

## 論 文 要 旨

**Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells  
requires IL-1 $\beta$** 

機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 産生に  
IL-1 $\beta$ は必要である

前田 綾

## 【序論および目的】

矯正治療における歯の移動では、機械的刺激により歯根膜の炎症性メディエーターの発現が増加するなどの炎症様反応が生じ、骨のリモデリングが生じる。しかし、この過程におけるケモカインの関与の詳細は明らかでない。本研究の目的は、機械的刺激を加えたときの歯根膜細胞によるケモカイン発現・産生の動態を調べ、さらにその細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることである。

## 【材料および方法】

1. 圧刺激 (pressure force) またはずり応力 (pulsating fluid flow) を歯根膜細胞に負荷し、ケモカイン (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1) およびサイトカイン (IL-1 $\beta$ ) の mRNA 発現を定量的 PCR 法で、タンパク産生量を ELISA 法で測定した。
2. IL-1 $\beta$ 中和抗体, MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) 阻害剤と NF- $\kappa$ B 阻害剤 (MG-132) を前投与したときの機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 mRNA 発現量の変化を定量的 PCR 法で測定した。
3. 圧刺激による歯根膜細胞の MAP キナーゼのリン酸化と I $\kappa$ B タンパク量について Western blot 法で解析し、歯根膜細胞での機械的刺激による細胞シグナル伝達機構について検討した。
4. 健康な歯周組織の被検者 (10 人) の右側臼歯部に歯間分離用エラスティックによる矯正力を負荷した後、右側犬歯の歯肉溝浸出液(GCF)中の IL-8 タンパク濃度を測定した。

なお、歯根膜細胞の供用ならびに被検者に対する矯正力負荷はすべて informed consent を得たうえで、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会承認の方法に基づいて行った。

## 【結 果】

1. 圧刺激またはずり応力による歯根膜細胞のケモカイン mRNA の発現は、解析した 4 種類のケモカイン (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1) のうち IL-8 のみが増加し、同時にタンパク産生も増加した。
2. 歯根膜細胞は常時少量の IL-1 $\beta$  mRNA を発現していたが、機械的刺激により IL-1 $\beta$ 発現は増加しな

かった。一方で IL-1 $\beta$  中和抗体前投与により機械的刺激による IL-8 mRNA の発現は有意に減少した。また、IL-8 誘導に関わる細胞内シグナル伝達機構を調べるため、MAP キナーゼ阻害剤と NF- $\kappa$ B 阻害剤を前投与して機械的刺激を加えた。歯根膜細胞の IL-8 mRNA の発現は、3 種類の MAP キナーゼ阻害剤いずれによっても有意に減少したが、NF- $\kappa$ B 阻害剤では変化しなかった。

3. Western blot 法による解析では圧刺激による歯根膜細胞の 3 種類の MAP キナーゼのリン酸化の上昇がされたが、細胞質中の I $\kappa$ B タンパクは変化しなかった。

4. 被検者 10 人中 9 人において GCF 中の IL-8 濃度は矯正力負荷後 2-4 日で著明に増加した。

#### 【結論及び考察】

今回の結果では、圧刺激またはずれ応力を与えた歯根膜細胞においてケモカインのなかでも IL-8 の mRNA 発現・タンパク産生が増加したことから、IL-8 が骨のリモデリングに深く関わっていることが示唆された。また、IL-8 発現に関連すると以前報告のある IL-1 $\beta$  発現についても同じ機械的刺激を加えて測定したが、mRNA 発現の増加はみられなかった。しかし、興味あることに IL-1 $\beta$  中和抗体の前投与による IL-8 発現は減少した。このことから、機械的刺激による IL-8 発現には構成的な IL-1 $\beta$  の存在が必要であることが示唆された。さらに、3 種類の MAP キナーゼ阻害剤と NF- $\kappa$ B 阻害剤を前投与して機械的刺激を加えたところ、MAP キナーゼ阻害剤の前投与での歯根膜細胞の IL-8 mRNA 発現が減少した。Western blot 法でも機械的刺激による MAP キナーゼのリン酸化の上昇が確認されたことから、機械的刺激による IL-8 発現誘導は p38 kinase, JNK, ERK の 3 種類の MAP キナーゼを介していることが確認された。一方、NF- $\kappa$ B 阻害剤前投与での歯根膜細胞の IL-8 mRNA 発現量は変化せず、Western blot 法でも I $\kappa$ B タンパク量に変化しないことから、機械的刺激による IL-8 mRNA 産生は NF- $\kappa$ B を介していないことが確認された。さらに、GCF 中の IL-8 タンパク濃度は矯正力負荷後 2-4 日で著明に増加したことから、歯根膜細胞からの IL-8 産生は歯の移動における炎症様反応の指標になり得る可能性が示唆された。しかし、GCF 中には歯根膜からの滲出液だけでなく、他の歯周組織からの滲出もみられるので、今後さらなる研究が必要と思われる。

