

氏名	さわ だ しゅん すけ 澤 田 俊 輔
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第 287 号
学位授与の日付	平成25年 3 月 8 日
学位論文題目	Enhancement of Gingival Inflammation Induced by Synergism of IL-1 β and IL-6 - 歯周炎症の促進は IL-1 β と IL-6 の相乗作用によって誘導される -

論文内容の要旨

I 研究目的

インターロイキン (IL) -1 β , 腫瘍壊死因子 (TNF) - α や IL-6 などの炎症性サイトカインは, 慢性関節リウマチや歯周病などの慢性炎症性疾患の病態を制御することが知られる。すなわち, IL-1 β は破骨細胞に作用して骨吸収を直接的に促進することが知られ, 一方, IL-6 は骨芽細胞の RANKL 発現を亢進して間接的に骨吸収を促進すると考えられている。したがって, IL-1 β と IL-6 は相互に関連しながら炎症病態を制御することが示唆される。しかしながら, IL-1 β と IL-6 各々の細胞作用の報告は多いものの, 特に歯周炎症を標的とした IL-1 β と IL-6 の共刺激による病態メカニズムに対する影響は未だ明らかにされていない。そこで本研究では, 代表的な歯周組織構築細胞である歯肉線維芽細胞 (GF) を標的として, IL-1 β と IL-6 の相互作用による歯周炎症の病態機序の一端を明らかにすることを目的とした。

II 研究方法

1. 細胞: ヒトの健康歯肉から分離・培養したヒト由来 GF および分化ヒト単球株化細胞 (THP-1) を用いた。なお, 本研究は, 岩手医科大学歯学部倫理委員会において承認されている (受付番号 01126)。
2. 刺激因子: ヒトリコンビナント IL-1 β , TNF- α , IL-6 および可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) は R&D 社製のものを用いた。
3. IL-6 シグナル伝達分子 gp130 発現の検討: GF および THP-1 を IL-1 β あるいは IL-6 (+ sIL-6R) で刺激した後, 通法に従い, 遺伝子レベルの変化 (刺激 6 時間) は Real Time-PCR 法を用いて, タンパクレベルの変化 (刺激 24 時間) は Western Blotting 法を用いて調べた。
4. IL-6 産生性の検討: IL-6 産生量は, GF を IL-1 β で刺激した後, ELISA キット (R&D) を用いて調べた。
5. sIL-6R 産生性の検討: sIL-6R 産生量は, THP-1 を IL-1 β , TNF- α および IL-6 で刺激した後, ELISA キット (R&D) を用いて調べた。なお, GF を陰性対照として用いた。
6. 細胞内 IL-6 シグナル系の解明: 細胞内の IL-6 シグナル系は, IL-1 β で 24 時間, 前処理した GF を IL-6/sIL-6R で 10 分間刺激した後, 全細胞蛋白を回収し, 通法に従い, Western Blotting 法を用いて調べた。
7. 細胞増殖活性の測定: GF の細胞増殖活性は, 細胞を IL-1 β および IL-6/sIL-6R で 24 時間刺激した後に, 通法に従い, MTT 法を用いて調べた。
8. 各種炎症関連分子の mRNA およびタンパク発現に及ぼす IL-1 β および IL-6/sIL-6R の共刺激の影響の検討: GF を IL-1 β あるいは IL-6/sIL-6R で刺激した後, 通法にしたがい, 遺伝子レベルの変化 (刺激 6 時間) は Real Time-PCR 法を用いて, タンパクレベルの変化 (刺激 48 時間) は市販の ELISA キット (R&D) を用いて調べた。なお, Cathepsin L 発現は Western Blotting 法を用いて調べた。
9. 統計解析: 各実験群間における有意差は Student's t-test を用いて検討した。

III 研究成績

1. IL-1 β は, GF の gp130 発現を mRNA およびタンパクレベルで有意に亢進した。また, IL-1 β は GF の IL-6 産生性を有意に促進した。
2. 分化 THP-1 において, IL-6 は sIL-6R 産生性を有意に亢進した。
3. IL-1 β で前処理された GF において, IL-6/sIL-6R 誘導シグナル (pStat3, pERK および pJNK) は有意に増強された。
4. IL-1 β は GF の細胞増殖活性を有意に亢進した。この亢進は IL-6/sIL-6R との相乗効果を認めなかった。
5. IL-1 β で前処理された GF において, IL-6/sIL-6R 誘導性 MMP-1, -3, -13 および -14 mRNA 発現は有意に亢進した。また, 同様に IL-1ra および IL-33 mRNA 発現も有意に亢進した。
6. IL-1 β で前処理された GF において, IL-6/sIL-6R 誘導性 proMMP-1 産生および Cathepsin L 発現は有意に亢進した。また, 同様に IL-1ra, MCP-1, bFGF および VEGF 発現も有意に亢進した。

