

## 論文要旨等報告書

氏名	富山 高史
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 0 9 1 号
学位授与の日付	平成 2 2 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	インターロイキン-1 $\alpha$ によるマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の接着性の変化に関する研究

論文審査委員 教授 高柴 正悟 教授 滝川 正春 准教授 池亀 美華

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

根尖性歯周炎は、根管内の感染源によって根尖部に炎症が惹起され、結果的に根尖周囲に骨吸収をきたす炎症性疾患である。根尖性歯周炎によって生じる骨吸収は、炎症性細胞が産生する炎症性サイトカインが破骨細胞に作用することによって進行することが知られている。炎症部位で産生されるインターロイキン-1 (IL-1) は骨吸収性サイトカインとも呼ばれ、破骨細胞に作用し、強い骨吸収促進作用を有する。

吸収窩表層の骨芽細胞は、増殖・定着した後、骨細胞へと分化し、次第に骨産生性が亢進するようになる。とりわけ細胞の成熟、分化カスケードには他の細胞や細胞外基質との接着による骨芽細胞自身の組織定着性が必須となる。また細胞膜上の接着分子インテグリンは、細胞外基質と相互に作用した後、シグナルを細胞内に伝える機能を有する。特に Kim らは、骨芽細胞膜上のインテグリン分子の下流に存在する focal adhesion kinase の活性化を介して、骨芽細胞の分化が誘導された結果、骨組織が再生することを報告した (Bone, 2007)。一方、根尖性歯周炎の治癒過程に必須である骨添加機序において、骨芽細胞と細胞外基質との接着、相互作用が重要な役割を果たすものと予測されるが、詳細な機序は不明である。

近年, Martinez らは根尖性歯周炎の治癒期において IL-1 $\alpha$ の発現が亢進することを報告した (J. Endod., 2007)。本来、骨吸収性サイトカインである IL-1 $\alpha$ の発現が炎症治癒期において亢進したことは、根尖性歯周炎の治癒は骨芽細胞の分化に炎症性サイトカインの作用が相まって複雑に制御されている可能性を示唆する。

そこで本研究では、根尖性歯周炎の治癒メカニズムの一端を解明することを目的に、骨芽細胞を標的細胞とし IL-1 $\alpha$ の骨芽細胞に対する生物学的作用を調べた。

#### 【材料および方法】

1. 細胞および培養: マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は、理研 Cell Bank から購入したものをを用いた。培養は、ウシ胎児血清 (Cansera International) を 10 % の割合に含む  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM ; Sigma) を用いて、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 存在下で行った。
2. 試薬: リコンビナントマウス (rm) IL-1 $\alpha$  は R&D Systems から購入した。ラミニンは Southern Biotechnology Associates のものをを用いた。抗インテグリン  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1 および  $\beta$ 4 ラビット由来ポリクローナル IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。

抗 phospho-extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), phospho-c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 1/2 (JNK1/2) および phospho-p38 MAPK のラビット由来ポリクローナル IgG 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。抗β-アクチンマウス由来モノクローナル IgG 抗体および MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 試薬は Sigma から購入した。

3. 細胞増殖活性の検討: MC3T3-E1 を rmIL-1α で 24 時間刺激した後、細胞増殖活性は、通法にしたがい MTT 法を用いて検討した。
4. インテグリンの遺伝子発現の検討: rmIL-1α で 8 時間刺激した細胞から標的遺伝子を抽出し、遺伝子の増幅産物を作製した。インテグリンα3, α6, β1 およびβ4 の遺伝子発現は、通法にしたがい Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用いて検出した。
5. インテグリン α3, α6, β1, β4 のタンパク質発現および細胞内シグナル伝達系 MAPKs のリン酸化タンパク質発現の検討: rmIL-1α で刺激した細胞を用いて、各インテグリンのタンパク質発現 (刺激: 48 時間) および細胞内シグナル伝達系 MAPKs (ERK1/2, p38-MAPK, JNK1/2) のリン酸化タンパク質の発現 (刺激: 1 時間) は、通法にしたがいうエスタンブロットティング法を用いて検出した。
6. IL-1αによる細胞接着性の影響の検討: 細胞接着実験は、rmIL-1αで MC3T3-E1 を 48 時間刺激した後に Margadant らの記載 (J. Cell Sci., 2009) にしたがって行った。なお、ラミニンのほかに、ポリ-D-リシンあるいはフィブロネクチンでコートした培養プレートを実験の対照として用いた。
7. 統計処理: 各実験系における有意差は、対応のない群間の Student's *t*-test を用いて検定した。なお、*p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