(Journal of Dental Research ; accepted 2007.02.08)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 17 号	学位申請者	前田 綾
審査委員	主査	鳥居 光男	学位 博士 (歯学)
	副査	山崎 要一	副査 於保 孝彦
	副査	大西 智和	副査 福永 智広

Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells requires IL-1 $\beta$ (機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 産生に IL-1 $\beta$  は必要である)

Journal of Dental Research ; in press

矯正治療における歯の移動では、機械的刺激により歯根膜の炎症性メディエーターの発現が増加するなどの炎症様反応が生じ、骨のリモデリングが生じる。しかし、この過程におけるケモカインの関与の詳細は明らかでない。本研究の目的は、矯正力を加えたときの歯根膜によるケモカイン発現・産生の動態を調べ、さらにその細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることである。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

1. 圧刺激またはずれ応力によるヒト歯根膜細胞のケモカイン IL-8 mRNA の発現は増加し、同時にタンパク産生も増加した。
2. IL-8 産生にはサイトカイン IL-1 $\beta$  の関与が報告されているが、機械的刺激により歯根膜細胞での IL-1 $\beta$  mRNA 発現量は増加しなかった。しかし、抗 IL-1 $\beta$  中和抗体前投与することで、機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 産生量は有意に減少した。また、IL-8 誘導に関わる細胞内シグナル伝達機構を調べるため、MAP キナーゼ阻害剤と NF- $\kappa$ B 阻害剤を前投与して機械的刺激を加えたところ、歯根膜細胞の IL-8 mRNA の発現は3種類の MAP キナーゼ阻害剤によって有意に減少したが、NF- $\kappa$ B 阻害剤では変化しなかった。
3. Western blot 法による解析では、圧刺激によって歯根膜細胞の3種類の MAP キナーゼ (ERK, JNK, p38) のリン酸化の上昇を認めたが、細胞質中の I $\kappa$ B タンパク量は変化しなかった。
4. 健常被検者 10 人中 9 人で、歯肉溝浸出液中の IL-8 総量は矯正力負荷後 2-4 日で著明に増加した。

以上のことから、機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 産生には IL-1 $\beta$  の構成的な存在が必要であり、IL-8 産生は MAP キナーゼシグナル伝達系を介していることが示唆された。また、歯間分離によりヒト歯肉溝浸出液中の IL-8 総量が増加したことから、歯根膜細胞からの IL-8 産生は歯の移動における歯周組織反応の指標になり得る可能性が示唆された。しかし、歯肉溝浸出液中には歯根膜からだけでなく、他の歯周組織からの滲出液もみられることや、IL-8 発現・産生と矯正歯科臨床との関連は明らかでなく、今後さらなる研究が必要であると思われる。

