

Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression.

(ロキシスロマイシンは、腫瘍壊死因子によって誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ-1発現を、マイトジェン活性化プロテインキナーゼのリン酸化と Ets-1 発現を制御することによって阻害する。)

所属・職 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・助手
(指導教員 鳥居 光男 教授)

申請者氏名 小山 徹

[目的]

マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、線維芽細胞やマクロファージが産生する一連のタンパク分解酵素であり、歯周病原菌由来のリポ多糖や腫瘍壊死因子 (TNF- α) をはじめとする炎症性サイトカインによってその発現が誘導されること、歯周炎の進展増悪にこれらの過剰産生が深く関与していることが知られている。特に、MMP-1 は初期のコラーゲンネットワークの破壊に関与し、歯周炎における組織破壊の重要な因子であることが示唆されている。また、14 員環系マクロライド抗生剤は作用機序は不明ながら、抗菌作用以外に抗炎症作用を持つことが明らかにされ、耳鼻科・呼吸細気管支領域において臨床応用されている。

本研究では、ヒト歯根膜由来細胞において、14 員環系マクロライド抗生剤の一種であるロキシスロマイシン (RXM) が、TNF- α によって誘導される MMP-1 に及ぼす影響について検討した。さらに、それらのメカニズムを解明するために、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) のリン酸化および転写因子 Ets-1 の発現に対する影響を検討した。

[材料と方法]

- 1) ヒト歯根膜由来細胞を α -MEM (10% ウシ胎児血清含有) で、コンフルエントになるまで培養後、1% ウシ胎児血清含有 α -MEM で 24 時間前培養した。その後、種々の濃度の TNF- α 、RXM や MAPK 阻害剤を含む α -MEM (1% ウシ胎児血清含有) で刺激した後、細胞および培養上清をそれぞれ回収した。
- 2) 培養細胞の全 RNA を GITC 法で抽出し、ノーザンブロット法により、TNF- α 刺激による MMP-1 mRNA の発現動態を検討した。
- 3) TNF- α 刺激によって誘導された MMP-1 に対する RXM の影響をノーザンブロット法、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (ELISA) 法およびウェスタンブロット法で検討した。また、MMP に共通の内因性阻害剤である TIMP-1 に対する影響を、ELISA 法で検討した。
- 4) TNF- α 刺激による MMP-1 発現に対するシクロヘキシミドおよびアクチノマイシン D の影響をノーザンブロット法で検討した。
- 5) TNF- α 刺激による Ets-1 発現に対する RXM の影響を、ウェスタンブロットおよびノーザンブロット法で検討した。

- 6) TNF- α 刺激による MMP-1 発現に対する MAPK 阻害剤 (SB203580、U0126、SP600125) の影響をノーザンブロットおよびウェスタンブロット法で検討した。
- 7) TNF- α 刺激による MAPKs (p38 MAPK、ERK1/2、JNK) のリン酸化に対する RXM の影響をウェスタンブロット法で検討した。

[結果と考察]

- 1) ヒト歯根膜細胞において、TNF- α は MMP-1 mRNA 発現を濃度・時間依存的に増強した。
- 2) RXM は、TNF- α 刺激による MMP-1 の発現誘導を mRNA レベルとタンパクレベルで抑制した。また、RXM は TIMP-1 産生に影響を及ぼさなかった。
- 3) シクロヘキシミドおよびアクチノマイシン D は、MMP-1 mRNA の発現を抑制した。
- 4) RXM は、TNF- α 刺激による Ets-1 の発現誘導を mRNA レベルとタンパクレベルで抑制した。
- 5) 3種類の MAPK 阻害剤は、TNF- α 刺激による MMP-1 の発現誘導を mRNA レベルとタンパクレベルで抑制した。
- 6) RXM は、ERK1/2 および JNK のリン酸化を抑制した。

以上の結果から、RXM は ERK1/2、JNK リン酸化の抑制および転写因子 Ets-1 発現の抑制を介して MMP-1 発現を抑制することが示された。したがって RXM は、MMP-1 の過剰産生による組織破壊を引き起こす歯周炎の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

(Journal of Periodontal Research 掲載予定)

論文審査要旨および担当者

様式15

報告番号	歯論第61号	氏名	小山 徹	
論文審査担当者	主査	鳥居 光 男		
	副査	松口 哲也	和泉 雄一	佐藤 友昭

Roxithromycin inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-1 expression through regulating mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Ets-1 expression.