## 【結果】

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 において、

1. IL-1αは、細胞増殖活性を濃度依存的に亢進した (0-10 ng/ml)。
2. 低濃度 (0.1 ng/ml) の IL-1αは、インテグリンα3 の発現 (mRNA およびタンパク質レベル) を亢進した。
3. 低濃度 (0.1 ng/ml) の IL-1αは、ラミニンに対する細胞接着性を亢進した。
4. IL-1αの前処理した際、ラミニン刺激によって細胞内シグナル伝達系の一つである MAPK 系のリン酸化を亢進した。

## 【考察と結論】

根尖性歯周炎の治癒は、従来、根管内の感染源を機械的・化学的に除去し、根尖周囲の炎症カスケードを消退方向に向かわせるものと捉えられてきた。しかしながら、その細胞生物学的な病態は未だ不明な点が多い。

そこで本研究は、根尖性歯周炎の治癒メカニズムを解明するために、根尖性歯周炎の治癒期を想定して IL-1αが骨芽細胞の細胞動態に与える影響を調べた。その結果、IL-1αは低濃度になると、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 のインテグリンα3 発現を有意に亢進し、ラミニン基質との細胞接着性を増強する作用を有することが明らかになった。この新規所見は、IL-1αは骨吸収性サイトカインとして作用する一方、炎症消退に伴う組織中濃度の低下によって骨再生にも関与し得る可能性を示唆するものである。

今後、IL-1αによるラミニン基質との細胞接着性の亢進の後、骨芽細胞の骨分化誘導能の変化を検討する必要がある。また本研究成果は、根尖性歯周炎をはじめとする炎症性骨吸収性疾患における骨再生治癒メカニズム解明の一助になると考える。

## 論文審査結果の要旨

根尖性歯周炎は、根管内の感染源によって根尖部に炎症が惹起され、根尖周囲に骨吸収をきたす炎症性疾患である。骨吸収は、炎症性サイトカインが破骨細胞に作用することによって進行する。炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン-1 (IL-1) は骨吸収性サイトカインとも呼ばれ、破骨細胞への分化に関与し、骨吸収促進作用を有する。骨芽細胞は、増殖、定着した後、骨細胞へと分化する。とりわけ細胞の成熟、分化には他の細胞や細胞外基質との接着による骨芽細胞自身の組織定着性が必須となる。また、細胞膜上の接着分子インテグリンは、細胞外基質と相互に作用した後、シグナルを細胞内に伝える機能を有する。根尖性歯周炎の治癒過程において、骨芽細胞と細胞外基質との接着、相互作用が重要な役割を果たすものと予測されるが、その詳細な機序は不明である。

そこで申請者は、Martinezらが報告した根尖性歯周炎の治癒期におけるIL-1 $\alpha$ の発現亢進 (Martinez *et al*, *J Endod*, 2007) に着目し、根尖性歯周炎の治癒メカニズムの一端を解明することを目的に、骨芽細胞を標的細胞とし、IL-1 $\alpha$ の骨芽細胞に対する生物学的作用を調べた。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

骨芽細胞様細胞MC3T3-E1において、

- 1) IL-1 $\alpha$  (0-10 ng/ml) は、細胞増殖活性を濃度依存的に亢進した。
- 2) 低濃度 (0.1 ng/ml) の IL-1 $\alpha$ は、細胞内のインテグリン $\alpha$ 3 の mRNA 発現およびタンパク質レベルを上昇させた。
- 3) 低濃度 (0.1 ng/ml) の IL-1 $\alpha$ は、ラミニンに対する細胞接着性を亢進した。
- 4) IL-1 $\alpha$ で前処理した際、ラミニン刺激によって細胞内シグナル伝達系の一つである MAPK 系のリン酸化が亢進した。

以上のことから、IL-1 $\alpha$ は骨再生に必要な骨芽細胞の増殖促進と細胞接着性の亢進に関与することが明らかとなった。

本研究は、骨吸収性サイトカインとして捉えられてきたIL-1 $\alpha$ に関する従来の見解のほかに、炎症の消退に伴い、濃度が低下することによってIL-1 $\alpha$ が骨再生機序にも関与し得るという新たな病態生理を示唆するものである。また、本研究成果は根尖性歯周炎をはじめとする炎症性骨吸収疾患における骨再生治癒メカニズム解明の一助になると考える。

よって、本申請論文は博士 (歯学) の学位論文として価値があると認めた。