

氏名	滝川 雅之		
学位(専攻分野)	博士(歯学)		
学位授与番号	博甲第 1006 号		
学位授与の日付	平成 4 年 3 月 28 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)		
学位論文題目	ヒト歯肉線維芽細胞が産生するインターロイキン 6 に関する研究		
論文審査委員	教授 村山 洋二	教授 加藤慶二郎	教授 谷口 茂彦

学位論文内容の要旨

【研究目的】

インターロイキン (IL) 6 は、B リンパ球の抗体産生細胞への分化、あるいは T リンパ球の増殖や細胞傷害性 T 細胞への分化を促進し、さらに骨代謝を誘導するサイトカインとして歯周病との関連が注目される。

歯周組織を構成する線維芽細胞は、免疫担当細胞として抗原提示能や各種サイトカイン産生能を有することが報告され、炎症反応の調節にあずかるとされている。しかし、歯肉線維芽細胞が産生する IL-6 が、歯周病の発症と進行にどのように関わっているかはわかっていない。

本研究は、歯肉線維芽細胞が歯周病のサイトカインネットワークにおいて IL-6 産生を介し果たす役割を評価することを目的に、1) 培養歯肉線維芽細胞における IL-6 産生の動態を IL-6 mRNA および IL-6 活性の発現段階から、2) IL-6 産生の調節機構を細胞自らが産生するプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を介するフィードバック制御および IL-6 自身の線維芽細胞の代謝機能に及ぼす影響から調べ、そして、3) 炎症歯肉における線維芽細胞の IL-6 産生の様態を調べることによって検討しようとするものである。

【研究方法】

1. 線維芽細胞および培養

健常者の辺縁歯肉から分離したヒト歯肉由来線維芽細胞を用いた。分離細胞はウシ胎児血清を 5% の割合に含むダルベッコ変法イーグル培地を用い、5% 炭酸ガス存在下、37℃ で単層を形成するまで培養して実験に供した。

2. 刺激因子

Recombinant human (rh) IL-1 β , rh tumor necrosis factor α (TNF α), (R&D

System Inc.), rhIL-6 (大阪大学医学部第三内科, 岸本忠三博士からの恵与), および PGE₂ (小野薬品工業) を用いた。

3. mRNAの検出

IL-6およびIL-6レセプター (IL-6R) mRNAは, 線維芽細胞から抽出した全RNAから reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって得た増幅DNAを電気泳動し, エチジウムブロマイド (Sigma) で染色して検出した。なお, mRNA量はDNAを増幅する際に加えた [α ³²P] dCTPの取り込み量をもって表した。

4. IL-6活性の測定

線維芽細胞の培養上清のIL-6活性の測定は, IL-6依存性マウスハイブリドーマである MH60.BSF 2 細胞 (岸本忠三博士からの恵与) を用いたバイオアッセイによって行った。

5. PGE₂の定量

線維芽細胞の培養上清に含まれるPGE₂定量は, ProstaglandinE₂ [¹²⁵I] assay system (Amersham) を用いて行った。

6. DNA合成能およびコラーゲン合成能の測定

DNA合成能は線維芽細胞の培養系に添加した [³H] -チミジンの細胞内への取り込み量を, そして, コラーゲン合成能は添加した [³H] -プロリンのコラゲナーゼ消化性蛋白への取り込み量をもって表した。

7. 免疫組織学的検出

IL-6陽性細胞の検出は歯周外科時に得た歯肉の凍結切片を, 抗IL-6抗体 (α BSF2.60) を用いた。avidin-biotin-peroxidase complex法によって免疫染色して行った。

【研究結果】

1. IL-1 β あるいはTNF α 刺激によってIL-6産生の動態

培養歯肉線維芽細胞はIL-1 β あるいはTNF α の刺激によってIL-6mRNAを発現した。培養上清のIL-6活性はIL-6mRNAの発現より遅れて示され, 24時間後まで上昇した。IL-6mRNAの発現量およびIL-6活性は刺激サイトカインの濃度に依存して上昇した。IL-1 β あるいはTNF α で刺激しない対照系においてもIL-6mRNAの発現を認めたが, 培養上清のIL-6活性は検出できなかった。