本研究は、in vitro では機械的刺激による歯根膜細胞のケモカイン IL-8 の発現・産生に構成的な IL-1 $\beta$  の存在が必要であるとともに、MAP キナーゼシグナル伝達を介していることが示唆され、in vivo では矯正力を負荷した歯肉溝浸出液中で IL-8 の総量増加がみられたことから、IL-8 は矯正治療において骨のリモデリングの初期反応の指標となる可能性があり、非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 17 号	学位申請者	前田 綾
審査委員	主査	鳥居 光男	学位
	副査	山崎 要一	副査
	副査	大西 智和	副査
<p>主査および副査の5名は、平成 19 年 3 月 19 日、学位申請者 前田綾 氏に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1): 数多くあるケモカインの中でなぜこの 4 種類を選んだのか。  回答): 破骨細胞刺激因子である MIP-1<math>\alpha</math> と、圧迫側歯槽骨の MCP-1, RANTES, MIP-2 (ラットの MIP-2 はヒトの IL-8 と同等の物質) の mRNA が増加するとの報告から、この 4 物質を選択した。</p> <p>質問 2): サイトカインの中でなぜ IL-1<math>\beta</math> に着目したのか。  回答): 一般的に、IL-1 や TNF-<math>\alpha</math> などのサイトカインはケモカインを誘導し、他の機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 の mRNA 発現に IL-1<math>\beta</math> の関与が報告されていることから、サイトカインの中でも IL-1<math>\beta</math> に着目した。</p> <p>質問 3): 歯根膜細胞の採取方法を述べよ。  回答): 抜歯後、4<math>^{\circ}</math>C で保存し歯根中央部の歯根膜を採取し、dish に歯根膜とわずかな培養液をいれて 2~3 日放置した。その後 dish に歯根膜細胞が増殖してくるのを確認し、歯根膜を取り除き、細胞の培養を行った。</p> <p>質問 4): 培養した細胞は本当に歯根膜細胞なのか。歯根膜細胞である指標はあるのか。  回答): 歯根膜細胞であるという指標はない。しかし、歯根膜細胞の一つである歯根膜線維芽細胞は骨芽細胞様細胞であり、この細胞の指標として通常アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が測定される。今回歯根膜細胞でも ALP 活性を測定した。</p> <p>質問 5): 歯根膜細胞によって反応のレベルが違うのはなぜか。他の細胞の結果はどうだったのか。  回答): 歯根膜の被検者の年齢による可能性がある。今回示した 2 つの細胞系統は 10 代の若い被検者からの細胞で反応性は高く、20 後半から~30 代の他の細胞は同じ傾向を示すものの反応性はやや低かった。</p> <p>質問 6): なぜ機械的刺激にずり応力を選んだのか。またその力は実際の臨床ではどのような力を想定しているのか。  回答): 矯正力による歯根膜に作用する力の分布は、圧迫側と牽引側でもわずかにずり応力が発生しているが、歯根膜細胞にずり応力を負荷した報告は少ない。Osteocyte をずり応力刺激した研究において、0.6Pa, 5Hz が最も反応が良いことが報告されており、予備実験においても最も反応した 0.6Pa, 5Hz でずり応力を負荷した。しかし、これが臨床においてどのような力のモデルとなっているかの詳細は不明である。</p> <p>質問 7): 機械的刺激による負荷を 30 分とした理由は何か。  回答): 機械的刺激を 30 分以上負荷しても IL-8 mRNA の発現量は変わらなかったため 30 分とした。変わらない原因としては、ケモカインは早期に一過性に増加するためだと考えられる。</p> <p>質問 8): ずり応力 0.6Pa と圧力 10g/cm<math>^2</math> は同じ単位に換算すると 1000 倍近い差があるが、本当に同等の IL-8 発現の反応を示すのか。また、pulsating fluid flow (PFF) によるずり応力発生時に圧力もはたらいっているのではないか。  回答): ずり応力は圧力に比べて細胞変形が高く、細胞の反応性が良いとされており、実際数値を単純計算することはできな</p>			

い。しかし、ずり応力は圧力刺激より IL-8 発現・産生に効率よい刺激であるといえる。また、ご指摘のように、PFF による刺激では圧力も負荷されていると思われるが、どのような圧力が負荷されているかの詳細は不明である。

質問 9) : IL-8 タンパク濃度を測定した ELISA 法の原理について述べよ。

回答) : サンドイッチ法を用い、対象物質の抗原とウェル内の抗体を反応させ、さらに抗体酵素複合体による再度の抗原抗体反応を生じさせ、発色液添加により発色した吸光度 (450nm) を測定することにより、物質濃度を定量した。

