

氏名	成石浩司
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1716 号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	線維芽細胞における IL-6 の刺激伝達
論文審査委員	教授 滝川正春 教授 福井一博 教授 村山洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周炎は口腔内細菌の歯周ポケットへの感染により発症する炎症性疾患であり、歯周炎組織では線維芽細胞や浸潤した様々な炎症性細胞が産生するサイトカインが複雑にネットワークを形成している。したがって、その場合は結合組織に炎症が波及したときのサイトカインネットワークを解明するための格好のモデルとなる。歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞は、歯周炎の場合において、様々なサイトカインの標的細胞になるとともに、自ら様々なサイトカインを産生し、サイトカインネットワークの形成を担う役も演じている。

IL-6は、破骨細胞を活性化したり、B細胞を形質細胞へ分化するなどの作用をもつサイトカインである。最近、歯周炎組織にIL-6が高濃度に存在すること、さらに歯肉線維芽細胞がIL-6の産生細胞であることが報告され、IL-6が歯周炎の場で果たす役割が注目される。しかし、IL-6の歯肉線維芽細胞に対する作用についての報告は少なくあまりわかっていない。IL-6の刺激伝達系は、IL-6が細胞膜上のレセプター(IL-6R)と結合した後、その刺激伝達分子である膜上の糖蛋白gp130と会合し、それがチロシンリン酸化することから始まる。細胞内の刺激伝達系は肝細胞やリンパ球で知られ、細胞質内蛋白Stat3がリン酸化されて核へ移行する系と細胞質内蛋白RasやMAPキナーゼが順に活性化した後、核内蛋白C/EBPβが活性化する系があり、それは可溶性のIL-6(sIL-6R)によって促進される。

本研究では、歯周炎の場合において、歯肉線維芽細胞がIL-6の標的細胞になり得るかどうか、もしなり得るのなら、どのような刺激伝達系が存在するのかを探ることを目的にした。

【材料および方法】

1. 供試細胞および培養

歯肉線維芽細胞は、Nishimuraらの記載に従い、炎症のないヒトの辺縁歯肉から分離・培養した紡錘状の形態を呈する細胞とした。培養は、ウシ胎児血清を10%の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用い、5%炭酸ガス存在下、37°Cで行った。

2. IL-6Rおよびgp130 mRNAの検出

IL-6Rおよびgp130 mRNAは、コンフルエントになるまで培養した細胞から回収した全RNAからoligo-(dT)₁₂₋₁₈プライマーを用いて抽出した。検出は、得られたmRNAをもとに作製したcDNAを用いてPCR法で増幅した遺伝子をアガロースゲル電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色して行った。

3. IL-6の細胞への結合

IL-6の細胞への結合性は、コンフルエントになるまで培養した細胞に¹²⁵I標識IL-6(Amersham)を作用させたときの特異的結合によって放出される放射活性で表した。また、その特異的結合は¹²⁵I標識IL-6の150倍濃度の未標識IL-6を競合させ、その結合性の競合

の程度によって判定した。次に、IL-6 の細胞への結合に果たす sIL-6R の役割は、sIL-6R (R&D) 存在下での ¹²⁵I 標識 IL-6 の細胞への結合性の程度で判定した。また IL-6 の細胞への結合に果たす gp130 の役割は、¹²⁵I 標識 IL-6 の細胞への結合に及ぼす抗 gp130 抗体 (R&D) の結合性阻害の程度で判定した。この系の sIL-6R の濃度は、100 ng/ml とした。尚、¹²⁵I 標識 IL-6 の細胞への特異的結合によって放出される放射活性は、γ 線カウンターを用いて測定した。

4. 歯肉組織の sIL-6R 量の測定

sIL-6R 量は、Quantikine™ Human IL-6 sR Immunoassay kit (R&D) を用いて測定した。歯肉組織のサンプルは、成人性歯周炎患者の初期治療を行っていない 5mm 以上の歯周ポケットから外科的に切除した組織片を、メス刃で細切し、遠心した後の上清を用いた。