(ロキシスロマイシンは、腫瘍壊死因子によって誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ-1発現を、マイトジェン活性化プロテインキナーゼのリン酸化とEts-1発現を抑制することによって阻害する)

14員環系マクロライド抗生剤は、その本来の抗菌作用に加え、抗炎症作用を持つことが明らかにされ、耳鼻科・呼吸器科領域ではすでに臨床応用されている。本論文は14員環系マクロライド抗生剤の一種ロキシスロマイシン(RXM)を歯周炎の治療薬として応用することを念頭に、RXMの歯根膜由来細胞に対する影響を検討したものである。

ヒト歯根膜由来細胞培養系において腫瘍壊死因子(TNF- α)の刺激により産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ-1(MMP-1)を指標にRXMの影響を検討した結果

- 1) ヒト歯根膜細胞においてTNF- α はMMP-1 mRNA発現を濃度・時間依存的に増強する
- 2) RXMはTNF- α 刺激によるMMP-1の発現誘導をmRNAレベルとタンパクレベルで抑制するが、MMPsの内因性阻害剤であるTIMP-1の産生には影響を及ぼさない
- 3) シクロヘキシミドおよびアクチノマイシンDがMMP-1 mRNAの発現を抑制する
- 4) RXMがTNF- α 刺激による転写因子Ets-1の発現誘導をmRNAレベルとタンパクレベルで抑制する
- 5) MAPK(p38 MAPK, ERK1/2, JNK)の阻害剤がいずれもTNF- α 刺激によるMMP-1の発現誘導をmRNAレベルとタンパクレベルで抑制する
- 6) RXMがERK1/2およびJNKのリン酸化を抑制する

という結果を得、RXMはERK1/2、JNKのリン酸化の抑制および転写因子Ets-1の発現の抑制を介してMMP-1の発現を抑制すると結論付けた。

審査委員会は、本論文の発想、実験方法、結果の解釈等の妥当性を検討した結果、RXMを対象としたのは他の14員環系マクロライド抗生剤に比べて研究が進んでいないこと、またMMP-1を指標に選んだことについては、MMP-1が初期のコラーゲンネットワークの破壊に関与し、歯周炎の進展増悪にその過剰生産が深く関与していることから、妥当であると認め、TNF- α 刺激を用いたことについても、この種の実験においては一般的な方法であることを認めた。それぞれの実験方法も一般的なもので、その結果の解釈についても妥当なものであった。ただ、MMP-1発現抑制に関わるシグナル伝達については、その証明が直接的ではない点がありやや不十分だと指摘された、しかし今回の段階での結果の解釈としては問題ないと考えた。

最終的に本審査委員会は、本論文がRXMが歯根膜細胞によるMMP-1産生を抑制することを始めて明らかにし、RXMを新しい歯周疾患治療薬として用いる可能性を示唆した点を評価し、本論文が学位論文として十分に価値あるものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨および担当者

様式16

報告番号	歯論第61号	氏名	小山 徹	
論文審査担当者	主査	鳥居 光 男		
	副査	松口 徹 也	和泉 雄 一	佐藤 友 昭

審査委員会は、平成19年2月13日（火）、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めると共に、これと関連する背景、実験条件、結果の解釈などについても試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。

なお、第1外国語（英語）については平成12年10月10日（火）に施行された学位取得のための第1外国語試験に合格していることが確認され、また第2外国語試験（独語）についても独文和訳の結果から、大学院博士課程修了者と同等の学力があると判断された。

以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者と同等、あるいはそれ以上の識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格を持つものと判断した。