

氏名	大江 丙 午
授与した学位	博 士 学
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 乙 第 3573 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Induced and Interleukin-1 β (IL-1 β)-Induced Shedding of TNF Receptors from Gingival Fibroblasts 腫瘍壊死因子- α (TNF- α)およびインターロイキン-1 β (IL-1 β)によって産生が誘導される歯肉線維芽細胞由来の可溶性TNF受容体
論文審査委員	教授 福井 一博 教授 滝川 正春 教授 村山 洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯肉線維芽細胞 (HGF) は、歯周炎局所で産生が亢進する炎症性サイトカインに囲まれており、局所で産生されるサイトカインの標的となる。これらのサイトカインのうち TNF- α は、膜結合型 TNF 受容体 (TNFR) を介して標的細胞を刺激する。この受容体には、分子量の異なる 2 つのタイプ、すなわち TNFR55 および TNFR75 が存在する。TNFR55 は、細胞死の一型であるアポトーシスや転写制御因子である NF- κ B の誘導に代表される TNF- α がもたらす細胞刺激の大部分に関係する。一方、TNFR75 は TNFR55 が伝達する刺激の一部を担うことが知られている。また、滑膜線維芽細胞などの一部の細胞においては、TNFR を自ら切り離して可溶性 TNF 受容体 (sTNFR)、すなわち sTNFR55 および sTNFR75 を産生することが知られている。この sTNFR が TNF- α のアンタゴニストとして作用して TNF- α の作用を調節することも、近年に明らかとなった。このような背景から、細菌感染が持続する歯周組織において、HGF は TNF- α の標的細胞となり続けるだけでなく TNFR の発現を変化させて TNF- α の刺激を自ら調節することによって、歯周組織のホメオスタシスは維持されると考えられる。

本研究は、歯周組織のサイトカイン・ネットワークにおける HGF の役割を理解するために、炎症性サイトカインの刺激下における HGF が TNFR を発現する様態について TNFR の経時的な変化を調べて、歯周炎組織における TNF- α が関与する炎症反応への HGF の関わりを考察するものである。

【材料および方法】

1. 細胞とその培養： HGF は、全身的ならびに局所的に健康なボランティアの辺縁歯肉から紡錘形を呈する細胞を、Nishimura らの記載 (1996) に従って分離・培養した。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) を用いて、5% 炭酸ガス存在下で、37°C で行った。尚、実験には 5~8 継代した細胞を供した。
2. 炎症性サイトカイン： 組み換えヒト TNF- α および組み換えヒト IL-1 β (R&D systems) を用いた。
3. 免疫染色： 免疫染色は、VECTASTAIN[®] Elite ABC キット (Vector Laboratories) を用いた免疫ペルオキシダーゼ法によって行った。すなわち、中性緩衝 10% ホルマリン固定した培養 HGF を、一次抗体に抗ヒト TNFR55 および TNFR75 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を、二次抗体に抗ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を用いて染色した。尚、陰性対照には、一次抗体の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた。

4. TNFR mRNA の検出： TNFR mRNA は、逆転写-ポリメラーゼチェーンリアクション (RT-PCR) 法によって検出した[®]。すなわち、TNF- α あるいは IL-1 β を含む DMEM で 0~24 時間培養した HGF から TRIZOL RNA 分離キット (GIBCO) を用いて得た mRNA 画分から、RT-PCR 法によって増幅した cDNA を、2%アガロース電気泳動によって分離した後、0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色して検出した。
5. 細胞への TNF- α 結合量： HGF に対する TNF- α の結合量の測定は、Scheurich らの方法 (1986) を応用して行った。すなわち、HGF を TNF- α あるいは IL-1 β を含む DMEM で 24 時間培養した後、1%ウシ血清アルブミン V (Sigma) 含有 DMEM に^[125I] 標識ヒト組み換え TNF- α (Amersham, 0.01~100 ng/ml) を加えて、4°C で 2 時間培養し、非結合^[125I]TNF- α を洗浄除去後、2M NaOH で細胞を可溶化した画分の^[125I]TNF- α の量を γ カウンターで測定し、細胞に結合した^[125I]TNF- α 量を算出した。
6. sTNFR 産生量： HGF 培養上清の sTNFR55 および sTNFR75 量を Human sTNFR Immunoassay (R&D Systems) を用いたサンドイッチ ELISA 法によって測定し、それを sTNFR 産生量とした。すなわち、TNF- α あるいは IL-1 β を含む DMEM で HGF を 2~72 時間培養した後、各々の細胞培養上清の sTNFR55 および sTNFR75 の蛋白を定量した。