5. チロシンリン酸化蛋白の検出および同定

チロシンリン酸化蛋白は、sIL-6R 存在下および非存在下において IL-6 で刺激した細胞の全蛋白を SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜 (Millipore) に転写した後、抗ホスホチロシン抗体 (TDL) で免疫プロットして検出した。尚、検出は ECL 蛍光システム (Amersham) を用いて行った。全蛋白は、刺激した細胞を細胞溶解液で可溶化し遠心した後の上清として回収した。リン酸化蛋白の同定は、抗 gp130 抗体と抗 Stat3 抗体 (TDL) を用いてリプロービングし、同様に ECL 蛍光システムを用いて行った。

6. 核内の Stat3 および C/EBPβ の検出

核内の Stat3 および C/EBPβ は、細胞を sIL-6R 存在下および非存在下において IL-6 で刺激した後、核抽出物を調製し、Stat3 および C/EBPβ が結合する特定遺伝子の塩基配列をプローブとしてゲルシフトアッセイを行い、オートラジオグラフィで検出した。

7. 歯肉線維芽細胞の形態的観察

細胞を sIL-6R 存在下および非存在下において IL-6 で刺激し、24 時間後の形態変化を位相差顕微鏡で観察した。

【結果】

1. IL-6R および gp130 の発現

歯肉線維芽細胞における IL-6R mRNA は、2 回の PCR で、gp130 mRNA は、1 回の PCR で検出できた。また歯肉線維芽細胞への ¹²⁵I 標識 IL-6 の結合量は、150 倍濃度の未標識 IL-6 と競合させても差がなかった。

2. 歯周炎組織における sIL-6R

歯周炎組織の sIL-6R 濃度は、同被験者の血清に含まれる量の約 5 倍以上であった。

3. IL-6 の細胞への結合に及ぼす sIL-6R および gp130 の影響

細胞に結合した ¹²⁵I 標識 IL-6 の量は、sIL-6R の濃度依存的に増加し、抗 gp130 抗体の濃度依存的に減少した。

4. IL-6 刺激による細胞の形態変化

sIL-6R 存在下での IL-6 刺激後、24 時間で細胞の形態が紡錘状から球状に変化した。

5. 細胞内蛋白のチロシンリン酸化

sIL-6R 存在下での IL-6 刺激時に、分子量 130kDa および 92kDa の細胞内蛋白のチロシン残基がリン酸化された。これらの蛋白は、それぞれ gp130 および Stat3 であると同定した。

6. 核内の Stat3 および C/EBPβ の活性化

sIL-6R 存在下での IL-6 刺激時に、核内蛋白にそれぞれ特定の塩基配列を持つプローブと結合した Stat3 および C/EBPβ を検出した。

【考察および結論】

歯肉線維芽細胞は、膜上に IL-6R をほとんど発現していないため、IL-6 単独では作用を受けない細胞であるが、sIL-6R の存在下において、IL-6 の刺激が細胞内に伝達された。

論文審査結果の要旨

本研究は、歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞における IL-6 の刺激伝達系を調べたものである。

研究の流れの概略は次の通りである：

- 1) 歯肉線維芽細胞における細胞膜上の IL-6R の発現
- 2) 歯周炎組織における sIL-6R の存在
- 3) 歯肉線維芽細胞への sIL-6R を介した IL-6 の結合
- 4) 歯肉線維芽細胞における sIL-6R を介した IL-6 の細胞内刺激伝達系

論文には次の知見が記されている：

- 1) 歯肉線維芽細胞は、mRNA レベルでは IL-6R をほとんど発現していない。
- 2) 歯周炎組織に sIL-6R が存在する。
- 3) 歯肉線維芽細胞への IL-6 の刺激伝達は、IL-6 が sIL-6R を介して膜上の gp130 に会合することによって始まる。
- 4) sIL-6R を介した IL-6 の刺激によって、歯肉線維芽細胞の細胞質内蛋白の gp130 および Stat3 がチロシンリン酸化し、さらに核内蛋白の Stat3 および C/EBP β の発現が促進する。

これらの知見は、歯肉線維芽細胞の膜上に IL-6R が存在しなくても、同細胞は sIL-6R 存在下では IL-6 の標的細胞になり得ることを示している。

本研究は、歯周炎組織における歯肉線維芽細胞が組織構築細胞としてだけでなく、IL-6 をとりまくサイトカインネットワークを構成する細胞としての役割をも果たしていることを示唆するものとして価値のある業績である。

したがって、本申請論文は学位論文として価値があるものと認める。