

原 著

培養ヒト歯肉および歯根膜由来線維芽細胞の エストロゲンレセプターに関する研究

山村 辰二, 森下 真行, 辻村紀代子
福永真佐美, 岩本 義史

Studies on Estrogen Receptors of Cultured Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts

Tatsuji Yamamura, Masayuki Morishita, Kiyoko Tsujimura,
Masami Fukunaga and Yoshifumi Iwamoto

(平成5年9月30日受付)

緒 言

歯周疾患は様々な因子が複雑にからんで発病するが、性ホルモンのバランスが変調をきたす思春期や妊娠時には歯肉炎が増悪することが知られており、性ホルモンと歯肉炎に関しては数多くの報告がある¹⁻¹⁰⁾。Vittek ら¹⁾は強い歯肉炎患者の歯肉ではテストステロンの代謝が亢進すると報告している。また疫学調査においても性ホルモンのバランスが不安定な時期には歯肉炎の有病率が高く、重症度も高いと言われている^{7,11)}。宮城ら^{12,13)}は性ホルモンの濃度と多形核白血球の遊走能には密接な関係があることを報告し、これらの点から歯周疾患との関連性を示唆している。Ahsan¹⁴⁾は培養ヒト歯肉線維芽細胞にエストラジオールを添加すると細胞増殖は抑制するがコラーゲン合成は高まると報告している。一方、Lewko ら¹⁵⁾はエストラジオールが歯根膜線維芽細胞の DNA 合成を抑制することを報告している。このようにエストロゲンが歯周組織に作用を及ぼしていることは確かである。しかしエストロゲンが歯周組織にどのような機序で作用を及ぼしているかについては不明な点が多く、歯肉、歯根膜においてはエストロゲンと結合する蛋白質が存在するという報告があるに過ぎない^{15,16)}。そこで、著

者らは歯周組織にエストロゲンが及ぼす影響、役割、機序を検索するにあたり、エストロゲンレセプターの存在の確認が必要であると考え、培養ヒト歯肉線維芽細胞(以下、GF と略す)および歯根膜由来線維芽細胞(以下、PDL と略す)を用い、エストロゲンレセプターの遺伝子レベルでの検出、同定を行った。

材料および方法

I. 材 料

PDL については44歳女性から便宜抜去された歯、GF については18歳男性の智歯抜去時に得られた歯肉からそれぞれ分離・調製した。これらの試料を得るには、患者に対する説明を充分に行い同意を得た後に行った。

抜去歯については歯根中央1/3相当部に付着している組織をディスポーザブルメスにて剥離させ、タイプIコラーゲンでコートしたディッシュの底面に静置した。歯肉については、ディスポーザブルメスにて結合組織を約1mm³に細片化した後、同様にディッシュに静置した。

培地は、10%牛胎児血清含有のダルベッコ変法イーグル培地を用い、5%CO₂/95%air、37°Cの条件下で培養した。数日後、各組織小片から、アウトグロースした細胞をそれぞれPDLおよびGFとし、継代数が8世代となったものを本実験に使用した。

また、エストロゲンレセプターの存在が知られている乳癌由来細胞(以下、MCF-7と略す)をコントロール細胞として用いた。

広島大学歯学部予防歯科学講座(主任:岩本義史教授)本論文の要旨は平成4年5月の第35回春季歯周病学会、平成4年6月の第25回広島大学歯学会総会において発表した。また本研究は、一部文部省科学研究費(一般研究C No. 03807137)による。

II. RNA の抽出

PDL, GF 及び MCF-7 をセルスクレイパーを用いてフラスコより剥離し、遠心分離を行い細胞を回収した。この細胞に RNAzol B (Biotec, USA) を加え、通常に従い RNA を分離・精製した。

III. RT-PCR

既に報告されているヒトエストロゲンレセプター (以下, HER と略す) cDNA の塩基配列¹⁷⁾ を参考にしてセンス側 2 種類 (プライマー I, II), アンチセンス側 1 種類 (プライマー III) の PCR プライマーを設計し、広島大学遺伝子実験施設に依頼し合成した。図 1 にプライマーの塩基配列を示し、図 2 には各々のプライマーの遺伝子上の位置と PCR によって増幅される DNA の予想サイズを示す。