質問 10) : 機械的刺激の歯根膜細胞培養液上清の IL-8 タンパク産生は 24 時間後より前ではどうなのか。

回答) : 予備実験において 12 時間、24 時間にかけて IL-8 のタンパク産生は増加した。

質問 11) : Western blot 法で、MAP キナーゼタンパクとリン酸化したタンパクをどのようにして検出するのか。

回答) : まず、ニトロセルロース膜に転写されたタンパクのうち、リン酸化した MAP キナーゼタンパクに特異的な抗体反応をさせて解析した。次にストリッピングを行い、同じメンブレンで MAP キナーゼタンパクに特異的な抗体反応を行い、解析した。

質問 12) : ERK のバンドは 2 つあるものなのか。また、コントロールでも ERK のリン酸化が見られるのはなぜか。

回答) : ERK のバンドは 2 つある。コントロールでも ERK がリン酸化していたのは、培養液中のウシ胎児血清の影響と思われる。

質問 13) : MAP キナーゼ阻害剤とはどのような機序で作用しているのか。

回答) : 酵素タンパクと結合することによって、リン酸化酵素活性を阻害する。

質問 14) : 抗 IL-1 $\beta$  中和抗体はどのようにして作用しているのか。

回答) : 抗 IL-1 $\beta$  中和抗体 (モノクローナル抗体) は培養液に添加することで、培養液中に産生された IL-1 $\beta$  と反応している。

質問 15) : IL-1 $\beta$  が少ないのにこれに抗 IL-1 $\beta$  中和抗体を添加して IL-1 $\beta$  を中和するのは効果があるといえるのか。

回答) : IL-1 $\beta$  の mRNA 発現は機械的刺激により増加しなかったが、IL-1 $\beta$  は一定量の発現が認められていた。

質問 16) : 歯肉溝浸出液 (GCF) を採取するときの飲食やブラッシングの条件はあったのか。

回答) : GCF は 16:00 に採取したが、被検者に採取前 1 時間以内の飲食は避け、ブラッシングは昼食直後に行うよう指示した。

質問 17) : GCF 中の IL-8 は濃度ではなく総量で示しているのはなぜか。

回答) : 歯周病における GCF 中のサイトカイン産生などの総量と濃度のどちらが最適であるかについては定説がない。今回の矯正力では GCF 量はほぼ一定で、IL-8 濃度も総量と同じような傾向となったため、今回は総量で示すこととした。

質問 18) : GCF 中の IL-8 総量の増加は遅くないか。また、それぞれのグラフのスケールが違うのはなぜか。

回答) : 機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 タンパク産生に 24 時間要していることから、生体でのタンパク産生にはもっと時間がかかることが予想される。GCF 中の IL-8 タンパク産生の増加時間とスケールのばらつきが認められた原因は、歯間分離という簡易的な方法で行い、個体に負荷される矯正力を統一していないことから生じた結果だと思われる。

質問 19) : 機械的刺激による歯根膜細胞以外の細胞反応はどうか。歯肉線維芽細胞は同じ働きをするのか。

回答) : 機械的刺激による IL-8 の産生は線維芽細胞や骨芽細胞でも観察されている。歯肉線維芽細胞では IL-1 $\beta$  による IL-8 の発現が報告されているが機械的刺激についての報告はまだない。今回の GCF 中の IL-8 産生には歯根膜だけでなく歯肉組織の反応の影響もありうるので、歯肉線維芽細胞と機械的刺激の関連は今後の研究課題である。

質問 20) : 今回の研究での IL-8 の増加は何を意味するのか。

回答) : ケモカインは単球を遊走し破骨細胞の成熟を促進することは知られているが、最近の報告から、IL-8 は骨芽細胞の RANKL 発現を増加し、また破骨細胞を直接活性化することが示唆されている。IL-8 は機械的刺激によって早期に発現が増加することから、早期の破骨細胞活性化に関与している可能性が示唆される。

質問 21) : 今後の展望について IL-8 の臨床応用のアイデアはあるか。

回答) : IL-8 の発現・産生は骨のリモデリングのトリガーであると考えられ、IL-8 の発現・産生の増加は歯の移動速度を速めるのではないかと予想される。歯根膜細胞での IL-8 発現・産生と実際の歯の移動速度の関係をなどを観察していきたい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。