

氏 名 (本籍)	西 川 正 典 (京都府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第382号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成13年6月6日
学位論文題目	Effects of TNF α and Prostaglandin E ₂ on the Expression of MMPs in Human Periodontal Ligament Fibroblasts (ヒト歯根膜線維芽細胞におけるMMPs遺伝子発現に対するTNF α およ びプロスタグランディンE ₂ の影響)

審査委員	主査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	佐 伯 行 一
	副査 教授	吉 武 一 貞

論文内容の要旨

【目 的】

歯周病は、歯と歯槽骨の間で咬合圧の緩衝能をもつ歯根膜が破壊され進行する生活習慣病である。歯周病の発症と進展には、炎症性サイトカインの一つであるTNF α が深く関わっているとされている。しかしながら、TNF α が歯周組織の破壊に関与する機序については明らかになっていない。歯根膜はcollagen等の細胞外マトリックスに富んだ組織であり、その破壊には細胞外マトリックスを分解する酵素であるmatrix metalloproteinases (MMPs) が深く関与しているものと考えられる。本研究では、歯根膜の主要構成細胞であるヒト歯根膜線維芽細胞 (human periodontal ligament fibroblasts : PDL fibroblasts) を用い、PDL fibroblastsにおけるMMPs遺伝子のmRNAへの発現、ならびに酵素タンパク質発現に及ぼすTNF α の影響を検討した。

【方 法】

歯科矯正のため抜歯を行った第三大臼歯の歯根表面より、患者の同意を得たうえで歯根膜組織を採取し、explant法にてPDL fibroblastsの培養を行った。この培養系にTNF α を添加し、RT-PCR法にて、MMPs (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-13、MT (membrane type)-1 MMP、MT-2 MMP、MT-3 MMP) のmRNAの発現を調べた。TNF α はcyclooxygenase-2 (COX-2) のmRNAの発現を増強し、prostaglandinの産生を亢進させることが知られている。このTNF α によるMMPsの遺伝子発現へのprostaglandinの関与の有無についてもCOX-2の特異的インヒビターであるNS-398を用いて検討した。また、prostaglandinはcAMPを介して細胞内シグナル伝達をすることが知られているため、PDL fibroblastsにおけるprostaglandinの作用がcAMPを介しているか否かについてもdibutyryl cyclic AMPを用いて検討を行った。タンパク質発現についてはWestern blotting、及びzymography (collagen type II, gelatin) の手法で検討した。

【結 果】

TNF α 非刺激時、PDL fibroblastsは、MMP-2、MT-1 MMP、MT-3 MMPのmRNAを強く発現し、MMP-1、MMP-3、MMP-13のmRNAも弱いながら発現していた。MMP-8、MMP-9、MT-2 MMPのmRNAは検出されなかった。TNF α の添加によりMMP-1、MMP-3、MMP-13のmRNAの発現は、用量依存的 (100pg/ml-10ng/ml)、時間依存的 (3h-24h) に増強が認められた。内因性のCOX-2の酵素活性を阻害する目的でNS-398 (1 μ M) による前処理後、TNF α を添加した実験ではMMP-1、MMP-3のmRNAの発現は前処理なしの群と有意差は認められなかったが、MMP-13のmRNAの発現は前処理無しの群より約1.6倍増強した。また、TNF α とともにprostaglandinE₂ (1 μ M) を添加すると、TNF α によるMMP-13のmRNA発現の増強が阻害された。dibutyryl cyclic AMP (1mM) の添加によってもprostaglandin E₂と同様の効果が認めら

れた。MMP-13の遺伝子発現に対するこれらの効果はWestern blotting、並びにzymography (collagen type II、gelatin)によって酵素タンパク質レベルでも確認された。

【考 察】

PDL fibroblastsにおいて、TNF α の刺激によりMMP-1、MMP-3、MMP-13のmRNAの発現が増強された。MMP-1、MMP-3の発現がinterleukin-1によって増強される事がすでに報告されているが、PDL fibroblastsにおいてMMP-13のmRNAの発現と炎症性サイトカイン刺激によるMMP-13遺伝子発現の増強を確認したのは本研究が初めてである。MMP-13は軟骨の主成分であるtype II collagenの分解活性が強いため、MMP-13についての研究のほとんどは軟骨疾患に関するものであり、歯周病との関連については現在まであまり注目されていなかった。本研究において歯周病の進行に関与するとされているTNF α の刺激によってMMP-13のmRNAおよびタンパク質発現の増強が認められた事から、歯周病にMMP-13が深く関わっているものと推測される。また、TNF α によるMMP-13のmRNA及びタンパク質発現の増強が内因性のprostaglandinによって阻害されることより、prostaglandinはPDL fibroblastsのMMP-13の発現においてネガティブフィードバック機構を持つことが明らかとなった。

【結 論】

歯周病患者の歯肉溝浸出液に見いだされるTNF α はPDL fibroblastsのMMP-1、MMP-3、MMP-13のmRNAの発現を増強させた。また、TNF α によって産生が亢進した内因性のprostaglandinはTNF α によるMMP-13の遺伝子発現の増強を阻害し、このprostaglandinの作用はcAMP依存性であった。なお、このprostaglandinの作用はMMP-1、MMP-3では認められなかった。

論文審査の結果の要旨

歯周病の発症と進展には、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNF α)と細胞外マトリックス分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)が関与するとされている。

本研究は、ヒト歯根膜線維芽細胞においてTNF α がMMPの発現に対してどのような影響を及ぼすかを検討したものである。その結果、次のことを明らかにした。1) TNF α は歯根膜線維芽細胞のMMP-1、MMP-3、MMP-13のmRNAの発現を増強する。2) 内因性のプロスタグランジンE₂はTNF α によるMMP-13の遺伝子発現の増強を阻害する。3) プロスタグランジンの作用はcAMP依存性である。

この成果は、歯周病の病態、特に歯根膜破壊の機序を明らかにしたものであり、また治療法としてMMP抑制の可能性を示唆したものである。よって、本論文は博士(医学)の学位論文に値する。

なお、本学位授与申請者は、平成13年5月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。