

氏名	やま や げん き 山 谷 元 氣
学位の種類	博士 (歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第258号
学位授与の日付	平成22年3月11日
学位論文題目	Air-liquid interface 培養下の口腔粘膜上皮に及ぼす TNF- α の角化亢進作用

論文内容の要旨

I 研究目的

白板症をはじめとして口腔粘膜には様々な角化性病変が発症する。角化亢進の誘引として喫煙などの慢性的な刺激が考えられている。最近、口腔粘膜白板症患者の唾液中の IL-6 と TNF- α 値が健常者と比較し有意に高いという報告や扁平苔癬患者に IL-6 と TNF- α の遺伝子多型が高頻度にみられるとの報告がなされ、角化性病変と炎症性サイトカインの関連性が示唆されている。しかし、その詳細は不明である。そこで、口腔粘膜が角化亢進をきたす機序と炎症性サイトカインの関与についての解明を試みた。

II 研究方法

口腔粘膜の角化亢進のメカニズムを解明するために、歯肉上皮由来不死化細胞 (GE1) を 30 日間液相で培養後、上皮表層を気相に暴露させる方法で 28 日間培養し、角化性重層扁平上皮の *in vitro* 実験系を作製した。この Air-liquid interface 培養系で、炎症性サイトカインの TNF- α あるいは IL-6 (0.01, 0.1, 1, 10 ng/ml), 細胞増殖因子である FGF10 (0.01, 0.1, 1, 10 ng/ml) を加えた培地で 14 日間培養を行い、口腔粘膜上皮へ及ぼす作用を検討した。培養細胞は 4%パラホルムアルデヒドあるいは純エタノールにて固定後に包埋した。薄切標本にて、① HE 染色し、全層の厚さと角質層の厚さをインテリジェント画像解析システム KS400 (Carl Zeiss) を用いて形態計測、② ケラチノサイトの細胞分化マーカー (ケラチン 4, 10, 13, 14, involucrin, filaggrin) について免疫染色を行い、重層した GE1 細胞の細胞分化の検討、③ 細胞を固定 2 時間前に BrdU を添加して培養後、標本作製し抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色により陽性細胞の検出、④ TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行い、さらに、アポトーシス阻害因子 (caspase family inhibitor, 0.01, 0.05, 0.1, 1 μ M, caspase 3 inhibitor, 0.1 μ M) を加え、角化性重層扁平上皮の組織像を観察した。

III 研究成績

1. TNF- α 添加群 (0.01, 0.1 ng/ml 群) において角質層の肥厚を認めた ($P < 0.05$)。さらに BrdU 取り込み細胞数と TUNEL 陽性細胞が増加していた。
2. IL-6 添加群では角質層の軽度の肥厚を認めたが、有意差はなかった。
3. RT-PCR にて GE1 細胞は TNFR1, caspase 3 および caspase 14 を発現していた。
4. Caspase family inhibitor を培地に添加してアポトーシスを抑制した結果、0.1 μ M 濃度以上の添加群で角質層がほぼ完全に消失した。

IV 考察及び結論

1. 歯肉上皮由来不死化細胞 (GE1) の上皮表層を気相に暴露させる方法で培養することで角化性重層扁平上皮の *in vitro* の実験系を作製した。この角化性重層扁平上皮はケラチン 4, 10, 13, 14, involucrin および filaggrin の局在が *in vivo* の錯角化性口腔粘膜上皮に類似していた。この系は口腔粘膜上皮に与える病原性微生物、増殖因子やアポトーシス誘導因子の作用など様々な解析に有用と考えられた。
2. TNF- α により角質層の肥厚が認められた。同時に、BrdU 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞がともに増加がみら

れたことから、TNF- α によるGE1細胞の増殖促進とアポトーシス促進が角質層の肥厚をもたらすことが示唆された。

3. アポトーシスを阻害することにより角質層がほぼ完全に消失したことから、角質層の形成にはアポトーシスが不可欠であることが明らかとなった。GE1細胞はTNFR1を発現しており、以上の結果と併せ、TNF- α の作用はdeath-receptorを介するTNF-TNFRのシグナル伝達によると推察された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 水 城 春 美 (口腔外科学講座 顎口腔外科学分野)

副査 教授 武 田 泰 典 (口腔病因病態制御学講座 口腔病理学分野)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔病因病態制御学講座 口腔微生物学免疫学分野)

口腔粘膜には白板症などの角化性病変が発症するが、角化亢進の原因や機序は不明である。しかし、口腔粘膜の角化性変化と炎症性サイトカインとの関連が報告されていることから、本研究では口腔粘膜の角化における炎症性サイトカインの関与について検討を行った。

はじめに、歯肉上皮由来不死化細胞 (GE1) を用いて、30日間の液相培養後に28日間のair-liquid interface培養 (上皮表層を気相に暴露) を行い、in vitroにおいて角化性重層扁平上皮を作製する実験系を確立した。次いで、この実験系を用いて、炎症性サイトカインであるTNF- α およびIL-6、細胞増殖因子であるFGF10をそれぞれ0.01, 0.1, 1, 10 ng/mlの各濃度で培地に加え、角化への影響を組織学的に観察した。組織学的観察は、培養細胞を固定後、包埋、薄切し、HE染色を行い、培養上皮の全層の厚さと角質層の厚さを形態計測した。また、TNF- α 、IL-6、FGF10添加による細胞増殖活性への影響をBrdUの取り込みにより検討した。さらに、TNF- α 添加により角化が亢進した培養上皮の細胞分化の状態をケラチン4, 10, 13, 14, involucrin, filaggrinに対する抗体を使用した免疫染色により検討した。一方、培養細胞のアポトーシスを阻害するcaspase family inhibitor, caspase 3 inhibitorを培地に添加し、上皮層の角化への影響を調べた。アポトーシスについてはTUNEL法にて検討した。さらに、GE1細胞におけるTNFR1およびアポトーシス関連分子のmRNAの発現の状態をRT-PCRにて検討した。

その結果、確立したair-liquid interface GE1細胞培養法は口腔粘膜上皮細胞の角化を誘導する実験系としてきわめて有用で、この実験系を用いて行った炎症性サイトカインと上皮層の角化との関連についての検討では、低濃度のTNF- α がGE1細胞の角化亢進を誘導することが明らかとなった。また、TNF- α による角化亢進は細胞増殖により上皮各層の細胞数が増加し角質層の厚さが増大することに起因するが、角質層の形成にはケラチノサイトのアポトーシスが不可欠であることが明らかとなった。さらに、TNF- α の作用はTNF-TNFRのシグナル伝達によると推測された。

本研究の成果は、まずair-liquid interface培養によりin vitroにおいて角化性重層扁平上皮を作製する実験系を確立した点にあり、この実験系はin vitroでの角化性重層扁平上皮における種々の実験にきわめて有用と思われる。また、低濃度のTNF- α が粘膜上皮の角化を亢進させることをin vitroにおいて明らかにしたことは本研究が初めてであり、今後の粘膜上皮の角化の研究に大きな進展をもたらすと期待される。さらに、粘膜の角化においてアポトーシスが不可欠であることを明らかにした意義は大きく、これらの点から本論文は学位に十分に値すると判断した。

試験・試問の結果の要旨

本論文の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果に対する考察について試問した結果、適切な解答が得られた。また、今後の研究にも意欲を示すとともに後輩への指導能力も備えていると判定した。