プライマー I

5' GTGAAGCTACTGTTGCTCC 3'

プライマー II

5' CACAGACACTTGGATCCACC 3'

プライマー III

5' AATGCGATGAAGTAGAGCCC 3'

図 1 PCR プライマーの塩基配列

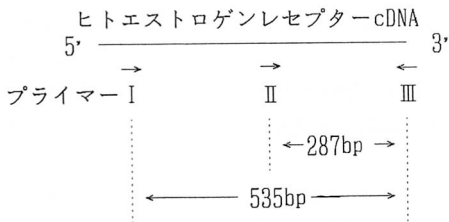


図 2 PCR プライマーの遺伝子上の配列

各々の培養細胞より抽出した RNA 1 μ g を鋳型とし、0.1 μ g oligo (dT)₂₀ をプライマーとして逆転写反応を行い、cDNA を合成した。続いてこの cDNA を鋳型として図 1 に示したプライマーを用いて PCR を行い、DNA の増幅を行った。PCR の各サイクルの温度および反応時間は、変性 95°C 1 分、結合 55°C 2 分、伸長 72°C 3 分とし、サイクル数は 35 サイクルとした。反応後、PCR 産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、増幅 DNA の確認を行った。分子サイズマーカーとしては Φ X174-Hinc II を用いた。な

お、HER を含むプラスミド DNA を鋳型とし、プライマー I および III を用いて PCR を行ったものについても同様に電気泳動を行った。

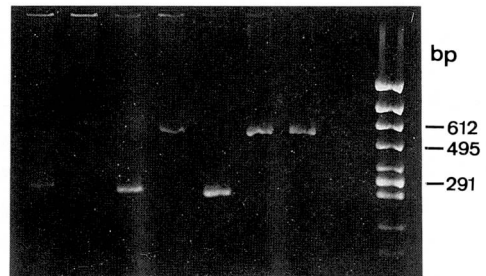
IV. サザンハイブリダイゼーション

PCR 産物についてアガロースゲル電気泳動を行った後、DNA をゲルからナイロンメンブレンに転写し、通常に従いサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブとしては HER の遺伝子を含むプラスミド (Dr. Chambon より供与を受けた) より HER コーディングリージョンを制限酵素で切断したものを [α -³²P]d-CTP でラベルして用いた。ハイブリダイゼーション後、0.2 \times SSC/0.2% SDS 溶液でメンブレンを洗浄しオートラジオグラフィーを行った。

結 果

I. RT-PCR

図 3 に、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。プライマー I とプライマー III の組合せにより RT-PCR を行ったものでは、PDL (レーン B), GF (レーン D), MCF-7 (レーン F) および HER プラスミド (レーン G) のいずれを鋳型とした場合にも、予想された 535 bp 付近に DNA のバンドが確認された。またプライマー II とプライマー III の組み合わせにおいては、PDL (レーン A), GF (レーン C) および MCF-7 (レーン E) のいずれにおいても予想された 287 bp 付近に DNA のバンドが確認された。

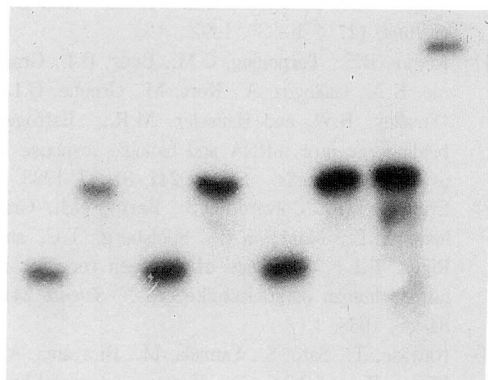


A B C D E F G H I
A. PDL (プライマー II \times III)
B. PDL (プライマー I \times III)
C. GF (プライマー II \times III)
D. GF (プライマー I \times III)
E. MCF-7 (プライマー II \times III)
F. MCF-7 (プライマー I \times III)
G. HER plasmid DNA (プライマー I \times III)
H. HER probe
I. Φ X174-Hinc II

図 3 PCR 産物のアガロース電気泳動

II. サザンハイブリダイゼーション

PDL, GF および MCF-7 のいずれにおいてもアガロースゲル電気泳動において確認した 535 bp (レーン B, D, F, G), 287 bp (レーン A, C, E) 付近のバンドに相当する DNA と HER プローブがハイブリダイズすることが確認された (図 4)。



