EDTA (pH8.0) }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-3 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。

4 . Cell lysate のタンパク質の分離と精製

NucleoSpinTM RNA/Protein (MACHEREY-NAGEL 社)による、細胞の回収および RNA の抽出を行った過程において、RNA 結合カラムを素通りした画分を回収して、マニュアル通りに、タンパク質の分離と精製を行った。

5 . ウェスタンブロット解析

Cell lysate から分離、精製したタンパク質を還元剤を含んだ Protein Loading Buffer に溶解し、10 % SDS-PAGE (100 V 定電圧)を行った。ゲルに含まれるタンパク質を Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad 社製) Transfer Buffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20 % Methanol, 1.3 mM SDS, pH 9.2) を用いて、12 V 定電圧 20 分間の条件で、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社製) に転写した。その後、非特異的な結合をブロックするために、BSA blocking 溶液 (2 % bovine serum albumin in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.02 % NaN₃) を用いて、1 時間、室温においてインキュベートした。その後、TTBS buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.02 % NaN₃, 0.05 % (v/v) Tween 20] で、3 回洗浄し、続いて、その膜を、一次抗体と、室温でオーバーナイト、インキュベートした。今回一次抗体として、抗 TIMP-3 ラビット・ポリクローナル抗体 (1 µg/ml) (BIOMOL 社) および、コントロールとしての抗 β -Actin ラビット・ポリクローナル抗体 (1 µg/ml) (AnaSpec 社) を用いた。TTBS buffer で、2 回洗浄した後、二次抗体 (アルカリホスファターゼ標識抗ラビット IgG ヤギ抗体 : BioRad 社) と室温で 1 時間、インキュベートした。膜は、Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad 社) を用い、マニュアルに従って、発色を行った。

結果および考察

RT-PCR を行って得られた、TIMP-3 の cDNA の一部 (340 bp) を増幅した産物は、1.5%アガロース電気泳動によって、340 bp 付近のバンドとして確認された。

TGF- β 1 を添加した群と、添加していない群において、同程度濃度のバンドが観察された。

Cell lysate から得られたタンパク質に含まれている、TIMP-3 のタンパク質を、ウェスタンブロット分析を行った結果、TGF- β 1 を添加した群と、添加していない群のいずれにおいても、分子量が約 30 kDa の付近に、バンドが観察された。TGF- β 1 を添加した群の方が、添加していない群に比して、濃いバンドであった。

今回の結果から、歯根膜由来線維芽細胞が、無刺激および、TGF- β 1 添加のいずれの条件においても、TIMP-3 を発現していることが、mRNA レベルおよび、タンパク質レベルで確認された。

歯根膜由来線維芽細胞が、タンパク質レベルで、TIMP-3 を産生していることが、確認できたことから、MMPs の活性の調節において、TIMP-1 と TIMP-2 に加えて、TIMP-3 も、その役割を果たしている可能性があることが考えられる。

TGF- β 1 の TIMP-3 の発現量に対する影響に関して、mRNA レベルでは、差が認められなかったのに対して、タンパク質レベルでは、TGF- β 1 を添加した群の方が、添加していない群に比して、多いと思われた。mRNA レベルとタンパク質レベルにおける、差異が生じた原因に関して、今後、詳細に検討する必要がある。

TIMP-3 の役割が、重要であることが報告されている分野がある⁴⁾が、歯周組織における役割は、現時点では明確にされていない。

TIMP-3 の歯周組織における、特異的な役割を検索するとともに、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 全ての発現を総合的に解析することが、MMPs の活性調節を明らかにしていく上で必要であると考えられる。

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) 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) Weber, B. H. F., Vogt, G., Pruett, R. C., Stohr, H. & Felbor, U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nature Genet.* 8, 352-356, 1994.