【結果】

1. TNFR の発現様態： TNF- α あるいは IL-1 β で刺激した HGF は、2 時間以内に TNFR75 mRNA の発現が誘導された。しかし、無刺激の HGF は、TNFR75 の mRNA および蛋白をほとんど発現しなかった。一方、無刺激の HGF は、TNFR55 の蛋白を高いレベルで発現した。HGF は、これらのサイトカイン刺激とは関係なく TNFR55 mRNA を恒常的に発現した。
2. TNF- α および IL-1 β の^[125I]TNF- α 結合への影響： HGF は、TNF- α あるいは IL-1 β 刺激によって^[125I]TNF- α との結合を有意に減少させた。
3. sTNFR の産生様態： TNF- α あるいは IL-1 β で刺激した HGF は、sTNFR75 の産生量を 24~72 時間後まで経時的に増加させた。72 時間刺激後の HGF は、著明に sTNFR75 を産生した ($p < 0.0001$; Student's *t*-test)。さらに、これらのサイトカインを同時に刺激した HGF は、sTNFR75 を相乗的に産生した ($p < 0.0001$; Student's *t*-test)。一方、HGF は、TNF- α あるいは IL-1 β で 72 時間刺激を行っても sTNFR55 の産生量を増加させなかった。

【考察】

本研究結果を、次のようにまとめた： 1) TNFR75 は、TNF- α あるいは IL-1 β 刺激によってその発現を亢進する； 2) sTNFR75 は、TNF- α あるいは IL-1 β 刺激によってその産生を促進し、IL-1 β 刺激ではその産生量が著明である。

したがって、HGF は、sTNFR を産生して TNF- α の刺激を調節しようとするが、炎症性サイトカインの刺激、とりわけ IL-1 β の刺激が持続すると TNFR75 の発現を強く誘導するとともに sTNFR75 を著明に産生する特徴を持つことが示唆された。

歯周炎局所における HGF が選択的に TNFR75 の発現を亢進し、sTNFR75 の産生を促進して TNF- α の刺激を減弱させる機作は、歯周組織の炎症反応の制御に関与するものと考えられる。

論文審査結果の要旨

ヒト歯肉線維芽細胞は、歯肉結合組織の主要な構成細胞としての役割だけでなく、歯周炎局所における免疫担当細胞としての役割も注目されている。なかでも、炎症性サイトカイン TNF- α の関わりが、最もよく研究されている。しかし、歯肉線維芽細胞がどのようにして TNF- α の刺激を受け、そしてどのようにその刺激が調節されているかの機序の全容は明らかでない。とりわけ、TNF 受容体(TNFR)を介する刺激伝達系の解明は、焦点の研究課題となっている。

本研究は、歯周病の発症と進行におけるサイトカインネットワークにおいて、TNF- α が関与する炎症反応に対して歯肉線維芽細胞の TNFR の発現がどのように関わるかを検討することを目的としている。すなわち、炎症性サイトカインの刺激下における歯肉線維芽細胞が TNFR を発現する様態を TNFR の経時的な変化から調べ、炎症反応への歯肉線維芽細胞の関わりを考察している。本研究結果では、歯肉線維芽細胞は、炎症性サイトカインである TNF- α やインターロイキン-1 β の刺激が持続すると膜結合型 TNFR75 の発現を強く誘導するが、同時にアンタゴニストとして作用する可溶性 TNFR75 を著明に産生することによって TNF- α の刺激を減弱する細胞であることを明らかにした。この事実は、炎症条件下における歯肉線維芽細胞が産生する可溶性 TNFR75 を介する炎症発現と制御の機序を示唆するので、歯周炎を調節する治療法の展開に貢献できるものと評価する。

従って、本申請論文は学位論文の価値があると認めた。