A B C D E F G H

- A. PDL (プライマー-II×III)
- B. PDL (プライマー-I×III)
- C. GF (プライマー-II×III)
- D. GF (プライマー-I×III)
- E. MCF-7 (プライマー-II×III)
- F. MCF-7 (プライマー-I×III)
- G. HER plasmid DNA (プライマー-I×III)
- H. HER probe

図 4 PCR 産物のサザンハイブリダイゼーション

考 察

閉経後におこる骨量の減少にはエストロゲンが関与しておりエストロゲンが骨量の維持に重要な役割を果たすことはよく知られている¹⁸⁻²⁰⁾。1988年にラット及びヒト骨芽細胞にエストロゲンレセプターが存在することが証明され、エストロゲンがレセプターを介して骨芽細胞に作用することが示された^{21,22)}。一方、PDL は高いアルカリホスファターゼ活性を持つこと、石灰化能を有することなど骨芽細胞様の性質を持つことが知られている²³⁻²⁶⁾。従って、歯周組織においても同様にエストロゲンがレセプターを介して歯肉や歯根膜に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。歯肉組織、歯根膜組織においてエストロゲンに結合する蛋白質が存在することは報告されているが^{15,16)}、それがレセプターであるか否かについては不明であった。PCR 法 (ポリメラーゼ連鎖反応法) は、わずかな DNA を増幅する方法として広く応用されている^{27,28)}。また本研究で用いた RT-PCR 法は RNA レベルで遺伝

子の発現を解析する方法として知られている。この方法は、PCR 法の特徴として、微量の RNA からでも目的とする遺伝子の検出が可能なため、試料が得にくい場合や、遺伝子の発現量が少ない場合にも応用できる。

今回の実験で、(1)ヒトエストロゲンレセプターの遺伝子配列をもとに設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、予想される分子サイズの DNA が増幅されたこと、および、(2)増幅された DNA が、ヒトエストロゲンレセプター cDNA プローブとハイブリダイズしたことが示された。この結果は、PDL および GF には、エストロゲンレセプターの遺伝子が発現している可能性を示唆するものである。しかし PCR 法を用いた検出法では、遺伝子の発現については明らかにできるが、その発現量については言及できない。従ってこれらの細胞において、エストロゲンレセプター遺伝子の発現をさらに追究するには、ノーザンハイブリダイゼーションなどの方法を用いる必要がある、この点については現在検討中である。

結 論

培養ヒト歯肉線維芽細胞および培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞を用いエストロゲンレセプターの検出、同定を行い、次の結果を得た。

1. ヒトエストロゲンレセプターに特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法およびヒトエストロゲンレセプター cDNA をプローブとして行ったサザンハイブリダイゼーションにより、培養細胞においてエストロゲンレセプターの検出が可能であった。
2. 本法を培養ヒト歯肉線維芽細胞および歯根膜由来線維芽細胞に応用した結果、エストロゲンレセプターが存在する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ヒトエストロゲンレセプター cDNA を供与いただいた Dr. Chambon (Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, France) に感謝いたします。

文 献

- 1) Vittek, J., Rappaport, S.C., Gordon, G.G., Munnangi, P.R. and Southren, A.L.: Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J. Periodont.* 50, 254-264, 1979.
- 2) 辻 康雄: 歯周ポケット浸出液中の Estradiol-17 β 量と臨床所見について. *日歯周誌* 30, 368-374, 1988.