2. PGE₂によるIL-6産生調節機構の検討

IL-1 β 刺激によって線維芽細胞が産生するIL-6の活性は, インドメサシンを作用させることによって上昇したが, IL-6mRNAの発現は上昇しなかった。なお, IL-1 β 刺激時の線維芽細胞の培養系にPGE₂を添加しても, IL-6mRNA発現量は影響を受け難かった。

3. IL-6の線維芽細胞の代謝機能に及ぼす影響

IL-6は歯肉線維芽細胞のDNA合成能, コラーゲン合成能およびPGE₂産生能に影響を及ぼさなかった。

4. 線維芽細胞におけるIL-6RのmRNA発現の検討

培養歯肉線維芽細胞はIL-6RのmRNAを発現しなかった。また, IL-1 β , TNF α

あるいはIL-6で線維芽細胞を刺激した場合においてもIL-6RのmRNAの発現はなかった。

5. 歯肉におけるIL-6陽性細胞の局在

炎症歯肉におけるIL-6陽性細胞は、線維芽細胞、血管内皮細胞、およびマクロファージであった。IL-6陽性の線維芽細胞は炎症性細胞浸潤が著明な部位に多く認められた。

【考察および結論】

歯肉線維芽細胞はIL-1 β あるいはTNF α の刺激を受け、IL-6mRNAを発現し細胞外にIL-6を産生するが、その様態は細胞自身が産生するPGE₂によって影響を受けることが示された。なお、PGE₂によるフィードバック制御は、PGE₂がIL-6mRNAの発現に影響し難いことから、細胞がIL-6mRNAを発現した後に働くものと考えられる。歯肉線維芽細胞の代謝機能がIL-6によって影響を受けないという現象は、歯肉線維芽細胞がIL-6Rを有していないことによると解釈した。

以上のことから、歯肉線維芽細胞はIL-6産生細胞の1つとして、歯周炎局所においてサイトカインネットワークを介し、歯周病の炎症反応の調節に関与していると結論される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉線維芽細胞のインターロイキン6 (IL-6) 産生の調節機構ならびに炎症歯肉における線維芽細胞のIL-6産生の様態を調べることによって、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歯肉線維芽細胞がどのような役割を果たしているかを検討したものである。

インターロイキン1 β あるいは腫瘍壊死因子の刺激を受けた歯肉線維芽細胞はIL-6mRNAを発現し、IL-6を分泌することが明らかにされ、*in vivo*においても歯肉線維芽細胞がIL-6産生細胞として歯周病の炎症反応に関与することが示唆された。また、歯肉線維芽細胞のIL-6産生に際しては細胞自らが産生するPGE₂を介する調節機構が働き、そして産生されたIL-6に対するレセプターのmRNAの発現が検出されなかった事実から、IL-6は歯肉線維芽細胞自体に対してマイトジェン活性を示さず、またそのコラーゲン合成にも影響を及ぼさないと結論された。

論文内容に関して次の指摘があった。1) 炎症歯肉における線維芽細胞がIL-6産生細胞であるかどうかを調べた研究結果は、高橋慶壮学士の学位請求論文の内容の一部として重複している。2) 歯肉線維芽細胞の「DNA合成およびコラーゲン合成」を一括して表現する用語として、「代謝」という用語を用いているが、「代謝」の持つ意味は極めて広いので適切でない。1) のことについて、研究の流れとしては、歯肉組織において線維芽細胞が実際にIL-6を産生していることを研究結果として示すのは必要なことであると考えられる。したがって、本研究は培養歯肉線維芽細胞についてIL-6産生の動態ならびに調

節機構を調べるのが主体でもあり、指摘のあった箇所の記載を高橋論文の結果を追試する形に論文を修正しても本研究の価値を損なうものではないと判断された。2) のことについては、用語を修正することによって対応された。

結局、本研究は歯周病とIL-6との関わりについて、歯肉線維芽細胞を対象を絞り、IL-6産生の動態および調節機構を遺伝子発現のレベルにおいても解析し、まとまった結果を得たものとして高く評価される。

よって、本申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。