IV 考察及び結論

GFにおいて、IL-1 β はIL-6のシグナル伝達分子 gp130の発現を誘導することが示された。GFは、細胞膜上にIL-6レセプター (IL-6R)を発現しないという特徴を有する。そのため、IL-6が細胞外の炎症巣でsIL-6Rと会合し複合体を形成する場合にのみ、gp130を介したシグナル伝達系が活性化することが知られている。本研究によって得られたIL-1 β によるgp130発現誘導という新知見は、炎症初期に優勢であるIL-1 β がGFをIL-6の感受性が高い細胞へと変貌させることを示しているのかもしれない。このことは、IL-1 β で前処理されたGFにおいて、IL-6/sIL-6Rシグナル伝達系が相乗的に亢進している所見によってもフォローされる。また、IL-6がTHP-1マクロファージのsIL-6R産生性を亢進するという知見によって、マクロファージが歯周炎症巣におけるsIL-6Rの重要な供給細胞となり得ることも示された。

一方、IL-1 β とIL-6はGFに作用し、その細胞内シグナル系の亢進に相応するように、様々なプロテアーゼ産生を相乗的に亢進することが分かった。また、Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)などのケモカインや血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)を相乗的に産生誘導するという知見からも、IL-1 β とIL-6はgp130を介したシグナル系の亢進によって、歯周炎症を増悪させるカスケードを相乗的に誘導することが示唆された。さらに、マクロファージなどのGFをとりまく周辺細胞との細胞間クロストークによって炎症病態を悪化させている可能性が考えられる。

本研究結果は、IL-1 β とIL-6はGFに作用して歯周炎症を相乗的に進展させる可能性を示唆するものである。すなわち、歯周組織の代表的な構築細胞であるGFを標的として、“IL-1 β によるIL-6シグナルの相乗的増強の抑制”という治療コンセプトによって、歯周炎症抑制を視野に入れた新規の歯周炎症制御法が構築され得るものと期待される。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 八重柏 隆 (歯科保存学講座 歯周療法学分野)
副査 教授 佐原 資 謹 (生理学講座 病態生理学分野)
副査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

インターロイキン (IL) -1 β 、腫瘍壊死因子 (TNF) - α やIL-6などの炎症性サイトカインは、様々な慢性炎症性疾患の病態を制御することが知られている。しかしながら、サイトカイン各々の細胞作用の報告は多いものの、特に歯周炎症を標的としたIL-1 β とIL-6の共刺激による病態メカニズムに対する影響は未だ明らかにされていない。今回、澤田らは、肉肉線維芽細胞 (GF)を標的として、IL-1 β とIL-6の相互作用による歯周炎症の病態機序の一端を明らかにすることを目的とし、研究を遂行した。

IL-1 β は、IL-6のシグナル伝達分子 gp130の発現をmRNAおよびタンパクレベル共に有意に亢進した。IL-1 β は、GFのIL-6産生性を有意に亢進した。また、IL-1 β で前処理されたGFにおいて、IL-6/sIL-6R誘導シグナルは有意に増強された。GFは細胞膜上にIL-6レセプター (IL-6R)を発現しないという特徴を有する。そのため、このIL-6/sIL-6R誘導シグナルの亢進は、IL-1 β 誘導性gp130の発現亢進によるものと考えられる。GFの細胞増殖活性は、IL-1 β 刺激時に、有意な活性亢進を示したが、IL-6/sIL-6Rとの相乗効果は認めなかった。IL-1 β で前処理されたGFにおいて、IL-6/sIL-6R誘導性MMP-1, -3, -13, -14, IL-1raおよびIL-33 mRNA発現は有意に亢進した。Timp群 mRNAに有意な発現亢進は認められなかった。タンパクレベルでは、IL-1 β で前処理されたGFにおいて、proMMP-1, Cathepsin L, IL-1ra, MCP-1, bFGFおよびVEGF発現が有意に亢進した。分化THP-1においては、IL-6刺激がsIL-6R産生性を有意に亢進した。

以上の結果から、IL-1 β とIL-6はGFに作用して、gp130の発現亢進を介し、プロテアーゼやサイトカインの産生を亢進することが示唆された。すなわち、IL-1 β とIL-6はGFに対して相互に作用し、歯周炎症を相乗的に進展させる可能性が示された。また、マクロファージが歯周炎症部位におけるsIL-6Rの重要な供給細胞となり得ることも示された。これらの研究結果は、GFを標的として、“IL-1 β によるIL-6シグナルの相乗的増強の抑制”という治療コンセプトによって、歯周炎症抑制を視野に入れた新規の歯周炎症制御法が構築され得るものと期待される。

試験・試問の結果の要旨

本論文の概要について説明がなされた。研究方法、結果の解釈ならびにその臨床的意義、再生医療への応用について試問した結果、いずれも適切かつ明瞭な回答が得られた。また、歯周病の病態を踏まえ、豊富な臨床経験に裏打ちされる、今後の研究の展望も述べられ、研究に対する十分な意欲が感じられたことから、学位に値する学識と研究能力を有するものと判定した。