- 3) Sutcliffe, P.: A longitudinal study of gingivitis and puberty. *J. Periodont. Res.* **7**, 52-58, 1972.
- 4) Hugoson, A., Koch, G. and Rylander, H.: Prevalence and distribution of gingivitis-periodontitis in children and adolescents; Epidemiological data as a base for risk group selection. *Swed. Dent. J.* **5**, 91-103, 1981.
- 5) 青山 旬: 思春期における歯肉炎に関する研究—唾液中の性ホルモンと歯肉状況並びに歯肉縁下細菌との関連性—。 *広大歯誌* **19**, 161-173, 1987.
- 6) 鶴田圭伊子: 思春期における歯肉炎の細菌学的研究。 *広大歯誌* **23**, 249-260, 1991.
- 7) 岩本義史, 岩崎妃佐子, 森下真行, 河村 誠, 土田和範, 宮城昌治, 青山 旬: 学校における歯周保健に関する研究—中学生の歯周疾患実態調査—。 *口腔衛生学会誌* **36**, 96-102, 1986.
- 8) Glickman, I.: *Clinical periodontology* 4th ed. W. B. Saunders company, Philadelphia, 275-289, 1972.
- 9) Baer, P.N. and Benjamin, S.D.: Periodontal disease in children and adolescents. J.B. Lippincott company, Philadelphia, 17-35, 1974.
- 10) Matsson, L. and Goldberg, P.: Gingival inflammatory reaction in children at different ages. *J. Clin. Periodontol.* **12**, 98-103, 1985.
- 11) 岡本 莫, 谷川昌生, 小川哲治, 新堀 浩, 中西恵治, 東 富恵, 白川正治: 広島地区における中学生の歯周疾患罹患状態実態調査 第1報 第一次検診報告。 *広大歯誌* **19**, 261-266, 1987.
- 12) 宮城昌治, 青山 旬, 森下真行, 岩本義史: ヒト多形核白血球の遊走能に及ぼす性ホルモンの影響。 *日歯周誌* **30**, 1033-1039, 1988.
- 13) Miyagi, M., Aoyama, H., Morishita, M. and Iwamoto, Y.: Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Periodontol.* **63**, 28-32, 1992.
- 14) Md. Shahed Ahsan.: Effects of sex hormones on the growth and collagen metabolism of human gingival fibroblasts. *広大歯誌* **24**, 125-129, 1992.
- 15) Lewko, W.M. and Anderson, A.: Estrogen receptors and growth response in cultured human periodontal ligament cells. *Life Science* **39**, 1201-1206, 1986.
- 16) Vittek, J., Hernandez, M.R., Wenk, E.J., Rappaport, S.C. and Southren, A.L.: Specific estrogen receptors in human gingiva. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**, 608-612, 1982.
- 17) Green, S., Walter, P., Kumer, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P. and Chambon, P.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139, 1986.
- 18) 西沢良記: 肥満症; 女性の内科疾患 (和田正久, 森井浩世編)。永井書店, 261, 1984.
- 19) 江澤郁子: 骨粗鬆症。 *科学と生物* **30**, 642-648, 1992.
- 20) Berestijn, E., Laarhoven, J. and Smals, A.: Body weight and/or endogenous estradiol as determinants of cortical bone mass and bone loss in healthy early postmenopausal woman. *Acta Endocrinol.* **127**, 226-230, 1992.
- 21) Komm, B.S., Terpening, C.M., Benz, D.J., Graeme, K.A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G.L., O'malley, B.W. and Haussler, M.R.: Estrogen binding receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like cells. *Science* **241**, 81-83, 1988.
- 22) Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Bergv, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L.: Evidence of estrogen receptor in normal human osteoblast-like cells. *Science* **241**, 84-85, 1988.
- 23) Kawase, T., Sato, S., Yamada, M., Hirayama, A., Miake, K. and Saito, S.: Human periodontal ligament cells *in vitro*. Characterization of alkaline phosphatase. *J. Bone. Minerl. Res. Suppl.* **1**, 63A, 1986.
- 24) Somerman, M.J., Foster, R.A., Imm, G.M., Sauk, J.J. and Archer, S.Y.: Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J. Periodontol.* **60**, 73-77, 1989.
- 25) Kawase, T., Sato, S., Miake, K. and Saito, S.: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv. Dent. Res.* **2**, 234-239, 1988.
- 26) Yamada, M., Hirayama, A. and Miake, K.: Histochemical and cytochemical studies of phosphatase in bovine periodontal ligament. *Jpn. J. Oral Biol.* **29**, 378-375, 1987.
- 27) Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, M.D., Champlin, R., Witte, O.N. and McCormick, F.P.: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5698-5702, 1988.
- 28) Kinoshita, T., Shimoyama, M., Tobinai, K., Ito, M., Ito, S., Ikeda, S., Tajima, K., Shimotohno, K. and Sugimura, T.: Detection of mRNA for the *tax1/rex1* gene of human T-cell of leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5620-5624, 1989.